

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO AGOTADOR SOBRE EL
ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO

RAFAEL ARANDA MALAVÉS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de Setembre de 2003 davant un tribunal format per:

- Dra. D^a. Mónica De la Fuente Del Rey
- Dr. D. Antonio Alberola Aguilar
- Dr. D. Jaime Miquel Calatayud
- Dra. D^a. Carmen Carda Batalla
- Dr. D. Juan Llopis Borrás

Va ser dirigida per:

Dr. D. José Viña Ribes

Dr. D. Federico V. Pallardó Calatayud

©Copyright: Servei de Publicacions
Rafael Aranda Malavés

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5815-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE CIÈNCIES DE L'ACTIVITAT
FÍSICA I L'ESPORT

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**Efecto del ejercicio físico agotador sobre el estrés
oxidativo asociado al envejecimiento.**

TESIS DOCTORAL presentada para la obtención del grado de
doctor en Educación Física por D. RAFAEL ARANDA
MALAVÉS.

AÑO 2003.

Dr. D. José Viña Ribes, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Dr. D. Federico V. Pallardó Calatayud, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que D. Rafael Aranda Malavés, licenciado en Educación Física por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada: **“Efecto del ejercicio físico agotador sobre el estrés oxidativo asociado al envejecimiento”**.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Valencia a 6 de Junio de 2003.

Fdo. Dr. D. José Viña Ribes

Fdo. Dr. D. Federico V. Pallardó
Calatayud

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra me apoyaron en la realización de este trabajo, y de forma especial:

- Al Dr. D. José Viña Ribes, por estimularme a formar parte de su grupo de investigación, y por aportar realismo a las ideas que han guiado este trabajo.
- Al Dr. D. Federico Pallardó Calatayud, por estar siempre a mi lado y por ser un ejemplo para mí como investigador y como profesor, pero sobretodo, como persona.
- Al Dr. D. Juan Sastre Belloch, por su disponibilidad constante y por sus conocimientos científicos.
- A D^a . Juana Belloch, por su inestimable ayuda y su exigencia en el laboratorio.
- Á D^a . M^a Dolores Royo, por su incalculable colaboración en los experimentos de laboratorio.
- A Rafa Márquez, por su ayuda y por iniciarme en el trabajo de laboratorio.
- A Chelo Borrás, Ana Lloret, Javi Pereda, Diana Rus, JuanBa Miñana, Luís Gómez, David García y M^a Carmen Gómez por su colaboración cotidiana.
- A Julián Carretero, Ángel Ortega , Juan Gambini e Ignacio Medina por su ayuda desinteresada.
- Al resto de miembros del Departamento de Fisiología por su comprensión y por su amistad.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	15
ABREVIATURAS	21
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Concepto de estrés oxidativo	27
1.2. Bioquímica de los radicales libres	28
1.2.1. Concepto de radical libre	28
1.2.2. Principales radicales libres.....	30
1.2.3. Fuentes de radicales libres.....	35
1.2.3.1. La enzima xantina óxidoreductasa como fuente de radicales libres.....	38
1.2.3.1.1. Vías metabólicas en las que intervine.....	39
1.2.3.1.2. Distribución orgánica, celular y transporte de la enzima.....	45
1.2.3.1.3. Estructura enzimática.....	60
1.2.3.1.4. Conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa.....	63
1.2.3.1.5. Procesos en los que tiene una participación relevante.....	66
1.2.3.1.6. Regulación de la expresión y actividad enzimática..	67
1.3. Consecuencias del estrés oxidativo: Del daño oxidativo a la transmisión de señales	71
1.3.1. Acciones de los radicales libres sobre las macromoléculas.....	72
1.3.1.1. Acciones sobre los glúcidos.....	72

1.3.1.2.	Acciones sobre los lípidos.....	73
1.3.1.3.	Acciones sobre las proteínas.....	74
1.3.1.4.	Acciones sobre los ácidos nucleicos.....	76
1.3.2.	Estrategias celulares contra los radicales libres. Sistemas antioxidantes.....	78
1.3.2.1.	Antioxidantes enzimáticos.....	78
1.3.2.1.1.	Superóxido dismutasa.....	78
1.3.2.1.2.	Glutación peroxidasa.....	79
1.3.2.1.3.	Catalasa.....	80
1.3.2.1.4.	Tioredoxina.....	81
1.3.2.1.5.	Glutaredoxina.....	81
1.3.2.2.	Antioxidantes no enzimáticos.....	82
1.3.2.2.1.	Glutación.....	82
1.3.2.2.2.	Vitamina E.....	85
1.3.2.2.3.	Vitamina C.....	86
1.3.2.2.4.	Ácido α -lipoico.....	87
1.3.2.2.5.	Carotenoides.....	88
1.3.2.2.6.	Ácido Úrico.....	88
1.3.2.2.7.	Otros.....	91
1.3.3.	Acciones de los radicales libres como señales.....	93
1.4.	El proceso de envejecimiento.....	93
1.4.1.	Delimitación conceptual	93
1.4.2.	Teorías del envejecimiento.....	95
1.4.3.	El proceso de envejecimiento según la teoría de los libres.....	96
1.5.	El ejercicio físico.....	99
1.5.1.	Tipos de ejercicio físico.....	99
1.5.2.	Producción de radicales libres durante el ejercicio físico.....	101
1.5.2.1.	La cadena de transporte electrónico del músculo esquelético.....	101
1.5.2.2.	Metabolismo de los prostanoides.....	102

1.5.2.3.	Catecolaminas.....	103
1.5.2.4.	NAD(P)H oxidasa.....	103
1.5.2.5.	Xantina óxidoreductasa.....	103
1.5.2.6.	Otras fuentes de radicales libres.....	104
1.5.2.6.1.	Leucocitos con capacidad fagocítica.....	104
1.5.2.6.2.	Producción de radicales libres secundariamente al la acumulación de calcio intramuscular.....	105
1.5.2.6.3.	Producción de radicales libres secundariamente a la ruptura de proteínas que contienen hierro.....	105
1.5.3.	Acciones biológicas de los radicales libres derivados del oxígeno durante el ejercicio físico.....	106
1.5.3.1.	Peroxidación lipídica y ejercicio físico.....	106
1.5.3.2.	Oxidación proteica y ejercicio físico.....	106
1.5.3.3.	Daño al DNA celular inducido por el ejercicio físico.....	107
1.5.4.	Inducción de las defensas antioxidantes por el ejercicio físico.....	107
1.5.5.	Afectación muscular asociada al ejercicio físico.....	108
1.6.	Ejercicio físico y envejecimiento.....	110
2.	OBJETIVOS.....	115
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	119
3.1.	Animales de experimentación.....	121
3.2.	Aparatos.....	123
3.3.	Reactivos.....	126
3.4.	Métodos.....	127
3.4.1.	Protocolo de agotamiento.....	127
3.4.2.	Protocolo de extracción de sangre y órganos.....	128
3.4.3.	Protocolo de perfusión de hígado y recogida de líquido eluido.....	130
3.4.4.	Protocolo de extracción de sangre a intervalos de tiempo concretos.....	132
3.4.5.	Protocolo de obtención de homogenados de hígado.....	133

3.4.6. Protocolo de obtención de homogenados de músculo	
gastrocnemio.....	134
3.4.7. Tratamiento de las muestras para microscopía electrónica.....	134
3.4.8. Determinaciones analíticas.....	135
3.4.8.1. Determinación de la actividad xantina oxidasa y xantina	
deshidrogenasa.....	135
3.4.8.2. “Western blot” de xantina oxidasa (XO) en homogenado	
de músculo gastrocnemio y aorta.....	138
3.4.8.3. Determinación de la actividad creatina kinasa.....	142
3.4.8.4. Determinación de la actividad láctico deshidrogenasa.....	144
3.4.8.5. Determinación de la concentración de glutatión reducido	
(GSH).....	145
3.4.8.6. Determinación de la concentración de glutatión oxidado	
(GSSG).....	147
3.4.8.7. Determinación de la producción de radical superóxido en	
aorta.....	148
3.4.8.8. Determinación de la concentración de proteínas en	
homogenados de hígado, músculo gastrocnemio y aorta.....	150
3.5. Análisis estadístico de los resultados.....	152
4. RESULTADOS.....	153
4.1. Los animales viejos se agotan antes que los animales jóvenes.....	155
4.2. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad creatina	
kinasa (CK) en plasma de animales jóvenes y viejos.....	155
4.3. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad láctico	
deshidrogenasa (LDH) en plasma de animales jóvenes y viejos.....	157
4.4. Efecto del ejercicio físico agotador sobre las fibras de músculo	
gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	158
4.5. Efecto del ejercicio físico agotador sobre las células hepáticas de	
animales jóvenes y viejos.....	160

4.6. Efecto del ejercicio físico agotador sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) y cociente GSSG/GSH en sangre de animales jóvenes y viejos.....	162
4.7. Efecto del ejercicio físico agotador sobre los niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y cociente GSSG/GSH en hígado de animales jóvenes y viejos.....	166
4.8. Efecto del ejercicio físico agotador sobre los niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y cociente GSSG/GSH en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	170
4.9. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO) en plasma de animales jóvenes y viejos.....	173
4.10. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina óxido-reductasa (XOR) y porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en hígado de animales jóvenes y viejos.....	174
4.11. Efecto del envejecimiento sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina óxido-reductasa (XOR) y porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en eluato de perfusión de hígado de animales jóvenes y viejos.....	177
4.12. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina óxido-reductasa (XOR) y porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	181
4.13. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína xantina oxidasa en músculo gastrocnemio	184

4.14. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina óxidoreductasa (XOR) y porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en aorta de animales jóvenes y viejos.....	185
4.15. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína xantina oxidasa en aorta	190
4.16. Efecto del envejecimiento sobre la producción de radical superóxido en anillos aorticos de rata.....	192
4.17. Efecto de la administración de heparina sobre la actividad xantina oxidasa en plasma de animales jóvenes y viejos.....	193
5. DISCUSIÓN.....	195
5.1. El ejercicio físico agotador provoca un aumento de los indicadores plasmáticos de daño muscular en animales jóvenes y viejos.....	197
5.2. El ejercicio físico agotador y el envejecimiento provocan estrés oxidativo en sangre, hígado y músculo gastrocnemio.....	202
5.3. La xantina óxidoreductasa contribuye al estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico y el envejecimiento.....	209
5.4. Origen de la actividad xantina óxidoreductasa plasmática.....	214
5.4.1. Los vasos sanguíneos contribuyen al aumento de la XOR que ocurre durante el proceso de envejecimiento.....	216
6. CONCLUSIONES.....	225
7. BIBLIOGRAFÍA.....	229

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución orgánica y celular de la enzima xantina óxidoreductasa en distintas especies.....	45
Tabla 2 . Características de diferentes tipos de actividad contráctil.....	100
Tabla 3. Comparación de las características asociadas al envejecimiento y al ejercicio físico.....	111
Tabla 4. Edad de los distintos grupos experimentales.....	122
Tabla 5: Peso de los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales.....	122
Tabla 6. Protocolo de ejercicio físico seguido para el agotamiento de los animales.....	127
Tabla 7. Efecto de la edad sobre el tiempo de agotamiento.....	155
Tabla 8. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad CK en plasma de animales jóvenes y viejos.....	156
Tabla 9. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad LDH en plasma de animales jóvenes y viejos.....	157
Tabla 10 : Variación de la actividad LDH en plasma de animales jóvenes y viejos agotados.....	158
Tabla 11: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH en sangre de animales jóvenes y viejos.....	162
Tabla 12: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSSG en sangre de animales jóvenes y viejos.....	165
Tabla 13: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH en hígado de animales jóvenes y viejos.....	167
Tabla 14: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSSG en hígado de animales jóvenes y viejos.....	167
Tabla 15: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el cociente GSSG/GSH en hígado de animales jóvenes y viejos.....	169
Tabla 16: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	170

Tabla 17: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSSG en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	171
Tabla 18: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el cociente GSSG/GSH en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	172
Tabla 19: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en plasma de animales jóvenes y viejos.....	173
Tabla 20 : Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en hígado de animales jóvenes y viejos.....	175
Tabla 21: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina deshidrogenasa en hígado de animales jóvenes y viejos.....	176
Tabla 22: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad total xantina óxidoreductasa en hígado de animales jóvenes y viejos.....	176
Tabla 23: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total en hígado de animales jóvenes y viejos.....	177
Tabla 24. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	181
Tabla 25: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina deshidrogenasa en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos....	183
Tabla 26: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad total xantina óxidoreductasa en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos....	183
Tabla 27: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total XOR en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	184
Tabla 28: Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína XO en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	185
Tabla 29: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en aorta de animales jóvenes y viejos.....	187
Tabla 30 : Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina deshidrogenasa con respecto a la actividad total XOR en aorta de animales jóvenes y viejos.....	188

Tabla 31: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad total	
xantina oxidoreductasa en aorta de animales jóvenes y viejos.....	189

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del desequilibrio que conduce al estrés Oxidativo.....	27
Figura 2. Mecanismos de inhibición del peroxinitrito en situación de exceso de NO.....	34 40
Figura 3. Vía de degradación de las purinas.....	42
Figura 4. Reacción de oxidación del NADH por la xantina óxidoreductasa	
Figura 5. Reacciones de reducción del nitrito a óxido nítrico por la xantina óxidoreductasa.....	43 61
Figura 6. Representación tridimensional de la estructura de la XOR.....	62
Figura 7. Representación gráfica de los enlaces del átomo de molibdeno...	
Figura 8. Representación del cambio conformacional en el sitio FAD en la XDH cuando se convierte en XO.....	64 65
Figura 9. Vías de conversión de la XDH en XO.....	
Figura 10. Representación gráfica de los centros molibdeno de la XOR y la forma desulfo-XOR.....	67 80
Figura 11. Ciclo de oxidación-reducción del glutatión.....	
Figura 12. Engranaje de varios sistemas antioxidantes en colaboración para neutralizar los radicales libres.....	87
Figura 13. Colaboración entre el urato y la vitamina C en la detoxificación del radical hidroxilo.....	90 113
Figura 14. Factores que causan una pérdida de fuerza muscular con la edad	155
Figura 15. Porcentaje de variación de la actividad CK en plasma de animales jóvenes y viejos agotados.....	156
Figura 16. Imagen obtenida con microscopio electrónico de músculo gastrocnemio de rata joven agotada. Detalle de las mitocondrias subsarcolémicas.....	158
Figura 17. Electromicrofotografía de músculo gastrocnemio de rata joven agotada. Detalle de vasos sanguíneos entre las fibras.....	158

Figura 18. Imagen ultraestructural de músculo gastrocnemio de rata vieja agotada. Detalle de una fibra degenerativa entre dos fibras normales..	160
Figura 19. Imagen obtenida con microscopio electrónico de hígado de rata joven agotada.....	161
Figura 20. Imagen ultraestructural de hígado de rata vieja agotada.....	161
Figura 21. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH y GSSG en sangre de animales jóvenes y viejos.....	164
Figura 22. Efecto del ejercicio físico agotador sobre el cociente GSSG/GSH en plasma de animales jóvenes y viejos.....	164
Figura 23. Variación de la concentración de GSSG en sangre de animales jóvenes y viejos como consecuencia del ejercicio físico agotador....	165
Figura 24. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH y GSSG en hígado de animales jóvenes y viejos.....	168
Figura 25. Variación de la concentración de GSSG en hígado de animales jóvenes y viejos agotados	168
Figura 26. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH y GSSG en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos	171
Figura 27. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina óxidoreductasa en hígado de animales jóvenes y viejos.....	175
Figura 28. Efecto del envejecimiento sobre la actividad XO y Total XOR en eluato de perfusión de hígado de animales jóvenes y viejos.....	179
Figura 29. Comparación de la actividad XO y de la actividad LDH en eluato de perfusión de hígado de una rata joven.....	180
Figura 30. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad XO, XDH y Total XOR en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.....	182
Figura 31. Efecto del envejecimiento sobre la cantidad de proteína xantinaoxidasasa en músculo gastrocnemio.....	185
Figura 32. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad XO, XDH y total XOR en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos	187

Figura 33. Efecto del ejercicio físico agotador sobre el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total en aorta de animales jóvenes y viejos.....	189
Figura 34. Western blot de XO en aorta de rata.....	190
Figura 35. Efecto del envejecimiento sobre la concentración de la proteína xantina oxidasa en aorta.....	191
Figura 36. Efecto del envejecimiento sobre la producción de radical superóxido por la XOR en anillos aórticos de rata.....	192
Figura 37. Efecto de la administración de heparina sobre la actividad xantina oxidasa en plasma de animales jóvenes y viejos.....	193
Figura 38. Evolución de la actividad CK en plasma de ratas jóvenes macho tras correr durante 1,5 h. y durante 2,5 h.....	198
Figura 39. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad CK y LDH en plasma de ratas jóvenes y viejas.....	199
Figura 40. Evolución de la actividad LDH en plasma de ratas jóvenes macho tras correr durante 1,5 h. y durante 2,5 h.....	200
Figura 41. Gráfico comparativo de la actividad LDH en plasma y del cociente GSSG/GSH en músculo de los cuatro grupos experimentales.....	205
Figura 42. Gráfico comparativo de la actividad XO en los distintos órganos estudiados: hígado, músculo y aorta.....	211
Figura 43. Gráfico comparativo del porcentaje de actividad XO respecto a la actividad total en los distintos órganos estudiados: hígado, músculo y aorta.....	218

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADP:	Adenosín-5' -difosfato.
AMP:	Adenosín-5' -monofosfato.
ATP:	Adenosín-5' -trifosfato.
BPDS:	Ácido batofenantrolinedisulfónico.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
BSO:	L-Butionina-(S,R)-Sulfoximina.
CDNB:	1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno.
CHES:	Ácido 2-N-ciclohexilamino etanosulfónico.
CK:	Creatina Kinasa.
DEM:	Dietilmaleato.
DHLA:	Ácido dihidrolipoico.
DNA:	Ácido desoxiribonucleico.
DTNB:	Ácido 5-5' -ditiobis-2-nitrobenzoico.
DTT:	Ditiotreitol.
EDTA:	Ácido etilendiamino tetraacético.
EGTA:	Ácido etilenglicol bis(â-aminoetileter)N,N,N',N' tetraacético.
GLU:	Glutamina.
GLY:	Glicina.
GGT:	ã-glutamil-transpeptidasa.
GOT:	Aspartato-aminotransferasa.
G-6P-DH:	Glucosa-6-fofato deshidrogenasa.
GPT:	Alanina-aminotransferasa.
GPX:	Glutación peroxidasa.
GR:	Glutación reductasa.
GSH:	Glutación reducido ó ã-glutamil-cisteinil-glicina.
GSSG:	Glutación oxidado o glutación disulfuro.
GS-T:	Glutación-S-transferasa.
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia.

IMP:	Inosina monofosfato.
K-H:	Krebs-Henseleit.
LDH:	Láctico Deshidrogenasa.
MDA:	Malondialdehído.
NAD ⁺ :	Nicotinamida adenín- dinucleótido.
NADH:	Nicotinamida adenín- dinucleótido reducido.
NADP ⁺ :	Nicotinamida adenín- dinucleótido fosfato.
NADPH:	Nicotinamida adenín- dinucleótido fosfato reducido.
NEM:	N- etilmaleimida.
NOS:	Óxido Nítrico Sintetasa.
PCA:	Ácido perclórico.
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro.
RNA:	Ácido ribonucleico.
RNS:	Especies reactivas del nitrógeno.
ROS:	Especies reactivas del oxígeno.
r.p.m.:	Revoluciones por minuto.
SDS:	Dodecilsulfato sódico.
Ser:	Serina.
SOD:	Superóxido dismutasa.
SODec:	Superóxido dismutasa extracelular.
TBS:	Tampón TRIS salino.
TCA:	Ácido tiobarbitúrico.
TRIS:	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.
UV:	Ultravioleta.
XDH:	Xantina deshidrogenasa.
XO:	Xantina oxidasa.
XOR:	Xantina óxidoreductasa.

INTRODUCCIÓN

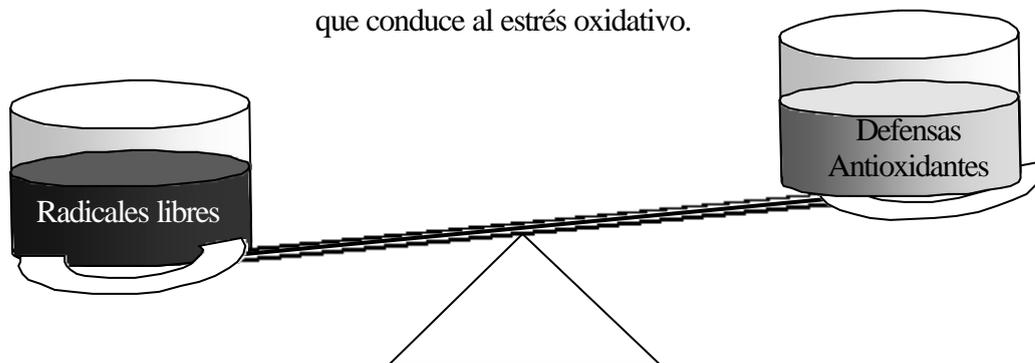
1. INTRODUCCIÓN.

1.1. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO.

La presente tesis es un estudio que gira alrededor del estrés oxidativo. En la introducción se describe el origen de los radicales libres, así como los mecanismos de que disponen los organismos vivos para defenderse de ellos, ya que los radicales libres suponen un potencial peligro de ataque y alteración de cualquier molécula cercana a ellos. La formación de cierta tasa de radicales libres en las células es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984) ya sea como producto de desecho de una reacción química dada o como producto con una función bioquímica en el organismo. Las células se defienden de estos radicales libres por medio de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Cuando la capacidad de los mecanismos antioxidantes se ve superada por las agresiones oxidativas, entonces se da la situación denominada “estrés oxidativo”, que en mayor o menor grado, puede llegar a producir lesiones celulares reversibles o irreversibles (Sies, 1986). En estas circunstancias, está indicado proteger al organismo incrementando su capacidad antioxidante, es decir, aumentando la capacidad defensiva de la célula mediante la administración de antioxidantes, ya sea como fármacos, o como complementos dietéticos (Ames, 1983).

El estrés oxidativo, debido a la dificultad existente para detectar directamente los radicales libres, se puede conocer mediante la medición de los productos de las reacciones oxidativas (peroxidación lipídica, oxidación del DNA, oxidación de proteínas), o mediante el conocimiento de la depleción de sustancias antioxidantes.

Figura 1. Representación gráfica del desequilibrio que conduce al estrés oxidativo.



1.2. BIOQUÍMICA DE LOS RADICALES LIBRES.

1.2.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE.

Un radical libre, por definición, es una molécula o un único átomo que posee un electrón desapareado, que se marca convencionalmente por un punto oscuro "•". Los electrones desapareados aumentan la reactividad química de dicha molécula.

Para entender lo que significa un electrón desapareado, debemos indicar previamente que los electrones suelen buscar la asociación con otro electrón, de manera que se puedan aparear sus sentidos de rotación en un sistema de baja energía. Es decir, un electrón puede moverse en dos sentidos de rotación. Si un electrón dado se aparea con otro, entonces estos dos electrones desapareados que tenían un sentido de rotación opuesto, forman un nuevo puente, y por tanto un sistema de baja energía más estable. Algunas veces, sin embargo, puede resultar más económico desde el punto de vista energético, que dos electrones permanezcan desapareados, incluso en la misma molécula. En este caso, dos electrones desapareados tienen el mismo sentido de rotación y se denomina un estado de triplete, o si están situados en diferentes átomos, un birradical (Witmer y cols., 1991).

La presencia de electrones desapareados o de sentidos de rotación desapareados, tiene una importante implicación, la alta reactividad de dichas especies, lo cual simplemente es la manifestación de la tendencia del radical a conseguir el estado más favorable energéticamente mediante el emparejamiento con otro electrón con un sentido de rotación opuesto, formando un nuevo puente entre dos átomos portadores de un electrón desapareado. Así pues, muchas reacciones radical-radical, y también radical con otra molécula, tienen lugar tan pronto como las dos moléculas de la reacción se encuentran. El tiempo que una reacción tarda en completarse depende de dos parámetros: la constante específica de la reacción, y la concentración de las especies que reaccionan. En los seres vivos, la concentración del radical libre es normalmente muy baja, y raramente adquiere valores lo suficientemente altos como para provocar una reacción radical-radical que desbanque a una reacción entre el radical y una molécula, ya que éstas están normalmente presentes a una

concentración mucho mayor en su proximidad. Así pues, cualquier reacción radical-radical es menos frecuente, aunque se da, como en el caso de la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido, pero la reacción con una molécula está favorecida por la considerablemente mayor concentración de la molécula que va a reaccionar, en comparación con la concentración del radical (Witmer y cols., 1991). La alta reactividad de los radicales libres hace que su vida media sea muy breve, del orden de milisegundos, variando según el radical libre de que se trate.

En los sistemas biológicos, los radicales libres son habitualmente moléculas de oxígeno o formadas en parte por éste, lo cual hace que a este conjunto de radicales libres se les denomine en conjunto especies reactivas del oxígeno (ROS). Asimismo, existen también radicales libres nitrogenados o especies de nitrógeno reactivas (RNS) o radicales libres centrados en otras moléculas, como el azufre.

1.2.2. PRINCIPALES RADICALES LIBRES.

Existen muchas clases de radicales libres, algunos de los radicales libres más importantes son:

1.2.2.1. Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

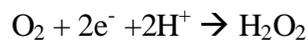
Se trata de un especie relativamente poco reactiva, pero potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros ROS que a su vez si son muy reactivos. Este anión puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de flavoproteínas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc.) (Behar y cols., 1979; Korycka-Dahi y cols., 1981), de oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p_{450} , etc.) , también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Sáez y cols., 1982; Viña y cols., 1983) o la rivo flavina (Barton y cols., 1970), o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris y cols., 1972).



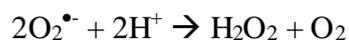
1.2.2.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, pero se debe tener en cuenta por su facilidad para difundir a través de las membranas. En los medios biológicos se forma por dos vías:

1. tras la reducción directa del oxígeno por dos electrones,



2. por la dismutación del ión superóxido.



Muchas enzimas producen agua oxigenada a partir de oxígeno: xantina oxidoreductasa, superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, D-aminoácido oxidasa, uricasa, etc. (Battaner y cols., 1990; Fridovich, 1986; Janolino y cols., 1975; Romero-Alvira y cols., 1987) y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (Korycka-Dahi y cols., 1981). La catalasa la transforma en agua.

1.2.2.3. Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$).

Es la especie más reactiva, con una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} s (Liochev y cols., 1994). Su alta reactividad hace que su acción química quede reducida a la estricta vecindad del lugar de producción. Puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ) la cual puede provocar rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo. Pero a nivel biológico, el proceso de formación del radical hidroxilo más importante es la reacción de Fenton (Fenton, 1894):



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss (Haber y cols., 1932):



Esta reacción es catalizada por metales como el hierro o el cobre.

1.2.2.4. Radical peroxilo (ROO^{\bullet}).

Los radicales peroxilos son probablemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, no siendo tan reactivos como otras especies de ROS. Se originan a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado. Este radical tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).



1.2.2.5. Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno en presencia de fotoactivadores como la riboflavina (Aurand y cols., 1977). Su vida media es alrededor de 10^{-6} segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras.

1.2.2.6. Óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$).

En los últimos años se ha prestado particular atención a esta especie reactiva del nitrógeno. Es un gas lipofílico e hidrosoluble, de una vida media de 3 a 5 s. Se forma enzimáticamente a partir de la arginina, reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa NOS (Moncada y cols., 1991). Dicha enzima presenta tres isoformas. La neuronal nNOS (tipo I) y la endotelial eNOS (tipo III) se expresan constitutivamente y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio (Bredt y cols., 1991; Lamas y cols., 1992). La inducible iNOS (tipo II) la expresan los macrófagos cuando son estimulados por citocinas, lipopolisacáridos u otras sustancias inmunológicas, siendo su expresión regulada tanto a nivel transcripcional como posttranscripcional, en lo cual participan factores de transcripción sensibles al estado redox como el NF- κ B o las MAPKinasas (MacMicking y cols., 1997). Juega un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo local, inhibe la agregación plaquetaria, es un neurotransmisor y se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria. Otro efecto del $^{\bullet}\text{NO}$ reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del DNA, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.

El $\bullet\text{NO}$ posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble efecto Grisham y cols. (Grisham y cols., 1999) proponen que los efectos reguladores y antiinflamatorios del óxido nítrico ocurren cuando éste tiene efectos directos sobre una molécula biológica, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la producción de $\bullet\text{NO}$ es baja. Sin embargo, cuando las concentraciones de $\bullet\text{NO}$ aumentan, el $\bullet\text{NO}$ tiene efectos indirectos, a través de los metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación.

1.2.2.7. Peroxinitrito ($\text{ONOO}\bullet$).

El óxido nítrico puede generar anión peroxinitrito ($\text{ONOO}\bullet$) al reaccionar con el anión superóxido (Gryglewslí y cols., 1986; Miles y cols., 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:

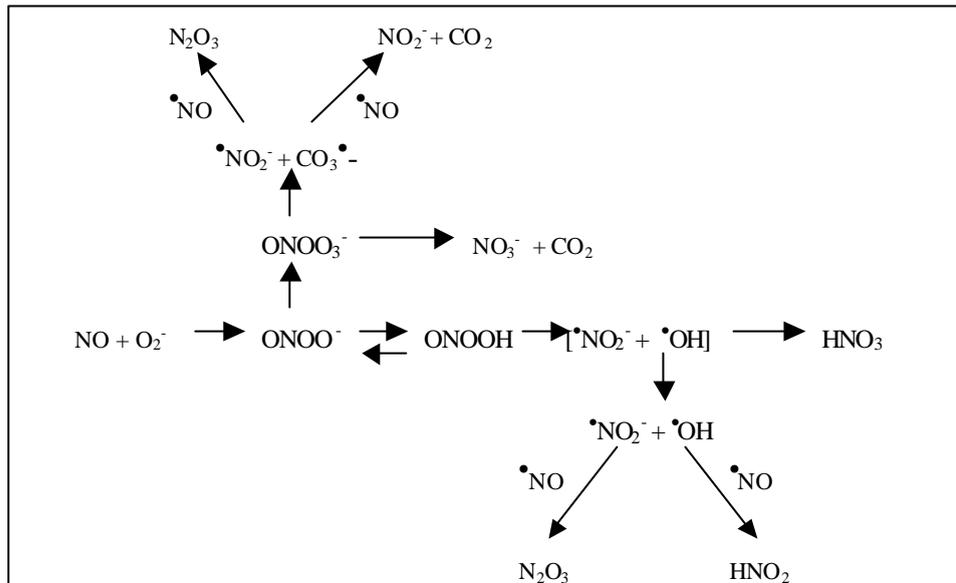


El peroxinitrito está en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles o tiéteres, capaz de nitrar residuos de tirosina, de nitrar y oxidar guanosina, de degradar carbohidratos, de iniciar peroxidación lipídica y de fragmentar DNA (Beckman y cols., 1996; Beckman y cols., 1994).

La producción de $\text{O}_2\bullet$ y $\bullet\text{NO}$ *in vivo* espaciotemporalmente es diferente, y se solapa escasamente, con lo que la producción de peroxinitrito ocurre siempre con exceso de uno o de otro (Grisham y cols., 1999). Algunos autores establecen que tanto las reacciones de oxidación como de nitración mediadas por el peroxinitrito están influenciadas en gran medida por el flujo de producción relativo de $\text{O}_2\bullet$ y $\bullet\text{NO}$ (Jourdeuil y cols., 2001). Dichos autores establecen que las más altas tasas de oxidación se producen con exceso de $\bullet\text{NO}$, produciéndose la oxidación a través de del $\bullet\text{OH}$ y del $\bullet\text{NO}_2$ formados a partir del peroxinitrito. Sin embargo, la reacción del peroxinitrito con el CO_2 es la vía más importante por la que se descompone el

peroxinitrito *in vivo* (Lyman y cols., 1995), formando al final N_2O_3 , que es un potente agente nitrante.

Figura 2. Mecanismos de inhibición del peroxinitrito en situación de exceso de NO. (Adaptado de Jourdeuil, 2001).



Además de las reacciones de oxidación, el peroxinitrito tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina (Goldstein y cols., 2000). Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el $\bullet\text{NO}$ para formar 3-nitrotirosina. La nitración mediada por peroxinitrito *in vivo* podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de $\text{O}_2^{\bullet -}$, debido a la competencia entre éste y el $\bullet\text{NO}$ por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de $\text{O}_2^{\bullet -}$ superara la de $\bullet\text{NO}$ (Goldstein y cols., 2000; Goldstein y cols., 2000). Asimismo, algunos autores han presentado la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de $\text{O}_2^{\bullet -}$ sin la consiguiente formación de H_2O_2 , lo cual supone un efecto detoxificante y antiinflamatorio (Granger y cols., 1996; Wink y cols., 1998).

1.2.3. FUENTES DE RADICALES LIBRES.

Existen diversos caminos por los cuales el organismo se expone a los efectos de los radicales libres derivados del oxígeno. Los radicales libres pueden producirse a través de diversos procesos químicos, tanto dentro como fuera del organismo. Atendiendo al origen de su producción, podemos clasificar las fuentes en exógenas y endógenas (Freeman y cols., 1982):

➤ Exógenas.

- Muchos agentes antineoplásicos (Deno y cols., 1982), tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov y cols., 1982) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielsky y cols., 1977).
- Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, 1982).

➤ Endógenas.

Me gustaría resaltar antes de citar las distintas fuentes endógenas, que una misma célula tiene potencialmente más de una fuente de producción de radicales libres.

- Autooxidación de pequeñas moléculas.

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dioxígeno por estas moléculas (Baccarini, 1978). Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la

dismutación del radical superóxido, bien espontáneamente, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD).

- Enzimas solubles y proteínas.

Enzimas como xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman y cols., 1967; Hirata y cols., 1971; Massey y cols., 1969).

- Cadena de transporte electrónico mitocondrial.

En los tejidos sanos una de las principales fuentes de radicales libres son las mitocondrias. Esto se debe a que estos orgánulos son responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular y a que los radicales libres en los sistemas biológicos proceden siempre, en último término, del metabolismo del oxígeno por la vía univalente.

La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen, 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris y cols., 1975). La generación del radical superóxido por la mitocondria se produce cuando los transportadores de la cadena respiratoria, localizados en la membrana mitocondrial interna, están altamente reducidos (Turrens y cols., 1980).

De los cuatro Complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado la producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en el complejo I (Turrens y cols., 1980) y en el Complejo III (Boveris y cols., 1976). En el caso del complejo I, los candidatos más probables como generadores de radicales libres parecen ser los centros hierro-sulfurados (Herrero y cols., 1997), mientras que en el caso del complejo III se ha debatido intensamente sobre si podrían corresponder a la semiquinona (Boveris y cols., 1976) o al citocromo b (Nohl y cols., 1986).

- Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y membrana nuclear.

Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen los citocromos P₄₅₀ y b₅ que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila y cols., 1981) y xenobióticos (Chignell, 1979). De hecho, los citocromos P₄₅₀ (término usado para un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidas entre los seres vivos) son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberada en la célula (Dolphin, 1988; Foster y cols., 1993).

- Peroxisomas.

Los peroxisomas son potentes fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas, ninguna de las cuales utiliza el superóxido como precursor del mismo. Entre estas enzimas están incluidas la D-aminoácido oxidasa, urato oxidasa, L- α -hidroxiácido oxidasa y acil-graso-coenzima A oxidasa (Boveris y cols., 1972). La catalasa peroxisomal es la enzima que metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas de los peroxisomas (Freeman y cols., 1982; Frei, 1994).

- Membrana plasmática.

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de ser alterados por los radicales libres. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad de la membrana, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares, todo ello provocado por la peroxidación lipídica, o la oxidación de importantes proteínas estructurales (Freeman y cols., 1982).

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados (Weiss y cols., 1982). También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio (Mohazzab y cols., 1994), en las cuales desempeñan un papel importante como señales intracelulares.

Cabe destacar la importancia de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White, 1990).

1.2.3.1. La enzima xantina óxidoreductasa como fuente de radicales libres.

Dado que esta enzima juega un papel central en este trabajo, hemos creído conveniente dedicarle más espacio que al resto de fuentes de radicales libres, describiendo sus propiedades y características en varios apartados.

La enzima xantina óxidoreductasa (XOR) es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 (Schardinger, 1902). Esta enzima está ampliamente distribuida entre seres vivos de distinta complejidad, habiéndose demostrado su existencia desde organismos tan sencillos como las bacterias hasta los mamíferos más evolucionados como el hombre. Esta enzima en las distintas especies cataliza la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos. La enzima xantina óxidoreductasa posee en las distintas especies un peso molecular similar y mantiene una estructura similar de los centros de oxidación-reducción (Hille, 1996; Hille y cols., 1995). La xantina óxidoreductasa es

sintetizada como xantina deshidrogenasa (XDH, EC 1.1.1.204) y se mantiene mayoritariamente como tal en la célula, pero puede convertirse rápidamente en la forma xantina oxidasa (XO, EC 1.1.3.22) mediante oxidación de los residuos sulfidrilo o mediante proteólisis. Esta conversión sólo ocurre en la xantina óxido-reductasa de los mamíferos, incluida la humana y la de rata (Hille y cols., 1995), en contraposición a otras especies, como las aves, en las que no se ha visto conversión a XO.

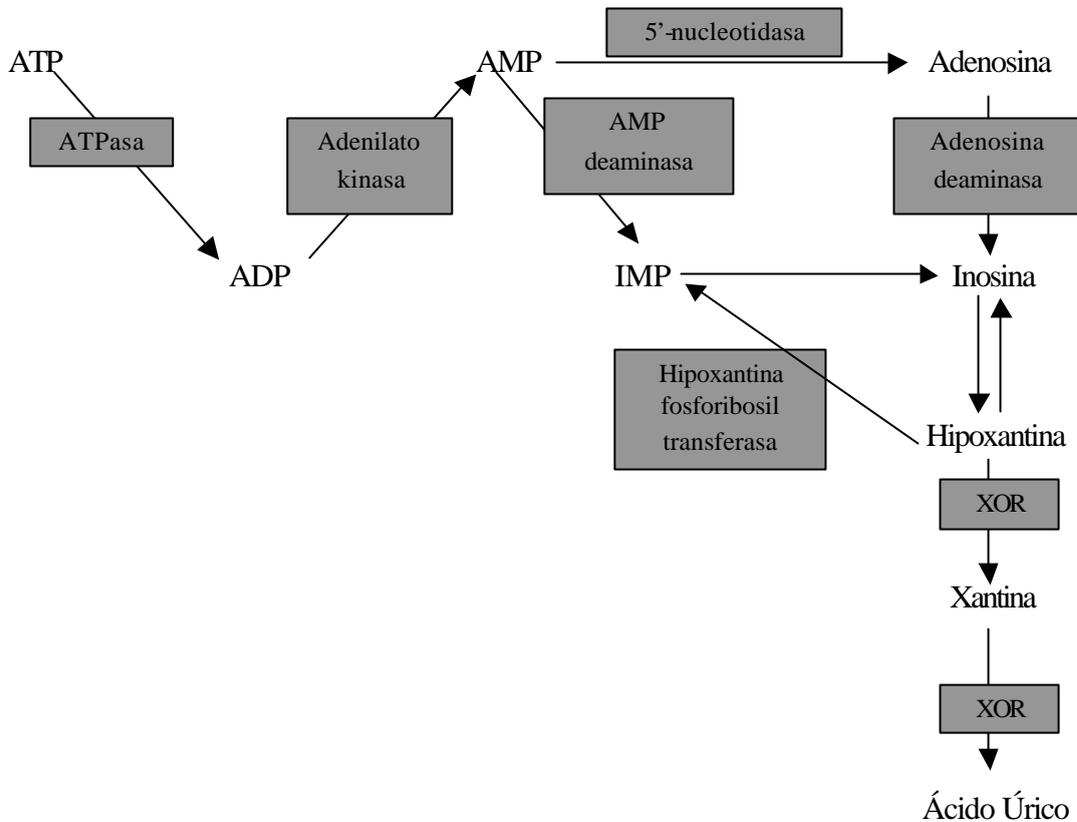
1.2.3.1.1. Vías metabólicas en las que intervine.

En 1963 Berne y Gerlach con sus colaboradores vieron que, en órganos aislados, los productos de degradación de los nucleótidos de adenina se acumulaban durante la hipoxia, y uno de los productos liberados desde la célula era la hipoxantina.

En los mamíferos, la enzima cataliza la hidroxilación de esta hipoxantina a xantina, y esta a su vez para dar lugar a ácido úrico.

La xantina oxidasa utiliza hipoxantina y oxígeno (como aceptor de electrones), para dar lugar a xantina (eventualmente ácido úrico) y a radical superóxido, mientras que la xantina deshidrogenasa, que es la forma predominante en condiciones fisiológicas, utiliza xantina y NAD^+ (como aceptor de electrones) (Parks y cols., 1988). La xantina deshidrogenasa es capaz de utilizar tanto el NAD^+ como el oxígeno como aceptor de electrones, aunque tiene preferencia por el primero. La xantina oxidasa sólo es capaz de utilizar el oxígeno como aceptor de electrones.

La velocidad máxima de catálisis de la reacción catalizada por la xantina deshidrogenasa (xantina y NAD^+ como sustratos) es similar a la velocidad máxima de la reacción catalizada por la xantina oxidasa (xantina y O_2) (Saito y cols., 1989), lo cual interpretan algunos autores como muestra de que el paso limitante de la reacción es la liberación del ácido úrico de la enzima (Schopfer y cols., 1988).

Figura 3. Vía de degradación de las purinas.

La reacción de catálisis de la XOR puede dividirse en dos partes, una hemireacción de reducción de la enzima, en la cual dos electrones a la vez son transferidos desde la xantina a la XOR, y otra hemireacción de oxidación de la enzima en la que los electrones se transfieren desde la XOR al NAD^+ o al oxígeno (Harris y cols., 1997).

La hemireacción de reducción de la enzima es similar en la XO y en la XDH, siendo el grupo Mo-OH (que no el Mo=O) el grupo catalíticamente lábil (Xia y cols., 1999) (véase estructura de la enzima). La hemireacción de oxidación de la enzima difiere entre las dos formas de la enzima. Tal como hemos dicho previamente, la XO sólo es capaz de reaccionar con el oxígeno, mientras que la XDH es capaz de reaccionar tanto con el oxígeno como con el NAD^+ .

La XO presenta una constante de catálisis (k_{cat}) de 13/s (Harris y cols., 1994), y produce 2 moles de O_2^{\bullet} y dos de H_2O_2 por cada mol de XO.

La XDH presenta una constante de catálisis (k_{cat}) de 2,1/s. para el oxígeno y de 6,3/s. para el NAD, ambos con xantina, lo cual explica la mayor importancia del NAD^+ en la reacción catalizada por la XDH (Hunt y cols., 1992). En el caso de la XDH de hígado de pollo, se producen 3 moles de $O_2^{\bullet-}$ y 1,5 de H_2O_2 por cada mol de XDH, mientras que en la XDH de leche de vaca es menor (Nishino y cols., 1989). Por lo tanto, el oxígeno es un pobre competidor para el NAD^+ como sustrato para la XDH, aunque adquiere importancia en caso de haber una baja concentración de NAD^+ .

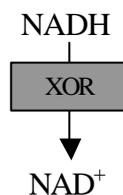
Así como en las aves y algunos mamíferos la XOR sólo existe en su forma XDH, en los mamíferos ha evolucionado a una enzima capaz de reaccionar también con el oxígeno, la XO, encontrándonosla en sus dos formas, XO y XDH (Krenitsky y cols., 1986). Además, esta enzima es la única del organismo capaz de sintetizar ácido úrico. En el ser humano y los primates este es el último escalón en la degradación de las purinas, mientras que en otros mamíferos la vía de degradación de éstas sigue a alantoína, ácido alantoico, ácido glioxílico y finalmente ácido oxálico. La enzima responsable de que continúe esta reacción es la uricasa, la cual no se expresa en el hombre y hace que la concentración de ácido úrico en plasma sea 10 veces mayor que la concentración en las especies que sí la expresan (Cutler, 1984).

Otra reacción que es catalizada por la XOR es la oxidación de NADH en presencia de oxígeno, produciendo radical superóxido. Esta actividad NADH oxidasa ha sido escasamente estudiada aunque ya ha sido documentada en XO de leche de vaca (Nakamura, 1991), en XDH de hígado de pavo (Fhaolain y cols., 1976), en XDH de hígado de pollo (Fonoll y cols., 1980; Nishino y cols., 1989) y en XO y XDH de leche humana y de vaca (Harris y cols., 1997; Sanders y cols., 1997). Estos últimos autores establecen que la actividad NADH oxidasa de la enzima puede ser relevante en cuanto a la producción de ROS *in vivo*, afirmando que si la XOR de otros tejidos humanos tiene propiedades similares a la de la leche, la actividad NADH oxidasa puede considerarse una fuente importante de ROS. Sus resultados demuestran que la concomitante producción de $O_2^{\bullet-}$ por la actividad NADH oxidasa de la enzima es 10 veces mayor por parte de la XO de leche de vaca que por parte de la XDH del mismo origen. Sin embargo recuerdan que *in vivo* la proporción de XO tisular es de

alrededor del 20 % o menor del total de XOR, y que en ciertos procesos, entre ellos la isquemia-reperfusión, se produce una conversión de la XDH a XO.

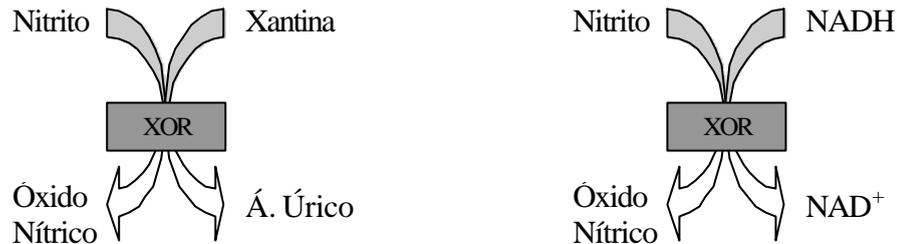
Un hecho que podría dar protagonismo a la actividad NADH oxidasa *in vivo* es el de que la isquemia aumenta la concentración citosólica de NADH. Dicho aumento incrementa la actividad NADH oxidasa de la XOR, lo cual podría aumentar la producción de ROS por esta vía. Asimismo, establecen que la producción de radical superóxido por esta vía depende linealmente de la concentración de oxígeno en un rango que va desde la del tejido isquémico a la del tejido normóxico, no mostrando evidencia de saturación (Harris y cols., 1997). La XDH produce dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$ y una de H_2O_2 por cada molécula de NADH oxidada (Sanders y cols., 1997). La oxidación del NADH y su consiguiente producción de superóxido es claramente más rápida por parte de la XDH que de la XO, tanto en humanos como en vacas (Sanders y cols., 1997).

Figura 4. Reacción de oxidación del NADH por la xantina óxidoreductasa.



Se sabe desde hace casi 100 años que la enzima XOR cataliza además la reducción de nitrato a nitrito en condiciones anaeróbicas (Dixon y cols., 1924; Fridovich y cols., 1962; Westerfield y cols., 1959), y en la misma línea se ha descubierto recientemente que la XO cataliza también la subsiguiente reacción de reducción del nitrito para la formación de $\bullet NO$ en condiciones de hipoxia (Millar y cols., 1997), y tanto en condiciones aeróbicas como en hipoxia (Zhang y cols., 1998). Algunos estudios han visto que en casos de isquemia de algunos tejidos, como el corazón, se produce óxido nítrico ($\bullet NO$) a través de una vía diferente a la óxido nítrico sintetasa (NOS), a partir de nitrito, sobretodo en situación de acidosis (Samouilov y cols., 1998).

Figura 5. Reacciones de reducción del nitrito a óxido nítrico por la xantina oxidoreductasa.



Tanto la xantina como el NADH pueden ceder electrones en la reacción, aunque la xantina es el más eficiente (Li y cols., 2001). El nitrito se une al sitio molibdeno de la enzima. Cuando la xantina es el sustrato reductor, éste se une al sitio molibdeno, mientras que cuando el reductor es el NADH, éste lo hace al sitio FAD, el cual transfiere los electrones al sitio molibdeno, donde está el nitrito (Li y cols., 2001).

Así como un exceso de NADH no tiene efecto inhibitorio en la reacción, un exceso de xantina provoca la inhibición de la reacción, probablemente por la unión de la xantina al sitio molibdeno, bloqueando la unión del nitrito (Hille y cols., 1984) (Li y cols., 2001; Rubbo y cols., 1991). Además, se ha demostrado que en pH ácido se favorece la reacción, por lo que en condiciones anaeróbicas o hipóxicas la enzima XOR cataliza la formación de $\bullet\text{NO}$, formándose dos moléculas de $\bullet\text{NO}$ por cada molécula de NADH, el cual cede dos electrones que reducen cada uno una molécula de nitrito. En caso de ser la xantina el sustrato reductor, por cada molécula de xantina oxidada se produce una molécula de $\bullet\text{NO}$ (Godber y cols., 2000), si bien otros autores refieren que son dos las moléculas de nitrito reducidas por cada molécula de xantina oxidada (Li y cols., 2001).

El nitrito es el sustrato limitante, habiendo algunas fuentes que pueden aumentar la concentración tisular de nitrito, como la activación previa de la NOS en condiciones de inflamación, dieta rica en nitrito, aumento farmacológico, o a partir de las bacterias. Todas ellas pueden modular la acción de la XOR en la formación de $\bullet\text{NO}$. Además, el óxido nítrico inactiva la catálisis de la reacción, debido a la desulfuración de la enzima (Ichimori y cols., 1999), afirmando otros autores que se produce una sustitución del azufre unido al átomo de Molibdeno por un átomo de oxígeno (Godber y cols., 2000). Esta nueva configuración hace que la circulación de electrones del NADH cedidos desde el sitio FAD al sitio Molibdeno sea menos favorable (Porras y cols., 1982).

Tanto la xantina oxidasa como la xantina deshidrogenasa puede formar $\bullet\text{NO}$, siendo esta última 50 veces más eficiente que la forma oxidasa (Godber y cols., 2000), lo cual hay que considerar teniendo en cuenta que *in vivo* la concentración intracelular de XDH es la forma predominante de la XOR. Así, la formación de $\bullet\text{NO}$ por esta vía puede alcanzar los niveles que alcanza la formación de $\bullet\text{NO}$ a través de la NOS. Si se tiene en cuenta que la NOS en condiciones de hipoxia y acidosis se desnaturaliza, primero reversiblemente para luego hacerlo de forma irreversible, la formación de $\bullet\text{NO}$ a través de la xantina óxidoreductasa puede tener gran importancia. Inicialmente el $\bullet\text{NO}$ formado se acumularía durante el período isquémico, provocando una vasodilatación compensatoria, mientras que en la fase de reperfusión, éste podría reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual produce nitración (nitrosilación) de proteínas y daño celular (Beckman y cols., 1990; Wang y cols., 1996).

La reacción de formación de $\bullet\text{NO}$ a partir de nitrito es muy similar tanto si es catalizada por la XO como si lo es por la XDH (Sanders y cols., 1997). Cuando esta reacción es realizada en presencia de oxígeno, todo se complica por la formación concomitante de radical superóxido junto con el $\bullet\text{NO}$. A medida que la tensión de oxígeno aumenta, también lo hace la producción de radical superóxido y disminuye la producción de $\bullet\text{NO}$, efecto que es inhibido por la presencia de SOD (Sanders y cols., 1997). Debemos citar asimismo, la afirmación de Sanders y cols. que comprueban

una mayor actividad NADH oxidasa y por tanto también una mayor producción de radical superóxido por la XO humana que por la de vaca (Sanders y cols., 1997).

1.2.3.1.2. Distribución orgánica, celular y transporte de la enzima.

La enzima xantina óxidoreductasa se localiza en el citoplasma celular y no tiene igual expresión en todos los tejidos. La expresión de la enzima en los distintos tejidos varía según las especies, por lo que hemos de tener en cuenta la especie utilizada en los estudios para no caer en confusiones o errores que pudieran limitar el entendimiento de esta proteína y llevarnos a conclusiones erróneas. La tabla 1 muestra la distribución orgánica y celular de la enzima en distintas especies. Tal como se puede observar, es una enzima que está ampliamente distribuida, siendo particularmente abundante en las células epiteliales de la glándula mamaria y en el endotelio capilar de diversos órganos.

Tabla 1. Distribución orgánica y celular de la enzima xantina óxidoreductasa en distintas especies.

Especie	Órgano estudiado	Tipo Celular donde se localiza la XDH-XO	Técnica	Autor
Hombre	Hígado	Hepatocitos peri portales; células de Kupffer	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
	Hígado	Hepatocitos peri portales y peri centrales, así como en células sinusoidales	Histoquímica enzimática	(Kooij y cols., 1992)

Hígado		Espectrofotometría	(Della Corte y cols., 1969)
Hígado		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Hígado		Radioquímica	(Engelman y cols., 1964)
Hígado		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)
Hígado		RIA	(Bruder y cols., 1983)
Hígado		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Corazón		PCR	(Saksela y cols., 1998)
Corazón	Ningún tipo celular	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
Corazón	Cantidad varios órdenes inferior a hígado y yeyuno	PCR	(Saksela y cols., 1998)
Corazón	Alta actividad	Actividad enzimática	(Wajner y cols., 1989)
Corazón	Baja actividad	Actividad enzimática	(de Jong y cols., 1990)
Corazón	Actividad no detectable	Actividad enzimática	(Downey y cols., 1988)
Corazón	Actividad no detectable	Actividad enzimática	(Eddy y cols., 1987)
Corazón	Actividad no detectable	Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Corazón		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)

Yeyuno	Enterocitos; endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
Yeyuno	Enterocitos; en endotelio capilar no	Inmunohistoquímica	(Moriwaki y cols., 1996)
Yeyuno	Enterocitos;	Histoquímica enzimática	(Kooij y cols., 1992)
Yeyuno		PCR	(Saksela y cols., 1998)
Yeyuno		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Yeyuno		Radioquímica	(Engelman y cols., 1964)
Yeyuno		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)
Yeyuno		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)
Yeyuno		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Bazo		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Riñón	Endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
Riñón		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Riñón		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Riñón		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)
Riñón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)

Pulmón	Ningún tipo celular	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
Pulmón	Cantidad varios órdenes inferior a hígado y yeyuno	PCR	(Saksela y cols., 1998)
Pulmón	Actividad no detectable	Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Pulmón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Cerebro	Ningún tipo celular	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
Cerebro	Cantidad varios órdenes inferior a hígado y yeyuno	PCR	(Saksela y cols., 1998)
Músculo esquelético	Endotelio capilar y venular.	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
Músculo esquelético	Endotelio capilar.	Inmunohistoquímica	(Hellsten-Westing, 1993)
Músculo esquelético		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)
Glándula mamaria lactante	Células acinares en conductos terminales; células epiteliales de grandes conductos; endotelio capilar y arteriolar.	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)

	Glándula mamaria no lactante	Células acinares en conductos terminales; endotelio capilar y arteriolar.	Inmunohistoquímica	(Linder y cols., 1999)
	Piel		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Perro	Hígado		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Hígado		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Hígado		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Corazón	Actividad no detectable	Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Corazón	Alta actividad		(Wajner y cols., 1989)
	Intestino		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Intestino		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Intestino		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Páncreas		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Colon		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Bazo		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)	
Bazo		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)	

	Riñón		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Riñón		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Pulmón		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Pulmón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Cerebro		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Músculo esquelético		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Mesenterio		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Piel		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Tejido adiposo		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Tejido adrenal		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Rata	Hígado		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Hígado		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Hígado		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
	Hígado		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Hígado	Hepatocitos		(Ichikawa y cols., 1992)

Hígado	Hepatocitos (alta), células de Kupffer (baja) y endotelio sinusoidal (baja).	Actividad enzimática	(Wiezorek y cols., 1994)
Corazón		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Corazón		RIA	(Bruder y cols., 1983)
Corazón		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
Corazón	Alta actividad		(Wajner y cols., 1989)
Intestino		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Intestino		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Intestino		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
Páncreas		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
Colon		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Bazo		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Bazo		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
Riñón		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Riñón		RIA	(Bruder y cols., 1983)

	Riñón		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
	Pulmón		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Pulmón		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Pulmón		RIA	(Bruder y cols., 1983)
	Pulmón		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
	Pulmón	Epitelio		(Ghio y cols., 2002)
	Cerebro		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Cerebro		Espectrofotometría	(Battelli y cols., 1972)
	Hígado		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Ratón	Hígado		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Hígado	Hepatocitos	mRNA	(Kurosaki y cols., 1995)
	Corazón		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Intestino		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Intestino		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Estómago		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Páncreas		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Colon			
	Bazo		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Riñón		Espectrofotometría	(Lee, 1973)

	Pulmón		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Cerebro		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Músculo esquelético		Espectrofotometría	(Lee, 1973)
	Lavado broncoalveolar			(Akaike y cols., 1990)
	Tejido adrenal			
	Sangre			
	Suero			
	Hígado		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Gato	Hígado		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Corazón		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Intestino		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Intestino		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Páncreas		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Colon		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Bazo		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Riñón		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Pulmón		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)

	Cerebro	Actividad no detectable	Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Músculo esquelético	Actividad no detectable	Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Mesenterio		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Piel			
	Tejido adiposo		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Tejido adrenal		Radioquímica	(Schoutsen y cols., 1983)
	Hígado		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Vaca	Hígado		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Hígado		RIA	(Bruder y cols., 1983)
	Hígado		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Hígado	Endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Jarasch y cols., 1981)
	Corazón		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
	Corazón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Corazón	Endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Jarasch y cols., 1981)
	Intestino			
	Intestino	Endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Jarasch y cols., 1981)

Bazo		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Bazo		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Bazo		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Riñón		Espectrofotometría	(Krenitsky y cols., 1974)
Riñón		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Riñón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Pulmón		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
Pulmón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Pulmones	Endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Jarasch y cols., 1981)
Músculo esquelético		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Músculo esquelético	Endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Jarasch y cols., 1981)
Glándula mamaria lactante		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)
Gl. Mamaria lactante	Células epiteliales; endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Jarasch y cols., 1981)
Glándula mamaria no lactante		Radioquímica	(Watts y cols., 1965)

	Piel		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Tejido adiposo		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Tejido adrenal		Espectrofotometría	(Ramboer, 1969)
	Hígado		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
Oveja	Corazón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Estómago		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Páncreas		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Colon		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Riñón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Pulmón		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Cerebro		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Músculo esquelético		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Mesenterio		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Piel		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Tejido adiposo		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)

	Tejido adrenal		Radioquímica	(Al-Khalida y cols., 1965)
	Músculo esquelético	Endotelio capilar	Inmunohistoquímica	(Hellsten-Westing, 1993)
Caballo	Lavado broncoalveolar			(Ikuta y cols., 1992)

Los estudios de localización intracelular de la enzima realizados con microscopio de luz y electrónico muestran que la XOR es una enzima básicamente citosólica en las células endoteliales de capilar de vaca (Jarasch y cols., 1981) y en células endoteliales de hígado de rata (Angermuller y cols., 1987; Dikov y cols., 1988). Además, Ichikawa y cols. concluyen que la enzima no se asocia a ningún orgánulo intracelular, como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los lisosomas o los peroxisomas (Ichikawa y cols., 1992). Utilizando microscopio confocal se ha visto que la enzima se distribuye en todo el citoplasma celular de las células endoteliales y epiteliales humanas, pero con una concentración mayor alrededor del núcleo, lo cual puede significar una localización estratégica para la activación de factores de transcripción nucleares (por ej. NF- κ B) a través de los radicales libres que produce la enzima (Rouquette y cols., 1998). Además, estos autores han demostrado la presencia de la XOR en la cara externa de la membrana celular, en la que muestra una distribución polarizada, de forma que se concentra en la superficie que tiene contacto con células vecinas, lo cual podría favorecer también la transmisión de señales entre células a través de los radicales libres formados por la enzima.

La presencia de la enzima en la superficie externa de la membrana se explica por un mecanismo de secreción no clásico propuesto también para otras proteínas, ya que para secretarse por el mecanismo clásico a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi se necesita la presencia de un péptido señal, del cual carece la XOR (Ichida y cols., 1993) (Xu y cols., 1994), y además, por la vía clásica, la proteína es glicosilada, lo que no se ha demostrado en el caso de la XOR. Rouquette y cols.

explican la presencia extracelular de la enzima mediante un mecanismo de secreción no clásico y posterior unión a glicosaminoglicanos de la superficie celular (Rouquette y cols., 1998).

La unión de la enzima a la superficie celular está respaldada por la demostración tanto de la enzima como de las consecuencias de su actividad en tejidos que originalmente presentan poca actividad XOR, de forma que tras aumentar la liberación de esta enzima en otros órganos, aquellos presentan un incremento de daño producido por la XOR transportada a través de la sangre (Terada y cols., 1992; Terada y cols., 1991), y además son protegidos por inhibidores de la XOR (Gardner y cols., 1983; Grum y cols., 1986; Sarnesto y cols., 1996; Zimmerman y cols., 1988). Así pues, la XOR liberada desde órganos isquémicos es capaz de producir efectos en órganos a distancia, como el pulmón (Weinbroum y cols., 1995). Los niveles plasmáticos de XO aumentan tras la isquemia-reperfusión de la región esplácnica o tras shock hipovolémico, pero si además se administra una perfusión intravenosa de heparina, aún aumenta más (Tan y cols., 1995; Tan y cols., 1993). La concentración de XO unida a la membrana celular o en el espacio intersticial puede aumentar miles de veces, y desde ahí, los productos de la reacción enzimática pueden actuar (Houston y cols., 1999). El hecho de que la unión de la enzima no sea inhibida por suero o albúmina, así como que la cinética de unión sea comparable con la de otras moléculas que se unen específicamente, sugiere al menos que la unión no es inespecífica (Shimada y cols., 1981). Esta unión a la luz vascular es una unión reversible, ya que, tanto en humanos como en modelos de shock hemorrágico en ratas, la administración de heparina provoca el aumento de la cantidad de XO en plasma sin estar este aumento provocado por lesión adicional (Adachi y cols., 1993; Tan y cols., 1993).

La unión de la XO al endotelio se realiza por unión de esta a sitios de unión heterogéneos que incluyen proteoglicanos ricos en condroitín sulfato (Houston y cols., 1999). El desplazamiento de la unión de la XO ante la presencia de heparina se atribuye a la capacidad de ésta para unirse a sitios catiónicos de la XO, compitiendo así la heparina con el condroitín sulfato y otros glicosaminoglicanos (Houston y cols., 1999).

Por otra parte, la unión de la XO a la superficie celular influye en las propiedades catalíticas, en la capacidad de producir agentes oxidantes y en la estabilidad de la propia XOR (Radi y cols., 1997). Un proceso similar sufre la enzima cuando es liberada al plasma, cambiando sus propiedades. La XOR antes de ser liberada por las células, contiene cierta actividad XDH, y al liberarse al plasma se convierte inmediatamente en XO (Kooij y cols., 1994; Tan y cols., 1993). De forma que, tanto la liberación de la enzima a la circulación como la subsiguiente unión a las células promueven la producción de ROS.

Una vez unida a la membrana celular de células endoteliales, la XOR se incorpora al interior celular por endocitosis (Houston y cols., 1999). Además, la XO unida al endotelio va siendo inactivada y liberada, de una forma similar a lo que ocurre con la SOD extracelular y la lipoproteína lipasa (Ohta y cols., 1994; Robinson-White y cols., 1985; Shimada y cols., 1981).

A lo anteriormente citado se suma que el radical superóxido producido por la enzima unida a la superficie celular es resistente a la neutralización por la SOD, viéndose como la capacidad oxidativa de la XO en solución es inhibida completamente por la CuZn-SOD, mientras que si esta enzima antioxidante está unida a la célula, sólo es capaz de neutralizar la capacidad oxidante de la enzima en un 28 %, y en un 17 % si en vez de la CuZn-SOD se trata de la Mn-SOD. En esta faceta la SOD extracelular (EC-SOD) es capaz de neutralizar los productos de la enzima en un 40 %, aunque a mucha menor concentración que las dos anteriores (Houston y cols., 1999). Los autores atribuyen estos hechos a que la CuZn-SOD es repelida por la superficie celular debido a las fuerzas electrostáticas (Barlow y cols., 1966) con lo que los radicales producidos por la XOR unida al endotelio están en un microambiente protegido contra la SOD. Dado que el radical superóxido producido por la XO unida al endotelio reacciona con el óxido nítrico a una tasa 10 veces más rápida que su neutralización por la SOD para dar peroxinitrito, esta reacción dificulta la actuación del óxido nítrico para llevar a cabo la vasodilatación a través del cGMP, y por tanto, puede provocar disfunción vascular.

Por último, citar que además de circular por el plasma de forma libre, la enzima circula también formando inmunocomplejos. De hecho, la actividad XO en

plasma humano es escasamente detectable en condiciones normales (Giler y cols., 1975; Grum y cols., 1987), en parte debido a que la XOR humana forma inmunocomplejos con los anticuerpos IgM, siendo el 3% de estos anti-XOR (Benboubetra y cols., 1997).

1.2.3.1.3. Estructura enzimática.

La xantina oxidoreductasa es el producto de un único gen (Amaya y cols., 1990). En el ratón tiene aproximadamente 70 kilobases con 36 exones. El gen se encuentra en el cromosoma 17 del ratón (Cazzaniga y cols., 1994) y en el cromosoma 2 del ser humano.

La secuencia completa de aminoácidos que componen las distintas xantina óxidoreductasas ha sido deducida mediante secuenciación de sus respectivos cDNAs o genes. Todas están constituidas por dos subunidades idénticas y catalíticamente independientes. Cada subunidad la forman 1333-1358 aminoácidos, y esta estructura enzimática descrita se conserva filogenéticamente sin grandes variaciones, siendo todas las enzimas de distintas especies de la escala filogenética bastante homólogas entre sí. Por ejemplo, la xantina óxidoreductasa de la leche de vaca tiene una identidad del 90% con la xantina óxidoreductasa de hígado humano (Berglund y cols., 1996; Hille y cols., 1995; Ichida y cols., 1993), y la de pollo y *Drosophyla* de un 70% y un 52% respectivamente con las XOR de los mamíferos.

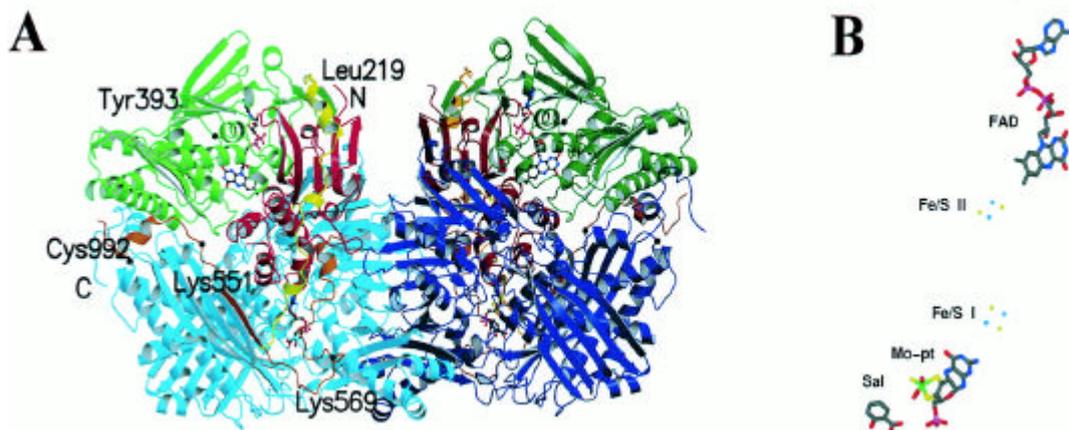
La forma activa de la enzima está compuesta por dos homodímeros (subunidades) y tiene un peso molecular de 290 kd en conjunto. Cada homodímero tiene actuación independiente en la catálisis y contiene un cofactor de molibdopterina, dos centros (2Fe-2S) espectroscópicamente distintos, y un cofactor FAD.

La XOR purificada de leche humana se manifiesta ante una electroforesis en condiciones nativas (sin desnaturar la proteína) como una única banda de 300 kd aproximadamente, sin que aparezca otra banda. Sin embargo, cuando se desnatura la proteína haciendo la electroforesis en SDS-PAGE aparece una banda principal de 143 kd (133-157) aproximadamente, además de algunas bandas menos importantes de 125 (115-138), 87(82-93) y 59 (54-64) kd (Sarnesto y cols., 1996). Si

la preparación de XDH-XO se digiere con tripsina, las bandas de 143 y 125 kd desaparecen, la de 87 kd disminuye su intensidad y aparecen varias bandas de menor intensidad (Sarnesto y cols., 1996)

La xantina óxido-reductasa de leche de vaca muestra una estructura con los dos homodímeros que le dan forma de mariposa, tal como se puede observar en la figura 6. La gran distancia existente entre los átomos de los cofactores de las dos subunidades (más de 50 Å) hace poco probable que haya transferencia de electrones entre ellos durante la catálisis (Enroth y cols., 2000; Hille y cols., 1995).

Figura 6. Representación tridimensional de la estructura de la XOR.



Cada monómero está formado por tres dominios (Enroth y cols., 2000):

- El dominio correspondiente al fragmento N-terminal (residuos 1-165) de 20 kd que contiene dos grupos Fe/S.
- El dominio correspondiente al fragmento central (residuos 266-531) de 40 kd es el que contiene el cofactor FAD.
- El dominio correspondiente al fragmento C-terminal (residuos 590-1332) de 85 kd es el que contiene el cofactor de Molibdo-pterina.

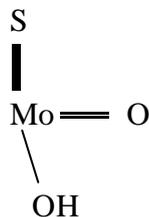
El dominio correspondiente al fragmento N-terminal contiene dos grupos Fe/S distintos, entre otros aspectos, en cuanto a su potencial redox. El residuo 43 de cisteína es el ligando de uno de los átomos de hierro, y si es sustituido por serina

cambia el potencial redox del grupo Fe/S. Una mutación similar en el residuo 51 de cisteína, el ligando del átomo Fe del otro grupo Fe/S no provoca cambios en el potencial redox (Iwasaki y cols., 2000). La disposición geométrica y los potenciales de oxidación-reducción de estos grupos Fe/S y el del cofactor de molibdopterina indican que los electrones se transfieren desde el Molibdeno a los dos grupos Fe/S mediante un proceso termodinámicamente favorable. Como las distancias entre los centros y el cofactor de molibdopterina son menores de 14 Å, el mecanismo más probable por el que se transportan los electrones es el “tunneling” (Page y cols., 1999).

El dominio FAD presenta una profunda hendidura donde se localiza el FAD, en la que queda aún suficiente espacio para albergar una molécula de NAD (Enroth y cols., 2000).

En el dominio de Molibdo-pterina, el Molibdeno está unido a la cadena de aminoácidos mediante un doble enlace a un átomo de azufre, un doble enlace a un átomo de oxígeno y un enlace simple a un átomo de oxígeno (Hille, 1996). Este oxígeno unido mediante un simple enlace es el que debe ser transferido al sustrato durante la catálisis, para ser repuesto posteriormente del agua (Xia y cols., 1999). En las enzimas en que el átomo de azufre unido mediante enlace covalente al átomo de molibdeno es sustituido por un átomo de oxígeno, el cofactor Molibdo-pterina es inactivo.

Figura 7. Representación gráfica de los enlaces del átomo de molibdeno.



Este dominio es el dominio con el que interacciona la xantina en la reacción de catálisis (Enroth y cols., 2000), donde actúa el alopurinol para inhibir la enzima [Massey, 1970 #94], y donde se une el nitrito para formar óxido nítrico.

Por otra parte, y dado que la XOR ha sido considerada por algunos autores como una fosfoproteína, es de destacar en cuanto a su estructura que posee dos grupos fosfato en el sitio FAD y uno en el sitio de Molibdopterina (Davis y cols., 1984; Edmonson y cols., 1984; Schieber y cols., 1993). Estos grupos fosfato pueden estar implicados en la regulación de la actividad enzimática.

1.2.3.1.4. Conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa.

Ambas formas enzimáticas, la XDH y la XO, son el producto del mismo gen, tienen un tamaño similar, el mismo n° de subunidades y requieren los mismos cofactores (Hille y cols., 1995).

Así como la Xantina Oxidasa se relaciona con diversos procesos patológicos y produce un daño oxidativo a los tejidos, la Xantina Deshidrogenasa puede ser un importante componente de la defensa del organismo contra el daño provocado por las ROS a través de la acción antioxidante del ácido úrico, que es un potente antioxidante (Becker, 1993).

La enzima, *in vivo*, está mayoritariamente en la forma deshidrogenasa, y esta enzima puede transformarse en la forma oxidasa en ciertas condiciones (Stirpe y cols., 1969):

1. proteolisis.
2. calentamiento a 37 °C.
3. almacenamiento a -20 °C.
4. anaerobiosis.
5. algunos solventes orgánicos.
6. incubación con fracciones subcelulares.
7. reactivos sulfidrilo.

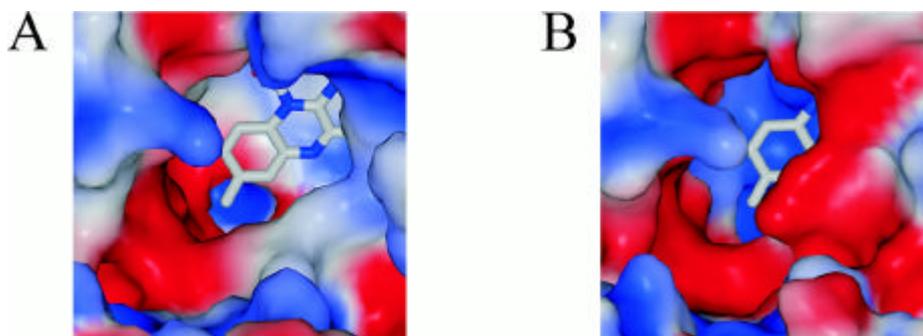
Della Corte y Stirpe propusieron que la enzima también existe en una forma mixta que es capaz de utilizar tanto el NAD⁺ como el oxígeno como aceptores de electrones (Della Corte y cols., 1972). Además, inmunológicamente Waud y

Rajagopalan indicaron que existen dos formas diferentes de xantina oxidasa O, una que deriva de la deshidrogenasa D y otra similar, pero no derivada de esta última (Waud y cols., 1976). Lo cierto es que la XDH puede convertirse en XO, bien a través de un proceso reversible o bien a través de un proceso irreversible.

La conversión de XDH a XO de forma reversible se lleva a cabo mediante calentamiento o mediante oxidación de los grupos tiol de los residuos de cisteína para formar puentes disulfuro (Stirpe y cols., 1969; Waud y cols., 1976).

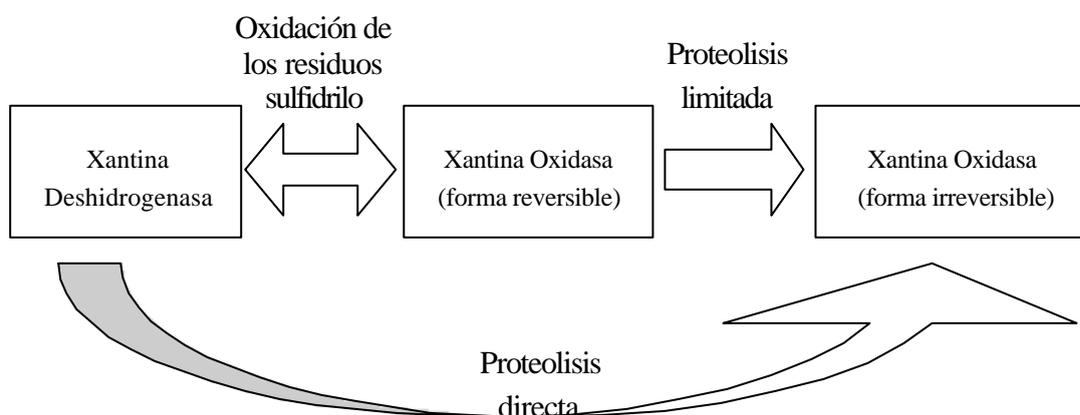
Cuando la conversión de la Xantina Deshidrogenasa en Xantina Oxidasa es por oxidación se acompaña de la oxidación de ciertos residuos de cisteína (Waud y cols., 1976). Rasmussen y cols. vieron que se modifican 6 de los 38 residuos encontrados: los residuos 169, 170, 535, 992, 1371 y 1325, de los cuales el 535 y el 992 sugieren que son los candidatos más firmes, mientras que otros residuos cisteína se localizan demasiado lejos de los cofactores (Nishino y cols., 1997; Rasmussen y cols., 2000). Además de la oxidación de dichos residuos aminoácidos, la conversión también se acompaña de pérdida de afinidad por el NAD^+ (Hille y cols., 1995), alteración de las propiedades redox y de la cinética enzimática (Hunt y cols., 1992; Saito y cols., 1989) y cambios conformacionales en el sitio de unión del FAD (Massey y cols., 1989; Saito y cols., 1989), tal como se puede apreciar en la figura 8.

Figura 8. Representación del cambio conformacional en el sitio FAD en la XDH cuando se convierte en XO.



Por otro lado, la conversión de la enzima de forma irreversible se produce por proteólisis (Amaya y cols., 1990; Stirpe y cols., 1969; Waud y cols., 1976), la cual, llevada a cabo con tripsina corta la enzima tras el residuo de lisina 551, o si se lleva a cabo con pancreatina corta la enzima tras los residuos leucina 219 y lisina 569 (Enroth y cols., 2000). Se ha observado que la quimotripsina corta la cadena proteica de la enzima tras el residuo de fenilalanina 560 sólo cuando se encuentra en la forma oxidasa, mientras que en otros puntos de la proteína corta por igual la forma deshidrogenasa que la oxidasa. Esto sugiere que la conversión de una a otra implica cambios estructurales y conformacionales globales que sacan a la superficie algunos residuos que en la forma deshidrogenasa no eran accesibles a la quimotripsina (McManaman y cols., 2002) y apoya las consideraciones de McKelvey y cols. cuando afirman que la transformación de xantina oxidasa de hígado y riñón de rata a su forma deshidrogenasa reversible precede la formación de ésta de forma irreversible (McKelvey y cols., 1988). Asimismo establecen estos mismos autores que la conversión a xantina oxidasa reversible viene precedida por la depleción de GSH (McKelvey y cols., 1988). El citado residuo de fenilalanina 560 parece estar situado cerca del límite del dominio FAD y del de molibdopterina, pudiendo ocurrir que la formación de puentes disulfuro en los residuos de cisteína provoque cambios conformacionales que afecten el sitio de unión del FAD (McManaman y cols., 2002).

Figura 9. Vías de conversión de la XDH en XO.



A pesar de estas diferencias entre la Xantina Deshidrogenasa y la Xantina Oxidasa, no se observan cambios significativos en los dos centros Fe/S o en su proximidad, ni tampoco en el centro de Molibdopterina, lo cual se ha corroborado a nivel cinético, no encontrando diferencias en la unión y catálisis a nivel de este último centro al comparar la XDH con la XO (Enroth y cols., 2000). El sitio de unión al FAD es la parte de la enzima que muestra mayores diferencias cuando se comparan las dos formas de la enzima. Los cambios conformacionales que se producen provocan cambios electrostáticos en el entorno del FAD. Sin embargo, el FAD no cambia estructuralmente en la conversión de Xantina Deshidrogenasa a Xantina Oxidasa y simplemente sufre un ligero desplazamiento. El cambio estructural del entorno bloquea el acceso del NAD^+ a su sitio de unión, reduciendo considerablemente el poder reductor del par FAD/FADH₂.

Se ha asumido durante largo tiempo que algunos procesos en los que interviene la xantina óxidoreductasa, como los procesos de isquemia-reperfusión se acompañan de conversión *in vivo* de la forma deshidrogenasa a la forma oxidasa (Battelli y cols., 1992; Brass y cols., 1991; Engerson y cols., 1987; Granger y cols., 1981; McKelvey y cols., 1988; Parks y cols., 1988). Sin embargo, otros autores entienden que la conversión *in vivo* no tiene especial relevancia, sino que es, en gran parte, un artefacto producido *in vitro* mientras se realizan los homogenados (Frederiks y cols., 1996; Kooij y cols., 1994).

1.2.3.1.5. Procesos en los que tiene una participación relevante.

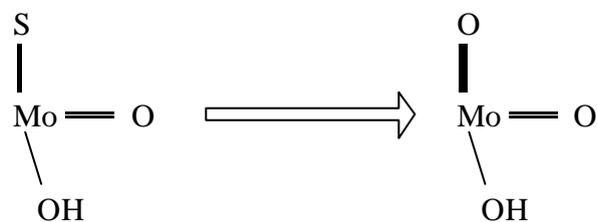
Derivado de la capacidad de la forma oxidasa de la enzima para generar especies reactivas del oxígeno, la xantina óxidoreductasa ha sido estudiada como mecanismo patofisiológico en el daño tisular por isquemia-reperfusión, infarto de miocardio, hipertensión, aterosclerosis (Grace, 1994; Jeroudi y cols., 1994; Schwartz y cols., 1993), arteriosclerosis hipercolesterolémica (Granger, 1994; White y cols., 1996), fallo renal (Paller y cols., 1991), daño endotelial provocado por lipopolisacárido (Rinaldo y cols., 1990), neumonía de origen viral (Akaike y cols., 1990), sepsis (Galley y cols., 1996), fotosensibilidad cutánea a hematóporfirinas

(Athar y cols., 1989), hepatitis, síndrome de distrés respiratorio del adulto (Grum y cols., 1991) (Quinlan y cols., 1997), edema pulmonar (Jackson y cols., 1989) y pancreatitis aguda (Gómez-Cambronero y cols., 2002; Lankisch y cols., 1989).

1.2.3.1.6. Regulación de la expresión y de la actividad enzimática.

No toda la XOR existente en el organismo está en la misma forma, sino que existe una forma activa de la enzima y una forma inactiva. Esta última no tiene actividad catalítica debido al no funcionamiento del sitio molibdeno. Puede ser por dos razones, por deficiencia en el átomo de molibdeno (demolibdo-XOR) o por deficiencia del grupo Mo=S, que es sustituido por un grupo Mo=O (desulfo-XOR) (Bray y cols., 1999; Godber y cols., 1997). La presencia de estas formas inactivas de la enzima aún no se ha aclarado, pero se sabe que por ejemplo en los hepatocitos de rata la forma desulfo es muy abundante (Ikegami y cols., 1986).

Figura 10. Representación gráfica de los centros molibdeno de la XOR y la forma desulfo-XOR



Los inhibidores por excelencia de la XOR son el alopurinol o el oxipurinol (aloxantina) [Massey , 1970 #94; Moorhouse, 1987 #219]. El alopurinol actúa como un agente reductor, oxidándose el mismo a oxipurinol, el cual se une fuertemente a la enzima reducida. Se utilizan también el amflutizol (Werns y cols., 1991) o el BOF-4272 (Okamoto y cols., 1995). Es efectivo asimismo para inactivar la enzima el pretratamiento con tungsteno (Johnson y cols., 1974); (Terada y cols., 1992). Todas estas sustancias inhiben la actividad de la enzima uniéndose al sitio molibdeno, donde se unen la xantina, la hipoxantina, y también el nitrito, con lo cual inhibe las

reacciones de la enzima en las que participan dichos sustratos. Estos inhibidores modifican el sitio molibdeno, oxidándolo, de forma que la enzima pasa a estar en su forma desulfo, que es inactiva para las reacciones citadas arriba, y esta situación se puede revertir sulfurando la enzima (Godber y cols., 2000; Ichimori y cols., 1999). La actividad NADH oxidasa no es inhibida por estas moléculas, tampoco por el óxido nítrico, ya que en esta reacción el NADH se une al sitio FAD, que no se ve afectado por los citados inhibidores.

Hay un inhibidor inespecífico, el DPI (difeniliodonio), que inactiva el sitio FAD de la XOR, al igual que de otras flavoenzimas, como la NAD(P)H oxidasa. Este inhibidor sí es capaz de inhibir la actividad NADH oxidasa que presenta la XOR.

El ayuno de 24 horas, así como una dieta hipoproteica, disminuyen la actividad enzimática total en hígado de rata, sin que este efecto sea debido a un aumento de la degradación de la proteína, sino a una inactivación post-traducciona (Frederiks y cols., 1996).

Un factor que consideramos importante en la regulación de la actividad enzimática es la hipoxia, habiéndose demostrado que ésta provoca un aumento de la actividad de la XOR (Hassoun y cols., 1994; Kayyali y cols., 2001; Poss y cols., 1996; Terada y cols., 1997), así como un aumento en la expresión del mRNA (Hassoun y cols., 1994; Terada y cols., 1997) y de la expresión de la proteína *in vivo* (Hassoun y cols., 1998) e *in vitro* (Terada y cols., 1997). La producción de NO catalizada por la XO disminuye a medida que la concentración de oxígeno aumenta (Godber y cols., 2000).

Aunque la xantina es el sustrato reductor más efectivo en la formación de NO por la XO (en comparación con el NADH), altas concentraciones de xantina provocan inhibición de la reacción mediada por sustrato (Li y cols., 2001). También el producto de la reacción puede regular la actividad enzimática. Así, el NO reacciona con el átomo de azufre del centro molibdeno y también provoca la inactivación de la enzima al convertirla en su forma desulfo, aunque el mecanismo no está del todo claro. Sin embargo, el NO en condiciones aeróbicas inhibe sólo a la XDH y escasamente a la XO. Este hecho sugiere que en situaciones de reoxigenación, sólo la XDH se verá inhibida, no siendo inhibida la XO (Ichimori y cols., 1999).

El pH también influye en la regulación de la actividad de la XO en la reducción de nitrito para formar NO, de forma que en condiciones ácidas, aumenta la formación de NO y en condiciones alcalinas se inhibe, con cualquiera de los sustratos reductores (xantina, NADH) y en condiciones anaeróbicas (Li y cols., 2001).

Otro factor importante que regula la XOR es el hierro. Este metal aumenta la actividad total xantina óxidoreductasa, sin alterar el porcentaje de actividad de la XO con respecto a la actividad total XOR. Esta regulación está controlada a nivel transcripcional, dado que el aumento de hierro en el tejido pulmonar provoca, además del aumento de la actividad enzimática, el aumento rápido de la cantidad de enzima (Ghio y cols., 2002). El mecanismo a través del cual actúa no se conoce. Los citados autores especulan con que la reacción del hierro con el urato hace que éste último no actúe inhibiendo la enzima, lo cual explicaría el aumento de la actividad, pero no el aumento de la cantidad de proteína. Así pues, los quelantes del hierro provocan indirectamente una inhibición de la xantina óxidoreductasa.

Por último, es de destacar que la actividad enzimática pueda ser modulada por fosforilación y que las kinasas implicadas, como la p38 kinasa, estén implicadas en el proceso de inflamación sugiere que la XOR juega un papel en la reacción inflamatoria. Además de la p38 kinasa, que es una MAP kinasa que se activa ante ciertos estímulos de estrés, también se ha visto que en la fosforilación de la XOR está implicada otra kinasa, la CK2 (caseína kinasa II) (Kayyali y cols., 2001). Esta es una proteína kinasa que juega un papel importante en la regulación de la replicación del DNA y en la transcripción así como en la regulación del crecimiento celular y del metabolismo. La p38 kinasa por sí sola no es capaz de fosforilar la XOR, habiéndose especulado que el posible mecanismo de actuación es la interacción directa de la p38 kinasa con la CK2 (Kayyali y cols., 2001).

No debemos olvidar, en relación con lo anterior, que la actividad xantina óxidoreductasa es inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón- α (IFN- α), la interleucina-1 (IL-1) y la interleucina-6 (IL-6), un patrón similar al de la respuesta de fase aguda. Estos mediadores aumentan la transcripción de RNA mensajero para xantina óxidoreductasa (Pfeffer y cols., 1994). Ghio y cols. sugieren

la existencia de una proteína represora de vida media corta o una proteína lábil con actividad RNAsa (Ghio y cols., 2002).

1.3. CONSECUENCIAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO: DEL DAÑO OXIDATIVO A LA TRANSMISIÓN DE SEÑALES.

Actualmente, en la comunidad científica está ampliamente aceptado que los radicales libres participan en muchos procesos biológicos, en algunos de ellos con un papel decisivo. En los seres vivos, la presencia de radicales libres es algo muy natural. Sin embargo, no es importante sólo la existencia o no de estos radicales libres como un aspecto meramente cualitativo, sino que es de especial importancia la cantidad de estos radicales libres. Por ello, debemos destacar que una cantidad excesiva de alguna especie concreta de radicales puede ser perjudicial para un determinado sistema biológico, mientras que, por otra parte, hay situaciones en las que una cantidad insuficiente de radicales libres es también indeseable.

Los radicales libres están implicados en numerosos procesos degenerativos, que incluyen el envejecimiento, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, enfermedades neurológicas, procesos irritativos de la piel, e inflamaciones. Asimismo las lesiones por isquemia-reperfusión, se caracterizan también por la formación de radicales libres.

Realmente, cualquier parte del metabolismo que englobe reacciones de tipo redox es, *per se*, una posible fuente de producción continua de radicales libres. Esto, permite extrapolar la conclusión de que cualquier situación de estrés, entre las cuales se incluye la realización de ejercicio físico, implica la posibilidad de una excesiva producción de radicales libres, con todas las consecuencias químicas asociadas que este exceso puede conllevar.

La acción de los radicales libres viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la vecindad de donde se produce el radical. Asimismo, no podemos dejar de citar en esta introducción, que la acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del radical libre es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, los cuales son difícilmente demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los radicales libres, pero las reacciones de los radicales libres provocan unos productos cuyo efecto es acumulativo.

Todo lo anterior explica que los organismos posean unos mecanismos de defensa contra los radicales libres, los antioxidantes, sustancias que son capaces de retrasar o inhibir la oxidación de sustratos oxidables. El balance entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará finalmente el estado redox, determinando una “homeostasis redox” o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación-reducción.

Finalmente, el desequilibrio de este estado redox tiene unas consecuencias bioquímicas de forma que altera ciertas vías de transmisión de señales cuya consecuencia es la activación de mecanismos compensatorios para restablecer la “homeostasis redox”.

1.3.1. Acciones de los radicales libres sobre las macromoléculas.

1.3.1.1. Acciones sobre los glúcidos.

Los radicales libres atacan a los glúcidos de forma variable. Los mono y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Sin embargo, los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel y cols., 1988). El ácido hialurónico es atacado y fragmentado por el radical superóxido. Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (McCord, 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald y cols., 1980).

Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo con la diabetes mellitus, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas. Se postula que una anormal regulación en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición colabora en el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo (Oberley, 1988; Wolff y cols., 1987; Wolff, 1993).

1.3.1.2. Acciones sobre los lípidos.

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Cross, 1987), provocando su peroxidación y produciéndose en las membranas de las que forman parte una pérdida de flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana.

Esta reacción puede iniciarla el radical hidroxilo, el radical hidroperoxilo y quizá el oxígeno singlete, pero no el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno, que son menos reactivos. El radical libre extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena del ácido graso, dejando un electrón no apareado, con lo cual se genera un radical lipídico. Este radical lipídico rápidamente sufre un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular produciendo un radical hidroperoxilo. Este radical puede a su vez extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperoxido lipídico. El radical lipídico entonces se combina con otra molécula de oxígeno y continua la reacción en cadena.

Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, incluyendo el malondialdehído (MDA). Esos productos de degradación pueden difundir lejos de su lugar de producción y producir edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Asimismo, ellos pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos.

El malondialdehído, a su vez, puede reaccionar con lípidos y proteínas durante la peroxidación lipídica para formar bases de Schiff conjugadas, productos fluorescentes insolubles que se acumulan en el interior de los lisosomas, formando el pigmento de envejecimiento conocido con el nombre de lipofucsina (reconocido marcador morfológico de envejecimiento ya que se acumula en los tejidos con la edad) (Sohal y cols., 1989).

Existen varias técnicas experimentales para el estudio de la peroxidación lipídica:

1. Visualización de lipofucsina en los depósitos tisulares, especialmente en corazón y cerebro.
2. Cromatografía de gases de etano, pentano y otros alcanos exhalados por el aliento.
3. 4-hidroxiakenales (4-HNE).
4. Cuantificación de malondialdehído, el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un aducto MDA (TBA₂) susceptible de ser medido espectrofotométricamente y analizarse por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El MDA es un producto final obtenido de la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos y está considerado como un buen marcador del daño oxidativo en las membranas biológicas (Wong y cols., 1987).
5. Medida de hidroperóxidos de fosfolípidos por detección quimioluminiscente postcolumna, tras separación mediante HPLC (Cadenas y cols., 1996; Miyazawa y cols., 1994).

1.3.1.3. Acciones sobre las proteínas.

La acción de los radicales libres sobre las proteínas se ejerce sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol (-SH). De esta forma, proteínas ricas en determinados aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína) pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales. El triptófano, tirosina, histidina y cisteína son particularmente sensibles a los ROS (Davies y cols., 1987; Davies y cols., 1987; Stadtman, 1993). Los grupos sulfhidrilo (-SH) pueden ser transformados en puentes disulfuro (S=S), produciéndose la inactivación enzimática (si la proteína es una enzima). En otros casos, en los que las proteínas son estructurales, como el colágeno, las fibrillas se pueden romper por el radical superóxido e hidroperóxido, proceso que puede constituir el punto de partida para la acción de proteasas y facilitar la pérdida de estructura de la triple hélice del colágeno (Cross, 1987).

Muchos estudios, entre los que destacan los liderados por el grupo de Stadtman, han llegado a la conclusión de que el H_2O_2 y las formas reducidas del hierro y el cobre, generados por oxidasas de función mixta, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo radicales libres que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. Este proceso se considera por tanto, específico del sitio de unión del metal. En muchas enzimas, este sitio de unión de metales puede ser el centro activo. Como consecuencia se forman grupos carbonilo, o se producen conversiones de unos aminoácidos en otros. Los grupos carbonilo aparecen en varios sistemas de oxidación *in vitro*, como los relacionados con el citocromo P_{450} , los sistemas metal/ascorbato, o los que utilizan xantina oxidasa (Smith y cols., 1991).

En el caso de las hemoproteínas, como la oxihemoglobina, el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar con el hierro para formar metahemoglobina y otros productos de oxidación. Otra importante hemoproteína, la catalasa, es inhibida por el radical superóxido.

En presencia de ciertas peroxidasas con grupo hemo, el peróxido de hidrógeno es capaz de oxidar halogenuros como el ion cloruro, dando ácido hipocloroso, compuesto extremadamente tóxico para las bacterias, virus y células. El ácido hipocloroso puede reaccionar con aminas, dando lugar a las cloraminas, más lipofílicas y las probables responsables directas de la toxicidad celular. Un mecanismo semejante lo produce el peróxido de hidrógeno con el ion SCN^- (tiocianato), dando lugar a $SCNO^-$ (oxitiocianato), un potente bactericida.

El peróxido de hidrógeno, producto de la dismutación del radical superóxido puede inhibir la superóxido dismutasa (SOD) citosólica (forma cobre-zinc). El efecto de los radicales libres sobre una determinada proteína depende de su composición en aminoácidos, de la importancia y localización de los aminoácidos que median la conformación y actividad de la proteína, así como de la posibilidad de reparación de la lesión (Freeman y cols., 1982; Fridovich, 1978; Romero-Alvira y cols., 1987).

El grupo de Davies demostró que la oxidación de las proteínas por radicales hidroxilo provocaba la rápida desnaturalización de la proteína y un aumento de su hidrofobicidad, que se seguía de la degradación de la proteína (Davies y cols., 1987).

El proceso dependía de la magnitud de la desnaturalización y de la hidrofobicidad, la cual parece ser la principal señal para el inicio de la proteólisis (Davies, 1993). Una leve modificación oxidativa de la proteína provocaba un incremento lineal de la desnaturalización y hidrofobicidad. Sin embargo, una oxidación más intensa (generalmente en ausencia de oxígeno) provocaba la estabilización de las proteínas, debido a puentes cruzados tanto intra como intermoleculares, lo cual previene la desnaturalización (Davies, 1993).

1.3.1.4. Acciones sobre los ácidos nucleicos.

Los radicales libres pueden reaccionar con todos los componentes del DNA. En presencia de oxígeno, se forman radicales peroxilo por adición de oxígeno a las bases o al azúcar del DNA. Las reacciones posteriores de los radicales formados en el DNA dan lugar a un gran número de productos. También se forman puentes cruzados DNA-proteína. Muchos de estos productos encontrados “in vitro”, también aparecen en el DNA de tejidos animales tras el tratamiento con sustancias que estimulan la generación de radicales libres. Según estudios realizados por Ames y cols., el daño oxidativo al DNA y la mutagénesis son dos causas importantes del cáncer (Ames y cols., 1993).

El número de productos del ataque a las bases del DNA por radicales libres supera la veintena. Uno de los primeros en valorarse por HPLC con detección ultravioleta fue la timina glicol. La baja sensibilidad de este tipo de detección ha dado lugar en los últimos años a la valoración de gran número de productos por cromatografía de gases-espectrometría de masas, o de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) por HPLC con detección electroquímica.

La 8-OHdG es la alteración que se observa con más frecuencia, y su importancia reside en su alto efecto mutagénico, ya que la 8-OHdG durante la replicación del DNA, se empareja con adenina en vez de hacerlo con citosina (Kasai y cols., 1984; Shibutani y cols., 1991)

Al menos en el caso del DNA nuclear se cree que el hierro juega un papel importante en el daño oxidativo. Si el peróxido de hidrógeno llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando el radical hidroxilo, que ataca en ese

mismo lugar al azúcar o a la base, produciendo roturas de la hebra y modificaciones en las bases. Estas lesiones pueden dar lugar a mutaciones y a fenómenos carcinogénicos (Simic, 1994).

El daño oxidativo al DNA mitocondrial es unas 15 veces superior al del DNA nuclear (Richter y cols., 1988). Esto se debe, sobretodo, a la cercanía de dicho DNA al lugar principal de generación de radicales libres en la célula sana, la cadena de transporte electrónico mitocondrial. También se debe a que este DNA carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo, y su capacidad de reparación es mínima en relación con la del DNA nuclear. Como consecuencia de todo esto, las deleciones y mutaciones del DNA mitocondrial también son mayores que en el DNA nuclear.

Las mitocondrias de animales viejos liberan radicales libres. Las ratas viejas poseen alrededor de 66.000 lesiones oxidativas en su DNA por célula. La oxidación del DNA es debida a que las defensas antioxidantes no son perfectas. Estas defensas antioxidantes incluyen vitaminas C y E y carotenoides procedentes de frutas y vegetales de la dieta. Una disminución de su ingesta aumenta el grado de oxidación del DNA, y por lo tanto el riesgo de cáncer (Ames y cols., 1997).

El número de modificaciones en la molécula de DNA producidas diariamente es bastante significativo. En general, se ha estimado entre 10^4 - 10^5 alteraciones de DNA por día y célula (Fraga y cols., 1990). Las bases alteradas son sustituidas por las correctas por diferentes sistemas intracelulares de reparación del DNA y después eliminadas extracelularmente (Sancar, 1990). Por lo tanto, las alteraciones del DNA se pueden determinar, bien midiendo la presencia de bases modificadas y excretadas por la célula en sangre y orina, o bien extrayendo el DNA del tejido y midiendo directamente su contenido en bases alteradas (Aruoma y cols., 1987; Shigenaga y cols., 1989).

1.3.2. Estrategias celulares contra los radicales libres. Sistemas antioxidantes.

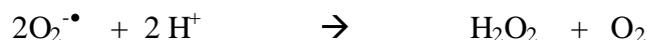
Una sustancia antioxidante es aquella que, a concentraciones relativamente bajas, es capaz de competir con otros sustratos oxidables y, por tanto, retrasar o inhibir la oxidación de dichos sustratos (Halliwell y cols., 1989). En esta definición se engloban tanto los antioxidantes enzimáticos como los no enzimáticos. No obstante, también hemos de decir que existen sustancias que tienen poca actividad específica antioxidante, pero que, a altas concentraciones, contribuyen significativamente al potencial antioxidante de una célula o sistema. Ejemplos de este último caso son los aminoácidos, péptidos y proteínas.

1.3.2.1. Antioxidantes enzimáticos.

Las células disponen de enzimas específicas para la neutralización de diversas especies reactivas, como son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). No obstante las óxidoreductasas de grupos tioles y disulfuros, como la tioredoxina y la glutaredoxina, están adquiriendo importancia en la prevención del estrés oxidativo celular.

1.3.2.1.1. Superóxido dismutasa (SOD).

La primera defensa contra el radical superóxido es la SOD, la cual lo transforma en agua oxigenada.

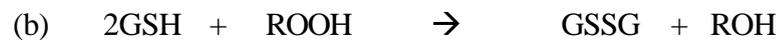


En el ser humano y otros mamíferos existen tres isoenzimas, la CuZn-SOD, la Mn-SOD y la ecSOD. La primera se localiza en el citosol, mientras que la segunda se ubica en la matriz mitocondrial (Grisham y cols., 1986; Halliwell y cols., 1989; Ohno y cols., 1994), y la tercera, que también es una CuZn-SOD, es extracelular (Strålin y cols., 1995). En el ser humano la CuZn-SOD es un dímero de un peso molecular de 32 kDa y la Mn-SOD es un tetrámero con un peso de 88 kDa (Ohno y cols., 1994). La concentración intracelular de SOD es de 4-10 μM mientras que la

intramitocondrial es de 20 μM aunque varía según los tejidos. Por ejemplo en el músculo esquelético el 15-35 % de la actividad total SOD está en la mitocondria, mientras que el restante 65-85 % en el citosol (Ji y cols., 1988). Además, los músculos con mayor metabolismo oxidativo (con alto porcentaje de fibras lentas) tienen mayor actividad SOD total que los músculos con baja capacidad oxidativa (con alto porcentaje de fibras rápidas). La ecSOD supone de 1/3 a 1/2 de la actividad SOD en el endotelio (Strålin y cols., 1995).

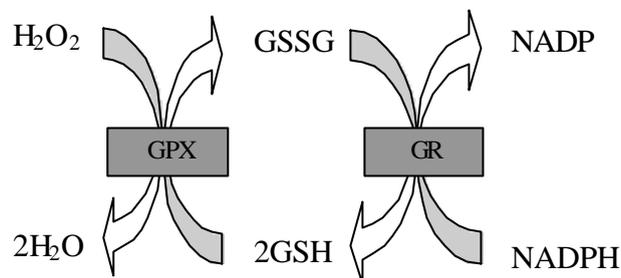
1.3.2.1.2. Glutación peroxidasa.

Esta enzima reduce el agua oxigenada o el hidroperóxido orgánico a agua y alcohol respectivamente, y para ello utiliza en ambos casos el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones (Halliwell y cols., 1989):



La GPX es una enzima selenio dependiente muy específica para el GSH pero sin embargo poco específica para los hidroperóxidos. Esto, junto al hecho de que la GPX se ubique tanto en el citosol como en la mitocondria, como en la membrana celular, la hace ser un mecanismo de protección celular importante contra el daño oxidativo producido a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Ji, 1995). Su concentración varía según los tejidos. En el músculo esquelético por ejemplo, el 45 % de su actividad es citosólica y el 55 % es mitocondrial, y además, las fibras lentas presentan mayor actividad GPX que las rápidas (Ji y cols., 1988; Powers y cols., 1994).

La GPX necesita GSH para poder realizar su función, oxidándolo a glutatión oxidado (GSSG). Por ello, las células disponen de una vía capaz de regenerar este GSH. Esta vía es catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR), la cual consume NADPH para regenerar el GSH.

Figura 11. Ciclo de oxidación-reducción del glutatión.

En muchos tejidos el NADPH es producido en grandes cantidades por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En el músculo esquelético además, el NADPH es producido fundamentalmente por la isocitrato deshidrogenasa.

La GR tiene una distribución celular similar a la de la GPX. Por tanto, aunque la GR no se considera una enzima antioxidante, hay que reconocer que su función es esencial para el buen funcionamiento de la GPX.

1.3.2.1.3. Catalasa.

La catalasa es un tetrámero de un peso molecular de 240 kDa con un cofactor férrico (Fe^{3+}) que debe estar unido al sitio activo de la enzima (Halliwell y cols., 1989). Su función es la descomposición del agua oxigenada tal y como se muestra en la siguiente reacción:



Aunque realiza la misma función que la GPX, ésta última tiene mayor afinidad por el H_2O_2 , es decir, a bajas concentraciones, la GPX juega un papel más importante que la catalasa.

La catalasa se distribuye en toda la célula, aunque se encuentra en grandes concentraciones en los peroxisomas y en las mitocondrias (Halliwell y cols., 1989), y

al igual que la SOD y la GPX, abunda más en los músculos lentos que en los rápidos (Powers y cols., 1994).

1.3.2.1.4. Tioredoxina.

El sistema antioxidante de tioredoxina está compuesto por tres proteínas: la tioredoxina, la tioredoxina reductasa y la tioredoxina peroxidasa.

La tioredoxina es una óxidoreductasa que cataliza la reducción de puentes disulfuro, con lo que juega un papel importante en la regulación del estado redox de los tioles de las proteínas (Sen, 1998).

La tioredoxina posee una secuencia de aminoácidos en el sitio catalítico que incluye dos residuos de cisteína. Éstos pueden ser oxidados reversiblemente formando un puente disulfuro, el cual puede ser a su vez reducido por la tioredoxina reductasa en presencia de NADPH (Pfeifer y cols., 1986). De esta forma, la tioredoxina interviene en la reparación de proteínas con grupos sulfhidrilo (Holmgren, 1989; Starke y cols., 1997). En concreto, el sistema de la tioredoxina está implicado en la prevención de la oxidación y/o reparación de algunas enzimas metabólicas como la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, la fosfofructokinasa, la fosfoglicerato kinasa y la piruvato kinasa (Starke y cols., 1997).

La tioredoxina reductasa es capaz además de regenerar el ascorbato, el cuales un antioxidante no enzimático de gran importancia (May y cols., 1997).

Por su parte, la tioredoxina peroxidasa es una enzima citosólica capaz de transformar el H_2O_2 y los alquilhidroperóxidos en agua y alcohol (Netto y cols., 1996), así como de limpiar los radicales tiolo de las células.

1.3.2.1.5. Glutaredoxina.

La glutaredoxina, al igual que la tioredoxina es una óxidoreductasa implicada en la protección y reparación de los tioles proteicos y no proteicos (Holmgren, 1989; Starke y cols., 1997). La glutaredoxina forma un ciclo con el glutatión y la glutatión reductasa.

Además, se ha especulado la posibilidad de que el glutatión oxidado sea reducido también por la glutaredoxina (Starke y cols., 1997).

Aunque la glutaredoxina y la tioredoxina parecen tener una misma función, parece ser que la afinidad por distintos sustratos es diferente, de forma que ambas se complementan en la reparación de los tioles de proteínas y de tioles no proteicos (Starke y cols., 1997; Yoskitake y cols., 1994).

1.3.2.2. Antioxidantes no enzimáticos.

1.3.2.2.1. Glutación.

El glutatión reducido (GSH) es la fuente más abundante de tioles no proteicos en las células (más del 90%) (Meister y cols., 1983). El GSH es el tripéptido γ -glutamil-cisteinil-glicina. Esta molécula tiene dos características fundamentales: la presencia de un grupo tiol en la cisteína, y la presencia del enlace γ -peptídico que lo hace resistente a las peptidasas presentes en la célula, las cuales solo actúan sobre los enlaces α -amino-acilo. Este enlace γ -glutamilo entre el glutamato y la cisteína sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamil transpeptidas (GGT), presente en la membrana plasmática.

El contenido de GSH en los distintos tejidos varía dependiendo de la función del tejido. Es de interés conocer que las fibras musculares oxidativas contienen una concentración de GSH 6 veces mayor que la fibras musculares rápidas (Ji, 1995).

Dado que es un tripéptido, tras su ingesta es degradado en el intestino delgado, por lo que su contenido en la dieta no influye en los niveles celulares de GSH.

La síntesis y degradación del GSH forma el ciclo del γ -glutamilo. El GSH es sintetizado en el hígado por la acción de dos enzimas, γ -glutamil cisteína sintetasa y la glutatión sintetasa (Meister y cols., 1983).

La γ -glutamil cisteína sintetasa cataliza la siguiente reacción:



Para llevar a cabo la reacción, la γ -glutamil sintetasa requiere la presencia de iones Mg^{2+} , es la etapa limitante en la síntesis de GSH y es inhibida por el glutatión mediante un mecanismo de retroalimentación negativo. La cisteína es el sustrato

limitante de la reacción de síntesis del GSH, de forma que aumentando la disponibilidad de cisteína mediante la administración de N-acetilcisteína se aumenta la concentración intracelular de GSH (Anderson, 1997).

La glutatión sintetasa cataliza el siguiente paso:



Para llevarse a cabo esta reacción se requieren iones K^+ .

El GSH, una vez sintetizado, se transporta a los tejidos a través de la sangre.

La degradación del GSH tiene lugar fuera de la célula y es llevada a cabo por la α -glutamil transpeptidasa y por las dipeptidasas, las cuales están unidas a la superficie externa de la membrana celular. Los sustratos para la degradación pueden ser tanto el GSH, como el GSSG como S-conjugados del GSH. La transpeptidación requiere de la presencia de aminoácidos, obteniendo como resultado α -glutamil aminoácidos, los cuales son transportados al interior celular, donde son los sustratos de la enzima intracelular α -glutamilciclotransferasa, que da lugar a 5-oxoprolina y el correspondiente aminoácido libre. La 5-oxoprolina es transformada a glutamato por la 5-oxoprolinasa. A su vez, la síntesis de GSH puede realizarse saltando la reacción de α -glutamil cisteína sintetasa mediante la internalización al interior de la célula de la α -glutamil cistina extracelular, para ser reducida en la célula y formar cisteína y α -glutamil cisteína. Estas son sustrato para la α -glutamil cisteína sintetasa y para la GSH sintetasa respectivamente (Anderson y cols., 1983).

Algunos autores han postulado que el ciclo del α -glutamilo es un sistema de transporte de aminoácidos a través de la membrana. Esta forma de transporte se ha corroborado en eritrocitos (Cornell y cols., 1976), glándula mamaria de rata lactante (Viña y cols., 1983; Viña y cols., 1983a), en riñón (Meister y cols., 1983), y en otros tipos celulares y tejidos (Meister y cols., 1983).

El GSH es una sustancia que tiene otras funciones importantes. Una de ellas es su función antioxidante. El GSH interactúa fácilmente con una amplia gama de radicales libres cediendo un protón (Yu, 1994). Una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es la eliminación de H_2O_2 y peróxidos orgánicos en la

reacción catalizada por la GPX, en la que dos moléculas de GSH donan dos átomos de hidrógeno para dar lugar a glutatión oxidado (GSSG), el cual posteriormente es reducido por la GR para restaurar el GSH. La concentración de GSSG en la célula se mantiene a niveles muy bajos (Asunción y cols., 1996); (Viña y cols., 1995). El GSH está implicado también en la reducción de varios antioxidantes celulares, como por ejemplo el radical vitamina E y el radical semidehidroascorbato (radical de la vitamina C) (Niki y cols., 1995).

Además, el GSH está implicado en la síntesis del DNA. En este proceso los ribonucleótidos son transformados a desoxiribonucleótidos por la enzima ribonucleótido reductasa. Los agentes reductores en esta reacción son la tioredoxina o la glutaredoxina (Holmgren, 1979), que es dependiente a su vez del GSH.

La síntesis y degradación de las proteínas también se ve afectada por el GSH, de forma que las fases de iniciación y elongación del proceso de traducción que tienen lugar en la síntesis proteica se inhiben cuando el GSH se oxida (Ochoa, 1983; Zehavi-Willner y cols., 1970). Los responsables de la inhibición de la síntesis proteica pueden ser tanto la depleción del GSH, como el incremento del GSSG como ambos a la vez (Kosower y cols., 1983). Por otra parte, el GSH contribuye al mantenimiento del estado redox celular, al cual son sensibles las proteínas. Estas cambian su función y conformación ante cambios en el estado redox, siendo más susceptibles de degradación cuando éste es más oxidante (Dröge, 2002). Por tanto, y debido al cambio de conformación que pueden sufrir algunas proteínas enzimáticas que alteran su función, el GSH, en la medida en que mantiene los tioles proteicos de aquellas permite mantener la conformación y regular la actividad enzimática de enzimas metabólicas importantes, evitando la formación de disulfuros mixtos y puentes disulfuro. Un ejemplo es la glucógeno sintetasa D, la cual es inactivada por el GSSG y reactivada por el GSH (Ernest y cols., 1973).

Por otra parte, la depleción de GSH en hepatocitos aislados de rata ayunada produce una disminución de la tasa de gluconeogénesis a partir de lactato y otros precursores (Sáez y cols., 1985). La explicación a este hecho es que algunas enzimas de esta vía requieren del GSH para su actividad normal, como la fosfoenolpiruvato

carboxiquinasa, aunque existen también otras enzimas gluconeogénicas con grupos tioles que pueden verse afectadas por la depleción de GSH.

Además, el GSH actúa como cofactor para algunas enzimas, como la glioxalasa I y II, en las cuales el GSH se consume en la primera reacción y se regenera en la segunda (Racker, 1951).

El glutatión cumple además una función importante como almacén y forma de transporte de cisteínas (Meister, 1995). La cisteína, incluso a concentraciones no excesivamente altas, es tóxica para la célula (Viña y cols., 1983; Viña y cols., 1983a). Una forma de almacenar tioles no proteicos es hacerlo en forma de glutatión, en lugar de cisteína (Viña y cols., 1986).

El GSH está también implicado en otras funciones como la detoxificación de xenobióticos (Chasseaud, 1974), como la metabolización del paracetamol (Mason y cols., 1986; Viña y cols., 1980), con lo que el tratamiento con metionina y N-acetil cisteína por vía oral podría estar indicado en el tratamiento de la hepatotoxicidad por paracetamol (Viña y cols., 1986), y también en el control del crecimiento celular (Terradez y cols., 1993) y en la regulación de la apoptosis (Esteve y cols., 1999).

1.3.2.2.2. Vitamina E.

La vitamina E es el antioxidante más abundante en la naturaleza. El término vitamina E aglutina al menos ocho isómeros estructurales de tocoferoles y tocotrienoles. Entre ellos, el α -tocoferol es el más estudiado y el que tiene mayor actividad antioxidante (Burton y cols., 1990; Janero, 1991).

Debido a su alta liposolubilidad, la vitamina E se asocia a membranas ricas en lípidos, como la membrana mitocondrial, la del retículo plasmático o la membrana plasmática. Aunque habitualmente la cantidad de vitamina E en las membranas es baja, la suplementación dietética de esta vitamina puede aumentar su contenido (Janero, 1991).

La acción antioxidante de la vitamina E reside en su capacidad para neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipoperoxilo a formas menos reactivas, además de ser capaz de romper la reacción en cadena de lipoperoxidación que ocurre en el daño oxidativo a las membranas (Burton y cols., 1990).

La neutralización por la vitamina E de un radical provoca la formación del radical vitamina E, disminuyendo el contenido celular de vitamina E (Burton y cols., 1990; Janero, 1991; Packer y cols., 1979). Por su parte el radical vitamina E es reciclado a vitamina E a costa de diversos antioxidantes, como el glutatión o el ascorbato (Burton y cols., 1990; Packer y cols., 1979).

1.3.2.2.3. Vitamina C.

La vitamina C (ácido ascórbico) es hidrofílica, y al contrario que la vitamina E, funciona mejor en medios acuosos. A pH fisiológico la forma predominante es el anión ascorbato (Yu, 1994). El ascorbato está presente en todos los tejidos, pero es especialmente abundante en el tejido adrenal (Yu, 1994).

La vitamina C como antioxidante tiene una doble importancia. En primer lugar como agente antioxidante capaz de neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipohidroperóxido. En segundo lugar, como agente fundamental en la regeneración de la vitamina E (Packer y cols., 1979). Al reciclar la vitamina E, se consume el ascorbato pasando a radical ascorbato, el cual puede ser a su vez reciclado por la NADH semiascorbil reductasa o por tioles celulares como el glutatión o el ácido dihidrolipoico (Sevanian y cols., 1985).

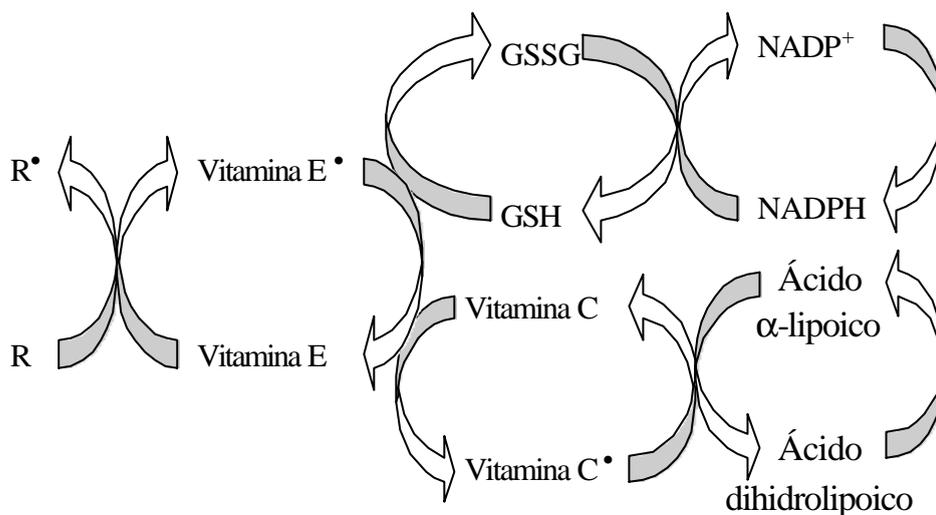
El incremento de los niveles celulares de vitamina C aumenta la protección contra los radicales libres, sin embargo, en concentraciones altas, la vitamina C tiene un efecto prooxidante en presencia de metales de transición como el Fe^{3+} o el Cu^{2+} . La acción prooxidante de la vitamina C reside en su capacidad para reducir el hierro férrico a ferroso, el cual es un potente inductor de radicales. Es por todo ello que la utilización de megadosis de vitamina C ha sido cuestionada por algunos autores (Yu, 1994).

1.3.2.2.4. Ácido α -lipoico.

El ácido α -lipoico (α -LA) es un compuesto natural que actúa como cofactor de complejos α -dehidrogenasa y participa en reacciones de transferencia de grupos que contienen azufre (Packer, 1994). Se encuentra en muy bajas concentraciones en

los tejidos animales, unido habitualmente a complejos enzimáticos, por lo que no está disponible habitualmente como antioxidante (Packer, 1994). No obstante, el ácido α -lipoico exógeno y libre (no unido a complejos enzimáticos) puede tener un papel importante como antioxidante y participando en el reciclaje del ascorbato (Kagan y cols., 1992; Packer, 1994). Tras la ingesta, el ácido α -lipoico se reduce a ácido dihidrolipoico (DHHLA), el cual es un potente antioxidante contra los radicales más importantes, además de participar en el reciclaje de la vitamina C, proceso por el que el DHHLA es convertido a ácido α -lipoico. El ácido α -lipoico puede ser reconvertido a DHHLA mediante procesos enzimáticos celulares (Packer, 1994).

Figura 12. Engranaje de varios sistemas antioxidantes en colaboración para neutralizar los radicales libres



1.3.2.2.5. Carotenoides.

Los carotenoides son antioxidantes liposolubles situados principalmente en las membranas. Las propiedades antioxidantes de los carotenoides residen en su estructura, formada por largas cadenas de dobles enlaces conjugados. Esta

disposición permite neutralizar diversos ROS, incluido el radical superóxido y radicales peroxilo (Briviba y cols., 1994; Krinsky, 1994; Krinsky y cols., 1982; Yu, 1994). De hecho, los carotenoides son capaces de reducir la peroxidación lipídica provocada por los radicales libres (Krinsky y cols., 1982).

Al igual que ocurre con la vitamina C, los ácarotenos pueden funcionar tanto como antioxidantes como prooxidantes, comportándose como antioxidantes a presiones parciales de oxígeno fisiológicas y como prooxidantes ante ambiente hiperóxico (Burton y cols., 1984; Palozza y cols., 1997).

1.3.2.2.6. Ácido Úrico.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el ser humano y otros primates, ya que carecen de la enzima uricasa, la cual hace que continúe la degradación hasta alantoína y urea. Como consecuencia de lo anterior, el ser humano presenta una concentración plasmática de ácido úrico más de 10 veces superior a la encontrada en la mayoría de los mamíferos (Cutler, 1984). El anión monovalente urato es la forma en que se encuentra más del 99% del ácido úrico a pH fisiológico (Simic y cols., 1989)..

La dieta puede ser una importante fuente de ácido úrico, ya que la ingestión de purinas hace que estas sean transformadas en ácido úrico por la xantina óxidoreductasa presente en la mucosa intestinal, de forma que las purinas ingeridas no aparecen en la sangre, sino su derivado el ácido úrico (Stone y cols., 1991).

Además, el ácido úrico y el urato se filtran y secretan en la nefrona, pero el 90% normalmente se reabsorbe (Ames y cols., 1981; Stone y cols., 1991).

Es por todo lo anterior por lo que el ácido úrico no parece que sea simplemente un producto de desecho de una vía metabólica, y además, se ha correlacionado positivamente la concentración de ácido úrico en plasma de distintas especies con su esperanza de vida (Cutler, 1984).

Desde 1960 se conoce que el ácido úrico es un antioxidante. La concentración plasmática de ácido úrico varía considerablemente de un individuo a otro, pero en promedio es mayor en los hombres que en las mujeres (Gresser y cols., 1991), y en relación con otros antioxidantes no enzimáticos, como la vitamina C, la vitamina E, el

glutación u otros, la concentración plasmática de ácido úrico es alta (Cutler, 1984; Halliwell y cols., 1989; Stocker y cols., 1991).

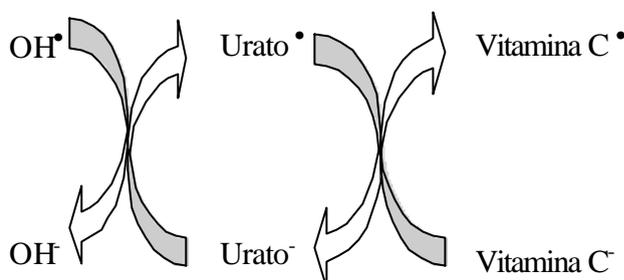
Algunos autores han estimado que el 30-65 % de la capacidad del plasma para neutralizar radicales peroxilo es debida al ácido úrico (Frei y cols., 1988; Wayner y cols., 1987), y en cuanto a la capacidad de neutralizar al radical hidroxilo en plasma, se ha estimado que el ácido úrico es responsable en un 10 a 15 % (Thomas, 1992).

La mayor concentración de ácido úrico es el interior de la célula endotelial (Becker y cols., 1987), siendo estas células endoteliales el sitio de mayor producción de ácido úrico en el sistema cardiovascular (Jarasch y cols., 1986; Jarasch y cols., 1981); (Nees y cols., 1985). Desde este lugar de producción, el ácido úrico se libera tanto a la sangre como a otros compartimentos extracelulares (Obst y cols., 1990). Esta es una característica importante que diferencia al ácido úrico del resto de antioxidantes enzimáticos, y es su presencia en todos los compartimentos del líquido extracelular, habiéndose demostrado su presencia, además de en el plasma, en la linfa, el líquido sinovial, el líquido intersticial, fluidos intraoculares, líquido amniótico y secreciones nasales (Halliwell y cols., 1989; Peden y cols., 1990; Stone y cols., 1991).

Además, algunas células son capaces de incorporar a su interior el ácido úrico formado por otras células, por ejemplo, son capaces de hacerlo los eritrocitos (Greger y cols., 1976; Lassen, 1961; Lucas-Heron y cols., 1979; Tiemeyer y cols., 1986), los hepatocitos (Giesecke y cols., 1984), y probablemente las células musculares cardíacas (Kolassa y cols., 1970; Kroll y cols., 1992).

El ácido úrico se ha demostrado *in vivo* como un agente antioxidante, aunque en algunos casos sólo en presencia de otros antioxidantes, habiéndose demostrado su interacción con la vitamina C (Aruoma y cols., 1989), y también habiéndose propuesto que con la oxidación de la vitamina C se previene la oxidación del ácido úrico, efecto análogo al que ocurre con la vitamina C y E respectivamente (Esterbauer y cols., 1989; Frei y cols., 1988; Stocker y cols., 1991).

Figura 13. Colaboración entre el urato y la vitamina C en la detoxificación del radical hidroxilo.



Además de todas estas propiedades neutralizadoras de radicales hidroxilo, del oxígeno singlete, de oxidantes oxohemoglobínicos, de radicales hidropéroxilos y del ácido hipocloroso, citados también por Becker (Becker, 1993), el ácido úrico es capaz de formar complejos estables en proporción 2:1 con iones férricos, actuando como protector contra las oxidaciones catalizadas por el hierro (Davies y cols., 1986).

Por último, el ácido úrico es capaz de prevenir, por sí solo y a concentraciones fisiológicas, la inactivación de algunas enzimas importantes situadas en el endotelio vascular entre otras localizaciones, las cuales disminuyen su actividad por la oxidación de la propia enzima, como es el caso de la ciclooxigenasa (Bourgain y cols., 1982; Deby y cols., 1981; Ogino y cols., 1979; Pincemail y cols., 1986), o de la ECA (enzima convertidora de la angiotensina), la cual presenta varios grupos funcionales sensibles a la oxidación en su centro activo, y por tanto inhibiendo la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor (Leipert y cols., 1992).

1.3.2.2.7. Otros.

Existen otros muchos antioxidantes no enzimáticos, muchos de ellos presentes en las plantas, y cuya descripción sobrepasa los límites de este trabajo, pero no por ello dejan de ser importantes en cierta medida. Entre ellos no podemos ignorar el amplio grupo de los polifenoles, la bilirrubina, las ubiquinonas, la melatonina ó el

Ginkgo, del cual se han realizado estudios en este laboratorio en relación con el envejecimiento (Sastre y cols., 1998).

1.3.3. Acciones de los radicales libres como señales.

A altas concentraciones, los radicales libres son perjudiciales y tal como hemos visto anteriormente, producen alteraciones dañinas en las macromoléculas. Sin embargo, a concentraciones moderadas juegan un importante papel como reguladores en los procesos de comunicación y señalización intra e intercelular. Los radicales libres tienen efectos beneficiosos en los seres vivos, los cuales son fundamentalmente los siguientes:

- 1- desencadenan respuestas tendentes al restablecimiento del equilibrio del estado “redox” (homeostasis redox),
- 2- desencadenan respuestas fisiológicas beneficiosas para el organismo y
- 3- participan en las cascadas de señalización que regulan distintas funciones y vías metabólicas.

Como ejemplo de algunas respuestas tendentes al mantenimiento de la homeostasis redox podemos citar la inactivación de la óxido nítrico sintetasa (NOS) por su propio producto, el óxido nítrico (Abu-Soud y cols., 1995; Buga y cols., 1993); (Griscavage y cols., 1994), la activación de la expresión de algunos genes implicados en la defensa antioxidante, como la Mn-SOD, la catalasa, la glutatión reductasa, la tioredoxina, la glutaredoxina, la NADPH:ferrodoxin óxidoreductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la hemooxigenasa-1 (HO-1), el transportador de cistina χ y otras (Godon y cols., 1998; Hassan y cols., 1977; Ishii y cols., 1999; Kuge y cols., 1994; Nakamura y cols., 1994; Nakamura y cols., 1997; Sato y cols., 1999; Schnell y cols., 1992; Shull y cols., 1991; Yashpe-Purer y cols., 1977).

La activación de linfocitos T en la amplificación de la respuesta inmune es activada fuertemente por los ROS y/o un desequilibrio del estado redox celular (Hehner y cols., 2000), viéndose que el desequilibrio redox es capaz de aumentar la señal estimuladora desde el receptor del antígeno, pero no es capaz de reemplazar la señal que viene del receptor, por lo que los ROS de un ambiente inflamatorio

disminuyen el umbral de activación de las cascadas de señalización activadas por los antígenos unidos a sus receptores. Por otro lado, dependiendo del estado redox intracelular de los macrófagos, estos varían en gran medida la liberación de prostaglandinas, interleukina-6 e interleukina-12, regulando asimismo el ratio de linfocitos T Helper 1 y 2 (Hamuro y cols., 1999).

Los ROS también participan en las vías de señalización relacionadas con la apoptosis, habiéndose observado que un ambiente prooxidativo no es un requisito general para la muerte celular programada (Castedo y cols., 1996; Jacobson y cols., 1994), sin embargo, altas concentraciones de ROS inducen apoptosis en varios tipos celulares (Dumont y cols., 1999; Slater y cols., 1995). El NO también está relacionado con la apoptosis, viéndose que la apoptosis inducida por NO se asocia a un descenso en la concentración de cardiolipina y en la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, así como a la liberación de citocromo c mitocondrial al citosol (Umansky y cols., 2000; Ushmorov y cols., 1999). Algunos tipos celulares son resistentes a la apoptosis inducida por NO y bajas concentraciones de NO protegen de la apoptosis a algunos tipos celulares por inactivación de ciertas caspasas (Cohen, 1997; Kim y cols., 1997; Li y cols., 1997; Maurice y cols., 1998). Altas concentraciones intracelulares de GSH se asocian a una mayor resistencia a la apoptosis mediada por NO (Umansky y cols., 2000).

1.4. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.

1.4.1. DELIMITACIÓN CONCEPTUAL.

El envejecimiento es un fenómeno fisiológico complejo, influido por muchas variables, es un proceso largo, y además se asocia frecuentemente con ciertas enfermedades.

El estudio del devenir del envejecimiento, multifactorial, y por tanto, multidisciplinar, ha estado presente en las civilizaciones desde tiempo inmemorial. Este estudio se ha llevado a cabo desde distintas perspectivas y en distintas especies animales. Por lo tanto, hablamos del proceso de envejecimiento como un complejo proceso que algunos autores definen de la siguiente forma:

Kirkwood y Austad lo definen como la progresiva pérdida de función acompañada de pérdida de fertilidad y aumento de la mortalidad que se produce a medida que aumenta la edad de los organismos (Kirkwood y cols., 2000).

Harman lo define como la acumulación de cambios responsables de las alteraciones secuenciales que acompañan al aumento de edad y el aumento progresivo del riesgo de enfermar y morir asociado. El mismo autor añade que estos cambios se pueden atribuir a la enfermedad, al entorno, y a un proceso congénito. Este último provoca cambios propios de envejecimiento a un ritmo aparentemente inalterable, que aumenta exponencialmente a medida que aumenta la edad. Los cambios que provoca el proceso de envejecimiento son pocos a edades tempranas, y aumentan con la edad debido a la naturaleza exponencial del proceso (Harman, 1991).

Beckman y Ames entienden que no hay un único proceso de envejecimiento ni una única causa (Beckman y cols., 1998). Esto ha hecho necesario el definir las alteraciones que son comunes a la mayoría de las células, tejidos y especies animales, pero siempre manteniendo y respetando las diferencias, afirmando que en el proceso de envejecimiento, se cumplen dos criterios (Johnson y cols., 1999):

1. La probabilidad de morir aumenta con la edad del organismo.
2. El fenotipo de todos los individuos sufre cambios a lo largo del tiempo.

Bernard Strehler, desde el campo de la gerontología, define el envejecimiento mediante estas 4 características:

1. El envejecimiento es universal, es decir, cualquier cambio asociado al proceso de envejecimiento debe darse en menor o mayor medida en todos los individuos de una especie.
2. El envejecimiento es intrínseco, es decir, las causas que lo provocan deben de ser de origen endógeno, no siendo provocadas por factores externos o de origen ambiental.
3. El envejecimiento es progresivo, los cambios que se asocian al envejecimiento se dan de manera paulatina a lo largo de la vida.
4. El envejecimiento es deletéreo, es decir que un determinado fenómeno se considerará parte del proceso de envejecer si es dañino.

Por su parte Dröge afirma que los organismos multicelulares en general sufren cambios cualitativos con la edad que se manifiestan por una degeneración progresiva de las funciones biológicas, un aumento de la susceptibilidad a las enfermedades y un aumento de la probabilidad de morir (Dröge, 2002).

Por tanto, como parte del proceso de envejecimiento, la mayoría, si no todas, las funciones fisiológicas pierden eficiencia. Es el caso de la fuerza, la resistencia, la coordinación motora, la filtración renal, la ventilación pulmonar, la audición, la visión, la memoria y en general, la capacidad de mantener la homeostasis, asociándose una mayor sensibilidad a cualquier estrés, como cambios de temperatura, infecciones, traumatismos, así como una menor tolerancia a la glucosa. En conjunto, el parénquima de todos los órganos sufre una atrofia progresiva, que no sólo afecta a las células, sino también a los elementos extracelulares, como el colágeno.

1.4.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.

El hecho de que el proceso de envejecimiento sea un fenómeno multifactorial ha hecho que durante mucho tiempo existan teorías múltiples y variadas, poco unificadoras. Entre ellas, exponemos aquí la clasificación que hacen Tirosh y Reznick (Tirosh y cols., 2000):

1. Teorías moleculares y celulares.

1.1. Teorías genéticas.

1.1.1. Teoría de la mutación somática.

1.1.2. Teoría del control genético.

1.1.3. Teoría del error catastrófico.

1.2. Teorías no genéticas.

1.2.1. Teoría de los radicales libres.

1.2.2. Teoría del “wear and tear”.

1.2.3. Teoría de la membrana.

1.2.4. Teoría de los puentes cruzados moleculares intracelulares.

2. Teorías sistémicas y fisiológicas.

2.1. Teoría inmunológica.

2.2. Teoría SNC-hormonal.

Sin embargo, el intentar establecer teorías unificadoras que permitieran reducir el número de ellas haría posible entender y tratar el proceso de envejecimiento de forma más fácil y clara. En este sentido, en la línea unificadora, algunos investigadores creen que un pequeño número de mecanismos deteriorantes, de forma aleatoria pueden explicar el envejecimiento, mientras que otros abogan por las teorías del envejecimiento “programado”, en el cual la senescencia es el destino final del proceso de desarrollo.

En medio de todas estas corrientes y teorías, cierto número de investigadores ha aglutinado una serie de ideas que han desembocado en la teoría de los radicales libres en el envejecimiento.

1.4.3. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO SEGÚN LA TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES.

En 1956, Denham Harman apreció ciertas similitudes entre el proceso de envejecimiento y los efectos de la radiación ionizante, y propuso que los radicales libres producidos durante el metabolismo aeróbico causaban un daño oxidativo acumulativo, provocando el envejecimiento y la muerte (Harman, 1956). Además, por aquel entonces se había descubierto que la irradiación del agua generaba radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Stein y cols., 1948) y que había radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) en la materia viva (Commoner y cols., 1954).

Esta teoría ganó crédito con la identificación en 1969 de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) (McCord y cols., 1969), lo cual significó la primera evidencia de la existencia de formación endógena de radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in vivo. La utilización de la SOD como herramienta para encontrar localizaciones subcelulares generadoras de $\text{O}_2^{\cdot-}$ afianzó la teoría de los radicales libres en el envejecimiento al determinar a la mitocondria como la principal fuente de ROS endógenos (Boveris y cols., 1973; Chance y cols., 1979). Fue Harman de nuevo quien en 1972 sugirió que las mitocondrias podrían considerarse como reloj biológico del envejecimiento, ya que la tasa de consumo de oxígeno podría determinar la acumulación de daño mitocondrial producido por las reacciones de los radicales libres (Harman, 1972). Más tarde Miquel propuso la teoría mitocondrial del envejecimiento celular (Miquel y cols., 1980). Esta teoría propone que el envejecimiento celular es una consecuencia del ataque oxidativo al genoma mitocondrial de las células postmitóticas fijas. Las mitocondrias de las células postmitóticas utilizan el oxígeno a alta velocidad, liberando ROS, superando estas defensas antioxidantes. La importancia de las mitocondrias en el envejecimiento celular se deriva de experimentos en los que las células a las que se les microinyectan mitocondrias procedentes de fibroblastos de ratas viejas degeneraban (Corbisier y cols., 1990).

El hecho de que las especies con mayor tasa metabólica tuvieran menor esperanza de vida potencial (Rubner, 1908), es decir, que el consumo de energía *per sé* era el responsable del envejecimiento, hizo aparecer la hipótesis de la tasa de vida ("rate of living" hipótesis) (Pearl, 1928; Rubner, 1908; Sohal, 1976). La observación

de que la producción de energía por la mitocondria era llevada a cabo por oxidación, y ésta provocaba la producción de radicales libres, provocó la integración de ambos conceptos, “the rate of living” y la teoría de los radicales libres, apareciendo el concepto de que cuanto más respiración (por tanto más producción de radicales libres), más se acelera el envejecimiento. En línea con los resultados anteriores, en la década de los noventa se vio la relación inversa entre la tasa de producción de peróxido de hidrógeno y la esperanza de vida máxima de las especies (Barja de Quiroga, 1999; Sohal y cols., 1996).

Por lo tanto, y retomando el concepto de estrés oxidativo descrito anteriormente, la clave del envejecimiento estaría en el equilibrio entre tres aspectos:

- formación de agentes oxidantes.
- protección por agentes antioxidantes.
- reparación del daño oxidativo producido.

En este sentido, a pesar de que la interpretación más ambiciosa de la teoría de los radicales libres en el envejecimiento pretende afirmar que el estrés oxidativo está directamente implicado en la esperanza de vida, de lo que no cabe duda es que el estrés oxidativo juega un papel decisivo en el proceso de envejecimiento, siendo un aspecto importante en la fisiopatología del envejecimiento.

Si damos un paso más, y atendemos al papel que juegan los radicales libres en la regulación de las funciones fisiológicas, nos damos cuenta que éstos afectan los niveles de más de 100 proteínas en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Godon y cols., 1998) y también muchas en los mamíferos, entre las cuales se encuentran algunas enzimas importantes en la regulación de las vías metabólicas, como la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, o la aconitasa. Esto significa que los radicales libres no son sólo productos intermedios del metabolismo, sino que son también reguladores de la tasa metabólica (Finkel y cols., 2000), con lo que se cierra el círculo en el que la tasa metabólica determinaría el nivel de producción de radicales libres, y éstos a su vez, modularían la tasa metabólica.

La evidencia de que el envejecimiento se asocia a:

- un aumento de la producción de agentes oxidantes
- una disminución de la solidez de las defensas antioxidantes

- una disminución de la efectividad de los mecanismos de reparación y
- un aumento de productos finales del daño oxidativo,

refuerza la teoría de los radicales libres en el envejecimiento (Beckman y cols., 1998).

Otro elemento que juega a favor de la teoría de los radicales libres es la comparación entre especies, donde se puede observar que las especies con mayor esperanza de vida potencial manifiestan una menor producción mitocondrial de agentes oxidantes (Beckman y cols., 1998). En este proceso han ayudado a aclarar algunas discordancias los trabajos de Barja y cols. al demostrar que no es sólo el consumo de oxígeno la variable que se relaciona con la longevidad máxima, sino la producción mitocondrial de radicales libres en relación al oxígeno consumido, la cual varía según la especie, y explica que las aves tengan un consumo de oxígeno alto y a su vez una esperanza de vida larga (Barja y cols., 1994).

Por lo tanto, se ha demostrado que los radicales libres están muy relacionados con el proceso de envejecimiento, lo cual no significa que sean la causa.

La teoría de los radicales libres aboga porque éstos son la causa del envejecimiento. Si se entiende esta teoría como que los radicales libres contribuyen significativamente al proceso de envejecimiento, la teoría se ha confirmado. Si se entiende que los radicales libres determinan la esperanza de vida máxima de la especie, entonces los datos disponibles no permiten aún confirmar la teoría, aunque sí hay un amplio cuerpo de conocimiento que la apoya (Beckman y cols., 1998).

1.5. EL EJERCICIO FÍSICO.

1.5.1. TIPOS DE EJERCICIO FÍSICO.

El ejercicio físico es una actividad inherente al movimiento, y que nos permite desarrollarnos y llevar a cabo nuestras funciones vitales.

El ejercicio físico lo podemos clasificar según diferentes criterios, con lo que, orientándolo al estudio de los radicales libres, vamos a clasificarlo según el sustrato energético que utiliza. Así, aunque la energía necesaria para la contracción muscular, consumida por las miosina-ATPasas, sólo la pueden obtener del ATP, éste puede obtenerse a través de varias vías metabólicas. Si el ejercicio es de baja intensidad, y la cadena respiratoria de la mitocondria produce suficiente ATP, ésta será la fuente principal de ATP. Sin embargo, si el ejercicio es de más alta intensidad y la mitocondria no puede sintetizar todo el ATP que se está catabolizando, entonces se obtiene ATP por la vía de la glucólisis anaeróbica, que es una vía más rápida en la síntesis de ATP, pero cuya eficiencia no es tanta como la del metabolismo aeróbico, y además, no puede estar mucho tiempo sintetizando ATP y acumulando ácido láctico. Otra vía de obtención de ATP es la que lo obtiene a partir de los depósitos de fosfocreatina, la cual es desfosforilada por la creatina-kinasa para formar ATP a partir de ADP, también sin necesidad de oxígeno. Por tanto, atendiendo a la vía metabólica mayoritariamente implicada en la obtención del ATP, distinguimos entre metabolismo aeróbico y anaeróbico.

Si utilizamos un criterio físico o mecánico, podemos clasificar las contracciones musculares en tres tipos:

- contracción concéntrica, en la que el músculo se activa y se acorta (sus dos inserciones se acercan durante la contracción).
- contracción isométrica, en la que el músculo se activa y no puede vencer la resistencia que tiene, con lo que su longitud no cambia.
- contracción excéntrica, en la que el músculo se activa pero la resistencia le vence, y se estira (sus dos inserciones se alejan durante la contracción).

Esta clasificación es importante, porque los ejercicios se clasificarán según el tipo de contracción que predomine, y se ha observado que el ejercicio excéntrico produce más daño oxidativo que el concéntrico (Newham y cols, 1983; Newham y cols., 1986; Armstrong, 1986; Armstrong, 1990).

Tabla 2. Características de diferentes tipos de actividad contráctil.

	Excéntrico	Isométrico	Concéntrico
Movimiento del músculo	Alargamiento	Estático	Acortamiento
Fuerzas mecánicas	Altas	Bajas	Bajas
Actividad eléctrica	Baja	Alta	Alta
Coste metabólico	Bajo	Alto	Alto
Tendencia a inducir daño muscular	Alta	Baja	Baja
Tendencia a inducir fatiga	Alta	Baja	Baja
Tendencia a inducir dolor	Alta	Baja	Baja

Según el grado de agotamiento, si el ejercicio se realiza hasta el agotamiento o no, se denomina ejercicio físico agotador (exhaustivo) o ejercicio físico no agotador (no exhaustivo), respectivamente.

Un criterio que está adquiriendo importancia es el de la continuidad o no del ejercicio, distinguiéndose el ejercicio continuo del ejercicio intermitente. Este consiste en la realización de varias repeticiones con intervalos de descanso entre ellas, en los cuales puede que se produzcan procesos que el ejercicio continuo no permita, como por ejemplo la expresión de proteínas de choque térmico que pueden proteger a la mitocondria (Tonkonogi y cols., 1999).

Algunos autores también clasifican el ejercicio físico según su duración.

1.5.2. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DURANTE EL EJERCICIO FÍSICO.

El ejercicio físico agotador se ha visto que aumenta la producción de radicales libres (Davies y cols., 1982; McArdle y cols., 1995; McArdle y cols., 1999; Sjödin y cols., 1990). Estos radicales libres están relacionados con la fatiga muscular y provocan ciertos cambios indicativos de estrés oxidativo no sólo en el músculo esquelético, sino también en otros órganos, como el hígado. De hecho el ejercicio físico exhaustivo provoca el aumento del cociente GSSG/GSH en las células musculares de rata (Lew y cols., 1985; Sen y cols., 1994) así como en sangre de humanos (Duthie y cols., 1990; Gohil y cols., 1988; Sastre y cols., 1992; Sen y cols., 1994). Además se ha visto que la administración de N-acetil cisteína, mejora el estrés oxidativo en el ejercicio físico en humanos (Sastre y cols., 1996). Las posibles fuentes de estos radicales libres en el ejercicio físico se esbozan a continuación.

1.5.2.1. La cadena de transporte electrónico del músculo esquelético.

El 85 % del oxígeno utilizado por la célula se consume en la cadena de transporte electrónico, actuando éste como aceptor de electrones en el proceso de respiración mitocondrial (Chance y cols., 1979; Shigenaga y cols., 1994). De él, un 2-5% sufre una reducción, dando lugar al radical superóxido. Una reducción más de este superóxido da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno, el cual se libera en la mitocondria aislada (Boveris y cols., 1973; Loschen y cols., 1974). Para evitar el daño oxidativo, la mitocondria está dotada de una enzima mitocondrial específica, la superóxido dismutasa que previene el daño que podría producir el radical superóxido. Asimismo, también se ha evidenciado la presencia de radical hidroxilo en la mitocondria de músculo esquelético ejercitado, el cual parece estar relacionado con la tensión desarrollada por el músculo (Barclay y cols., 1991; O'Neill y cols., 1996).

Durante el ejercicio físico el consumo de oxígeno por parte del músculo puede aumentar más de 100 veces (Tonkonogi y cols., 2002) y el consumo de oxígeno del organismo entero puede aumentar 20 veces (Meydani y cols., 1993). Este hecho junto con la observación de que el ejercicio físico se asocia a un aumento de la producción

de radicales libres hizo pensar que éstos provenían de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria. Sin embargo, Chance y cols. demostraron que la formación de radicales libres por la mitocondria cuando ésta está en estado 3, es decir, cuando está consumiendo oxígeno activamente (hay ADP), es insignificante, y más tarde Papa dio una explicación molecular a este hecho (Papa y cols., 1997). Otros autores no han encontrado evidencia de que el aumento de la producción de radicales libres en ejercicio pliométrico provenga de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (McArdle y cols., 1999).

En cuanto al efecto del ejercicio sobre la función mitocondrial, los resultados son controvertidos. En estudios realizados en animales se ha propuesto que la función mitocondrial se ve afectada si el ejercicio realizado es de alta intensidad (Chen y cols., 1994; Gollnick y cols., 1990; Willis y cols., 1994). Estudios morfológicos demuestran cambios en la ultraestructura mitocondrial tras realizar ejercicio de alta intensidad (McCutcheon y cols., 1992; Nimmo y cols., 1982; Schmid y cols., 1983). Estos cambios han sido interpretados como adaptaciones normales al aumento de la demanda energética o como un tipo de daño mitocondrial. Otros autores no han encontrado evidencia de que la función mitocondrial se vea afectada por el ejercicio prolongado o de alta intensidad (Heunks y cols., 1999; Madsen y cols., 1996; Tonkonogi y cols., 1999; Viña y cols., 2000b), o por el ejercicio excéntrico (Walsh y cols., 2001) y otros han visto que la función mitocondrial aumenta tras ejercicio intermitente (Tonkonogi y cols., 1999) y tras ejercicio prolongado a moderada intensidad (Tonkonogi y cols., 1998).

1.5.2.2. Metabolismo de los prostanoides.

Las prostaglandinas parece que sean liberadas del músculo esquelético sujeto a varios tipos de estrés, incluida la excesiva contracción (McArdle y cols., 1991; Rodeman y cols., 1982; Smith y cols., 1982). La conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas implica una serie de reacciones que llevan implícita la producción de radicales libres como productos intermedios. La capacidad de producir radicales libres en el ejercicio por esta vía no está aún clara.

1.5.2.3. Catecolaminas.

La liberación de catecolaminas está aumentada durante el ejercicio. Se ha comunicado que las catecolaminas pueden autooxidarse formando radicales libres (Jewett y cols., 1989).

1.5.2.4. NAD(P)H oxidasa.

Esta enzima se sabe que actúa en los neutrófilos y en otros tipos celulares (Babior, 1984; Rossi, 1986). Sin embargo, no está claro si esta enzima está presente en la célula muscular, ni si sería influida por la actividad contráctil (Duncan, 1991).

1.5.2.5. Xantina óxidoreductasa.

En el músculo esquelético sometido a ejercicio físico aeróbico, no agotador, la demanda de ATP es satisfecha por la cadena de transporte electrónico mitocondrial, la cual adapta su producción de ATP a la demanda alcanzando un estado estable (*steady state*). Sin embargo, si el ejercicio es lo suficientemente intenso como para que esta fuente de suministro de ATP no pueda satisfacer la demanda, entonces aumenta la concentración de ADP, y otros metabolitos de las purinas en el plasma (Bangsbo, 1994). Esta circunstancia, junto a la alteración de la homeostasis del calcio que puede estimular las proteasas calcio-dependientes y el hecho de que el endotelio capilar de los músculos posea la enzima XOR hace que durante el ejercicio físico agotador esta enzima tenga las condiciones favorables para producir radicales libres. La participación de la XOR en el estrés oxidativo asociado al ejercicio físico ha sido demostrada en nuestro laboratorio (Heunks y cols., 1999; Viña y cols., 2000a; Viña y cols., 2000b).

El músculo esquelético posee escasa cantidad de XOR, y esta se localiza en el endotelio de los vasos musculares.

En cuanto al calcio, diversos estudios demuestran que el metabolismo del calcio se altera durante una excesiva actividad contráctil en el músculo esquelético (Claremont y cols., 1984; McArdle y cols., 1992) y que el daño inducido por la actividad contráctil puede reducirse o prevenirse modificando los niveles de calcio en músculo (Jones y cols., 1984), o la inhibición del proceso patológico mediado por

el calcio (Jackson y cols., 1984). La evidencia de que la proteasa calcio-dependiente es activada en el músculo esquelético en el ejercicio es indirecta, pero puede inferirse de la característica rotura de la línea Z que se observa con microscopía electrónica (Friden y cols., 1992; Friden y cols., 1983).

En cuanto a los metabolitos, muchos tipos de ejercicio se han asociado con cambios en el metabolismo de las purinas (Hellsten-Westing y cols., 1991; Sutton y cols., 1980), y los cambios en la hipoxantina son particularmente evidentes en los sujetos que llevan a cabo ejercicio que provoca isquemia (Patterson y cols., 1982; Smith y cols., 1982). La fatiga muscular que aparece cuando se realiza ejercicio físico agotador se correlaciona con un aumento del contenido de hipoxantina e IMP en el músculo (Norman y cols., 1987; Waern y cols., 1993). Además, la hipoxantina es liberada rápidamente desde el músculo al suero (Patterson y cols., 1982; Bothius y cols., 1988), y entonces puede ser el sustrato para la xantina oxidasa del endotelio capilar. Aunque el músculo esquelético parece ser la fuente mayoritaria de producción de hipoxantina durante el ejercicio, la transformación a xantina y ácido úrico puede ocurrir en tejidos alejados del sitio de producción (Sahlin y cols., 1992).

Por lo tanto, lo más probable para que se den estas condiciones es que se realice un tipo de ejercicio de muy alta intensidad y poca duración, o un ejercicio incremental que lleve al agotamiento, más que un ejercicio de moderada o baja intensidad.

1.5.2.6. Otras fuentes de radicales libres.

1.5.2.6.1. Leucocitos con capacidad fagocítica.

La lesión de la fibra muscular va seguida de la invasión por macrófagos y otros fagocitos que llegan por la sangre y el intersticio (Armstrong, 1986). Como parte del proceso de fagocitosis, liberan una cantidad sustancial de radicales libres para provocar la degeneración del área dañada (Kleban, 1982; Malech y cols., 1987). La suplementación con antioxidantes no puede actuar mucho en la prevención del daño muscular, pero a priori, debe provocar la neutralización del estrés oxidativo provocado por los fagocitos.

1.5.2.6.2. Producción de radicales libres secundariamente a la acumulación de calcio intramuscular.

Algunos autores han propuesto que el fracaso en la homeostasis del calcio intramuscular es un paso clave en la lesión muscular asociada al ejercicio (Armstrong, 1990; Gollnick y cols., 1989; Jones y cols., 1984; McArdle y cols., 1992). Puede ser que este fracaso de la homeostasis del calcio sea secundario a un aumento de la actividad de los radicales libres, como ocurre en otros tejidos (Burton, 1988), pero esta posibilidad es contradicha por algunos estudios en músculo esquelético (Jackson y cols., 1984; Jackson y cols., 1991; McArdle y cols., 1994; Phoenix y cols., 1989; Phoenix y cols., 1991; Rice-Evans, 1990). Si la alteración del calcio fuera el primer acontecimiento, un aumento intracelular de éste activaría las fosfolipasas y enzimas proteolíticas, conduciendo a la liberación de ácidos grasos libres y a la disrupción de las membranas de las estructuras intracelulares. Además, en un intento de amortiguar el calcio intracelular, la mitocondria se sobrecargaría de calcio, corriendo el peligro de un eventual fracaso de la producción de ATP, con un aumento de la producción de superóxido.

1.5.2.6.3. Producción de radicales libres secundariamente a la ruptura de proteínas que contienen hierro.

La capacidad del hierro para catalizar reacciones de producción de radicales libres es bien conocida (Halliwell y cols., 1985). Los deportes de resistencia y aquellos que conllevan un alto impacto mecánico, causan una destrucción de eritrocitos con liberación de hierro y por tanto, una potencial fuente de hierro catalítico. Asimismo, al dañarse la fibra muscular, se liberan a la circulación grandes cantidades de mioglobina, con su hierro correspondiente. Cooper y colaboradores sugieren que la interacción de la metamioglobina y la metahemoglobina con peróxidos son responsables significativamente del estrés oxidativo producido durante el ejercicio físico (Cooper y cols., 2002).

1.5.3. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXÍGENO DURANTE EL EJERCICIO FÍSICO.

1.5.3.1. Peroxidación lipídica y ejercicio físico.

En el ejercicio físico, los estudios que hay realizados indican que hay un aumento de peroxidación lipídica tanto cuando se realiza ejercicio aeróbico como cuando éste es anaeróbico (Alessio y cols., 1988b). Sin embargo, Alessio y colaboradores comprobaron que si comparaban los niveles de malondialdehído (MDA), un marcador de peroxidación lipídica que se acumulaban tras carrera hasta el agotamiento (aeróbico-anaeróbico) y tras el mismo tiempo de ejercicio isométrico al 50% de una repetición máxima, éste último producía más lipoperoxidación, incrementándose los niveles de MDA un 5,6% sobre los niveles basales en el caso de la carrera hasta el agotamiento, y un 25,4% en el caso del ejercicio isométrico (Alessio y cols., 1998). Por su parte, Ortenblad y cols. no encontraron diferencias en la peroxidación lipídica que producía la realización de seis repeticiones de 30 segundos con una micropausa de 2 minutos entre ellas (Ortenblad y cols., 1997). Sin embargo, esta falta de peroxidación se atribuyó a un aumento de varias enzimas antioxidantes clave, como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión reductasa, y la glutatión peroxidasa.

1.5.3.2. Oxidación proteica y ejercicio físico.

El primer trabajo que demostró que las ratas sometidas a ejercicio físico agotador acumulaban mayores niveles de grupos carbonilo en las proteínas se publicó en 1992 (Reznick y cols., 1992). Otros autores han corroborado dicha afirmación (Radak y cols., 1998). Este efecto disminuía si varias semanas antes de la realización del ejercicio se les alimentaba con altas dosis de vitamina E. Además, se ha demostrado no sólo que el ejercicio aumenta la síntesis proteica y la degradación (Radak y cols., 1998), sino que la actividad del complejo proteosómico está aumentado tras el ejercicio físico crónico, lo cual es interpretado como efecto beneficioso ya que aumenta la capacidad del músculo de eliminar las proteínas

dañadas por agentes oxidantes producidos por el ejercicio físico (Radak y cols., 1999; Radak y cols., 2000).

1.5.3.3. Daño al DNA celular inducido por el ejercicio físico.

Los radicales libres afectan también al DNA, y el ejercicio físico agudo aumenta el daño al DNA (Niess y cols., 1996), tal como se evidencia por el aumento de 8-OhdG (Asami y cols., 1998; Radak y cols., 1999). Sin embargo, en seres humanos entrenados el nivel de daño al DNA no aumentaba tal como lo hacía en los no entrenados (Pilger y cols., 1997; Radak y cols., 2000).

1.5.4. INDUCCIÓN DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES POR EL EJERCICIO FÍSICO.

Dado que las defensas antioxidantes son capaces de adaptarse ante una exposición crónica a agentes oxidantes, es de esperar que ante la realización crónica de ejercicio físico (entrenamiento) se produzca una adaptación en respuesta a los agentes oxidantes que produce el ejercicio físico.

En lo referente a SOD en el músculo esquelético, aunque algunos autores no observan un aumento en respuesta al entrenamiento (Alessio y cols., 1988a; Ji y cols., 1988; Laughlin y cols., 1990), la mayoría encuentran un aumento en la actividad SOD total (Higuchi y cols., 1985; Jenkins, 1988; Leeuwenburgh y cols., 1994; Leeuwenburgh y cols., 1997; Leeuwenburgh y cols., 1995; Leeuwenburgh y cols., 1996; Leeuwenburgh y cols., 1996; Oh-Ishi y cols., 1997; Oh-Ishi y cols., 1997; Powers y cols., 1994; Powers y cols., 1994; Powers y cols., 1992). Las diferencias pueden atribuirse a que el ejercicio físico de alta intensidad produce una mayor adaptación de la actividad SOD del músculo esquelético que el ejercicio de baja intensidad (Powers y cols., 1999).

La glutatión peroxidasa también se modifica con el entrenamiento de forma dependiente de la intensidad y duración del ejercicio (Powers y cols., 1999), sin embargo la actividad catalasa parece que inexplicablemente se reduce tras realizar ejercicio físico.

El contenido de GSH en el músculo aumenta con el entrenamiento (Leeuwenburgh y cols., 1994; Leeuwenburgh y cols., 1997; Marin y cols., 1993; Sen

y cols., 1992), lo cual apunta a un aumento de la capacidad de captación de GSH por parte de la fibra muscular.

1.5.5. AFECTACIÓN MUSCULAR ASOCIADA AL EJERCICIO FÍSICO.

Estudios histológicos han mostrado que tras el ejercicio se produce un daño estructural en el músculo esquelético tanto de animales como de humanos, y profundizando más, podemos afirmar que el tipo de ejercicio que implica un predominio del componente excéntrico del movimiento es el que ha mostrado provocar un mayor daño muscular (Armstrong y cols., 1983). Este daño se manifiesta como alteración del sarcolema (Armstrong y cols., 1979), distensión y/o rotura de retículo sarcoplásmico (Manfredi y cols., 1991), alteraciones citoesqueléticas (Friden y cols., 1984; Lieber y cols., 1994), distorsión de los componentes contráctiles miofibrilares (Armstrong, 1990; Manfredi y cols., 1991), y edema muscular (Komulainen y cols., 1993; Peeze Binkhorst y cols., 1990). Inicialmente se observan lesiones microscópicas consistentes en la disrupción de las bandas miofibrilares y más tarde, al 2º-4º día se observa invasión de células fagocíticas y degeneración de estructuras celulares. Al 4º-6º día se observan signos de regeneración, con la activación de las células satélite (McArdle y cols., 2000). Se ha observado morfológicamente que la xantina óxidoreductasa endotelial se modifica tras la realización de ejercicio físico de larga duración (Duarte y cols., 1994; Räsänen y cols., 1996).

Las actividades plasmáticas de enzimas específicas del músculo, como la creatina kinasa (CK) y la lactato deshidrogenasa (LDH) se usan como marcadores de daño del tejido muscular (Apple y cols., 1988; Jones y cols., 1983; Lijnen y cols., 1988; Lott, 1984). La más utilizada es la CK, y hay otras, aparte de las citadas anteriormente, que son menos utilizadas como marcadores, como la GOT, la mioglobina y la anhidrasa carbónica III.

La liberación de enzimas musculares en deportistas se usa para estimar la cantidad de daño muscular después de hacer ejercicio, basándose en la suposición de que la liberación de enzimas musculares se relaciona con la cantidad de enzimas

musculares así como la cantidad de daño muscular provocado por el ejercicio (Apple y cols., 1988; Friden y cols., 1983; Janssen y cols., 1989).

Por su parte, Armstrong en 1983 demostró que ratas no entrenadas sometidas a ejercicio físico agotador liberaban más enzimas musculares que las entrenadas.

La liberación de estas proteínas intracelulares se cree que es debida a cambios en la permeabilidad o a rotura de la membrana muscular (Komulainen y cols., 1994).

Algunos autores no encuentran correlación entre la liberación de enzimas musculares y el daño muscular analizado histológicamente (Van Der Meulen y cols., 1991), lo cual apoya el hecho de que el aumento en la liberación de enzimas sea permitido por el aumento de la permeabilidad de la membrana. El mecanismo no se conoce con seguridad, y aunque fuera por el aumento de la permeabilidad de la membrana, no se conoce cual es el mecanismo por el que ésta aumenta.

1.6. EJERCICIO FÍSICO Y ENVEJECIMIENTO.

Hay considerable bibliografía y está generalmente aceptado que el ejercicio físico de resistencia y de fuerza provoca unas adaptaciones que se oponen a muchas de las características asociadas al envejecimiento (ver tabla 3). Además, el ejercicio físico habitual disminuye el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y osteoporosis (McCarter, 2000). El ejercicio físico voluntario se asocia a una mayor esperanza de vida media, posiblemente debido a lo anterior, aunque no aumenta la esperanza de vida máxima. Esto ha sido interpretado como que el ejercicio físico no influye en el proceso de envejecimiento, pero sí tiene efecto protector, lo cual hace que una mayor proporción de la población alcance edades avanzadas (McCarter, 2000).

La morfología y la función muscular se deteriora a medida que avanza la edad (Campbell y cols., 1998; Larsson y cols., 1978; Larsson y cols., 1978; Larsson y cols., 1997; Lexell y cols., 1988). Además, el músculo esquelético de los mamíferos viejos es más susceptible al daño producido por el ejercicio físico, se recupera más lentamente de dicho daño, y difiere en su adaptación tras el ejercicio (Brooks y cols., 1994; Ji y cols., 1998; Lexell, 1995; McArdle y cols., 2000; McBride y cols., 1995). Por otra parte, el músculo viejo contiene mayores defensas antioxidantes a medida que aumenta su edad, como la Superóxido Dismutasa, la Glutación Peroxidasa, la Catalasa y otras, además de tener una mayor capacidad para captar GSH, ya que la α -glutamil transpeptidasa está más elevada en los músculos viejos (Leeuwenburgh y cols., 1994).

La expresión génica del RNA mensajero que codifica estas enzimas antioxidantes no está aumentada en el músculo viejo (Oh-Ishi y cols., 1995) a pesar de estar aumentada su actividad, lo cual sugiere que este aumento de las defensas está regulado de forma compleja, actuando de alguna forma a nivel posttranscripcional. Este aumento de los mecanismos de defensa es específico del tipo de fibra muscular, siendo mayor en las fibras tipo I y IIa que en las IIb (Oh-Ishi y cols., 1995). De las enzimas antioxidantes, la que muestra una mayor respuesta al entrenamiento es la Glutación Peroxidasa (Ji y cols., 1998).

Tabla 3. Comparación de las características asociadas al envejecimiento y al ejercicio físico. (Adaptado de Blumberg y Halpner, 1999).

	Envejecimiento	Ejercicio
Características metabólicas		
Reacciones de fase aguda		
Metabolismo basal		/=
Equilibrio del calcio		
Tolerancia a la glucosa		
Respuesta a la insulina	/=	----
LDL-colesterol		
Glucógeno muscular		
Composición corporal		
Masa ósea		/=
Masa grasa		
Masa magra		
Agua corporal		/=
Estrés oxidativo		
Oxidación del GSH		
Peroxidación lipídica		/=
Daño a la membrana muscular	/=	
Oxidación de ácidos nucleicos		/=
Proteínas carboniladas		/=

“ ” *aumenta*; “ ” *disminuye*; “=” *no cambia*.

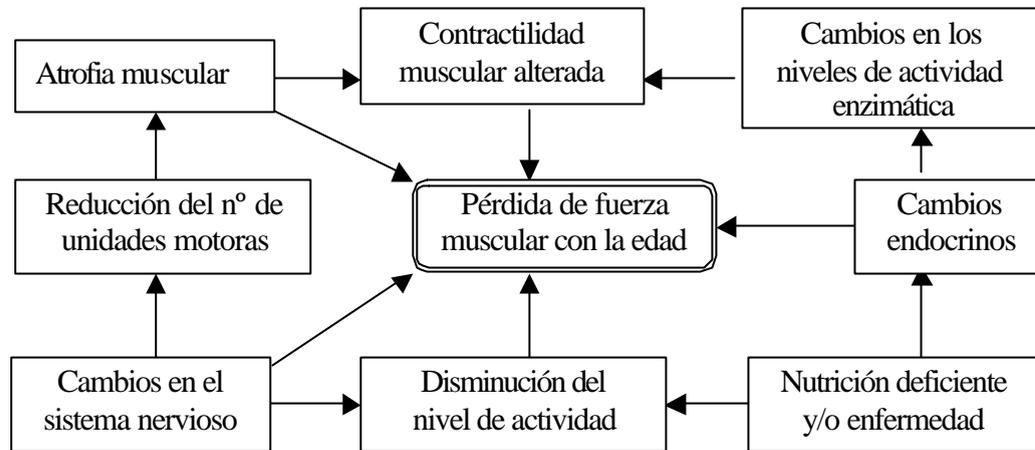
En cuanto a las reservas de tioles intracelulares, a pesar de que el envejecimiento se asocia a un descenso de las reservas en la mayoría de los tejidos, el músculo cardíaco y el esquelético son excepciones, de forma que el contenido de GSH no cambia (Leeuwenburgh y cols., 1994) en algunos músculos, pero en otros sí.

Otros autores coinciden también y argumentan que el GSH aumenta significativamente en los músculos viejos (Fiebig y cols., 1996), lo cual va asociado a un aumento de la actividad de la α -glutamil transpeptidasa (Leeuwenburgh y cols., 1997).

Aunque hay relativamente pocos estudios referentes a la capacidad oxidativa del músculo esquelético en relación con la edad, se sabe que la capacidad respiratoria mitocondrial del músculo esquelético disminuye con la edad, que los músculos viejos tienen menor área de sección y masa (Hakkinen y cols., 1998; Hakkinen y cols., 1998; Janssen y cols., 2000; Lexell y cols., 1988; Vandervoort y cols., 1986), y estos cambios coinciden temporalmente con una disminución proporcional de fuerza (Porter y cols., 1995). El estrés oxidativo juega un papel importante en la pérdida de masa y función muscular (Weindruch, 1995), sin embargo, faltan aun datos experimentales que vinculen la pérdida de la capacidad funcional del músculo esquelético con el estrés oxidativo (Ji y cols., 1998).

Lo que se ha visto es que las mitocondrias de músculos viejos poseen un mayor potencial para producir radicales libres debido a los ligeros cambios estructurales de la cadena de transporte electrónico (Kwong y cols., 2000; Nohl y cols., 1986). Algunos estudios han demostrado que no hay un aumento de la peroxidación lipídica en músculos viejos en respuesta al ejercicio agudo en comparación con músculos jóvenes (Cannon y cols., 1990; Ji y cols., 1990). Sin embargo, se vio que la suplementación con vitamina E reducía más la excreción urinaria de peróxidos lipídicos en viejos que en jóvenes (Meydani y cols., 1990). La posible explicación a estos datos es que los animales viejos no pueden alcanzar una intensidad suficiente de ejercicio para provocar la misma producción de radicales libres que los animales jóvenes, y además, los viejos disponen de una mayor capacidad antioxidante para eliminar los radicales libres producidos (Cannon y cols., 1990; Ji y cols., 1990).

Figura 14. Factores que causan una pérdida de fuerza muscular con la edad
(Adaptado de Anthony y cols. 2002).



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

Una vez revisado el estado del conocimiento científico relacionado con el estrés oxidativo, el ejercicio físico y el envejecimiento, nos planteamos este trabajo con el siguiente objetivo general:

- Estudiar el origen del estrés oxidativo que provoca el ejercicio físico agotador en ratas jóvenes y viejas,

y los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar la alteración muscular que provoca el ejercicio físico agotador en ratas jóvenes y viejas.
2. Comparar el estrés oxidativo en sangre, hígado y músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas, tanto en reposo como tras ejercicio físico agotador.
3. Estudiar el comportamiento de la enzima xantina óxidoreductasa en plasma, hígado, músculo esquelético y aorta, tanto en el proceso de envejecimiento como en el ejercicio físico agotador.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se han utilizado ratas Wistar macho de entre 300 y 550 gramos de peso. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta de mantenimiento manufacturado por PANLAB S.L. (Barcelona). Los animales tuvieron un ciclo lumínico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y se mantuvieron a una temperatura constante de 22°C y fueron tratados de acuerdo con las recomendaciones de la convención de Helsinki. El acceso al agua fue siempre libre. La utilización de estos animales para los experimentos expuestos en este trabajo fue aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Los animales fueron escogidos según la edad, teniendo unos entre 5 y 6 meses de edad (los jóvenes), y los otros, entre 23 y 25 meses (los viejos).

De estos dos grupos de animales, se escogieron aleatoriamente algunos para ser sometidos al protocolo de agotamiento en cinta rodante, con lo que en total hicimos 4 grupos de experimentación:

- 1.Reposo Joven.
- 2.Agotado Joven.
- 3.Reposo Viejo.
- 4.Agotado Viejo.

Tal como se puede observar en la tabla 4, se han utilizado animales jóvenes y viejos. De entre los animales jóvenes se ha escogido aleatoriamente un grupo que ha sido sometido a ejercicio físico agotador (grupo Agotado Joven), cuya edad no difiere con respecto al resto de jóvenes (grupo Control Joven). De entre los animales viejos, se ha escogido aleatoriamente un grupo que ha sido sometido al mismo protocolo de agotamiento que el grupo Agotado Joven (grupo Agotado Viejo). La edad del resto de animales viejos (grupo Control Viejo) no difiere de la edad del grupo Agotado Viejo. La edad de los animales jóvenes es la que corresponde a animales jóvenes adultos, mientras que la edad de los animales viejos corresponde a una edad muy avanzada, existiendo una diferencia de edad entre los animales jóvenes y los viejos de aproximadamente 20 meses.

Tabla 4. Edad de los distintos grupos experimentales.

	Edad (meses)
Control Joven	4,43 ± 0,31
Agotado Joven	4,25 ± 0,29
Control Viejo	24,09 ± 0,59
Agotado Viejo	24,14 ± 0,67

En cuanto al peso, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de la misma edad, pero sin embargo los animales viejos presentan un mayor peso que los jóvenes ($p < 0,01$) lo cual es una característica que se asocia al envejecimiento (ver tabla 5).

Tabla 5: Peso de los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales.

	Peso (g.)
Control Joven	408 ± 69
Agotado Joven	402 ± 23
Control Viejo	467 ± 82 ** ##
Agotado Viejo	463 ± 59 ** ##

*Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), con respecto al grupo control joven. El símbolo “##” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo agotado joven.*

3.2. APARATOS.

3.2.1. AGITADOR MAGNÉTICO.

Marca Selecta, modelo Agimatic-S.

3.2.2. CONTADOR DE CENTELLEO: Tri-carb liquid scintillation analyzer. Model 2700TR Series.

3.2.3. BALANZAS:

-Balanza de precisión Sartorius modelo Tecator 6110.

-Balanza Sartorius modelo PT 1200.

3.2.4. BAÑOS:

-Baño SBS con termostato de inmersión, modelo TFB provisto de agitación magnética automática regulable.

-Baño termostático SBS, modelo BT, con bomba de circulación BC-01.

3.2.5. CENTRÍFUGAS:

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en una centrífuga marca Selecta S. A. modelo centronic COD. 7000577.

Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en dos centrífugas:

-Centrífuga refrigerada Heraeus Sepatech Biofuge 17 RS.

-Centrífuga refrigerada Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R.

3.2.6. ESPECTROFOTÓMETRO:

Kontron Uvikon 922 termostatizado.

3.2.7. EQUIPO DE H. P. L. C.:

El equipo utilizado para la determinación del GSSG es de la marca Waters y está compuesto por:

- Dos bombas Waters, modelo 510.
- Un inyector automático modelo 2157, Pharmacia LKB.
- Un detector UV $\lambda = 365$ nm, de Waters, modelo 441.
- Un ordenador pentium III a 2000 kHz que procesa los datos y controla el equipo.
- Una columna Spherisorb aminada, de dimensiones 20 x 0.46 cm de diámetro y 5 μ m de diámetro de partícula.

3.2.8. FLUORÍMETRO:

Perkin Elmer LS 50B.

3.2.9. HOMOGENIZADOR:

- UltraTurrax T 25, Janke and Kunkel, IKA Biotechnik.
- Homogenizador marca Ika-Werk, modelo Janke y Kunkel, RW 20 DZM.

3.2.10. INCUBADORA:

NAPCO 5415 IR CO₂ System.

3.2.11. pH METRO:

Crison Microph 2001, con un electrodo Inglood.

3.2.12. BOMBA PERISTÁLTICA:

Para la perfusión hepática se utilizó una bomba peristáltica tipo Hospal DAS, modelo 262.

3.2.13. TERMOSTATO:

Se ha empleado una bomba termostática Haake FE para mantener el líquido de perfusión a una temperatura constante de 37 °C.

3.2.14. BOMBONA DE CARBÓGENO Y MANOREDUCTOR:

El medio de perfusión se gaseó con carbógeno: O₂CO₂ (95/5; V/V), para proporcionar un adecuado intercambio gaseoso y para el control del pH del medio.

3.2.15. TAPIZ RODANTE:

Para someter a las ratas a la realización de ejercicio físico se utilizó un tapiz rodante Treadmill Li 8706.

3.2.16. ESTACIÓN DE VACÍO:

Para la evaporación al vacío durante el procesado de las muestras para medir la concentración de GSSG se utilizó una estación de vacío marca Millipore, modelo Waters PICO-TAG.

3.2.17. BOMBA DE VACÍO:

Se utilizó una bomba de vacío Maepi, modelo K-520 para el filtrado de los solventes que componen las fases móviles de los cromatógrafos. Se utilizó un filtro de 0,2 µm. de diámetro de poro. Tanto el equipo de filtración como los filtros son de la marca Millipore.

3.2.18. ULTRAMICROTOMO:

Para la obtención de cortes ultrafinos de tejido para la microscopía electrónica se utilizó un aparato marca Reichert-Jung Ultracnt E.

3.2.19. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO:

Para la observación histológica de las muestras se utilizó un aparato marca Jeol Jem1010 del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

3.3. REACTIVOS.

Todos los reactivos químicos de uso general (ácidos, bases y sales) se obtuvieron de Merck, Sigma Chemical Co., Boehringer-Mannheim y Panreac, con un grado de pureza suficiente para análisis.

Los enzimas auxiliares, coenzimas y nucleótidos los suministraron Sigma Chemical Co. y Boehringer-Mannheim.

Los anticuerpos anti-xantina oxidasa los suministró la casa Chemicon y los secundarios la casa Roche.

La heparina la suministró la casa Roví.

3.4. MÉTODOS.

3.4.1. PROTOCOLO DE AGOTAMIENTO.

Los animales que aleatoriamente fueron asignados al grupo de agotamiento, fueron sometidos a ejercicio físico agotador según el protocolo descrito por Davies (Davies y cols., 1982) y modificado por nosotros. Se trata de un protocolo incremental cuyos estadios y velocidad se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Protocolo de ejercicio físico seguido para el agotamiento de los animales.

Duración del estadio	Distancia recorrida en el estadio (m.)	Velocidad (m/s)	Condición
5'	54,72	0,182	
5'	61,78	0,206	
5'	72,00	0,240	
5'	82,18	0,274	
5'	92,70	0,309	
5'	72,60	0,242	inclinado
5'	82,20	0,274	inclinado
5'	92,70	0,309	inclinado
5'	105,22	0,351	
5'	118,60	0,395	
5'	133,56	0,445	
5'	146,40	0,488	

El protocolo se lleva a cabo hasta el agotamiento del animal, el cual se observó por la pérdida del reflejo de enderezarse cuando aquel se coloca sobre su espalda (Sen y cols., 1994).

3.4.2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SANGRE Y ÓRGANOS.

Inmediatamente después del ejercicio los animales fueron anestesiados con Tiopental Sódico (50mg./1,6ml.) para permitir obtener las muestras antes de la muerte del animal. Se administraba una inyección intraperitoneal de 200 μ l. de pentotal por 100 gr. de peso. Luego se procedió a abrir la cavidad abdominal mediante laparotomía amplia que permite obtener un plano adecuado para rechazar el paquete intestinal hasta visualizar el retroperitoneo, donde se accedía con una jeringa de 5 ml. a la vena cava inferior para obtener la sangre.

Parte de la sangre (1 ml.) era colocada en un tubo de ensayo heparinizado, que posteriormente era centrifugado a 2000 G durante 10 minutos a temperatura ambiente, para separar el plasma de los elementos formes. El plasma era recogido en una alícuota e inmediatamente se sumergía en hielo para posteriormente realizar la medición espectrofotométrica de la actividad enzimática CK y LDH, con el baño a temperatura a 37 °C. Otra alícuota era conservada a -80 °C para la posterior medición de la Xantina Oxidoreductasa.

0,5 ml. de sangre se depositaban en una alícuota con 0,5 ml. de ácido perclórico al 12 %, BPDS 2 mM., NEM 40 mM. en un tubo Eppendorff. La mezcla se agitó en vortex durante 30 segundos. Seguidamente se centrifugó a 15000 G durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a -20 °C. Este sobrenadante se utilizó para la determinación de GSSG en sangre.

0,5 ml. de sangre se depositaban en una alícuota con 0,5 ml. de ácido tricloroacético al 30 %, EDTA 2 mM., en un tubo Eppendorff. La mezcla se agitó en vortex durante 30 segundos. Seguidamente se centrifugó a 15000 G durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a -20 °C. Este sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de GSH en sangre.

La extracción de órganos se realizó inmediatamente después de la extracción de sangre. Se procedió a la disección y extracción del hígado, que fue troceado en 5 a 15 bloques de 2 x 2 mm de tejido en caso de ir destinado al estudio histológico. El resto del hígado se ultracongeló mediante la técnica de “freeze-clamping” en nitrógeno líquido para la posterior conservación a -80°C. Esta muestra se utilizó

para la realización de los correspondientes homogenados que permitirían medir la actividad XO y XDH, además de la concentración de GSH y GSSG en el tejido.

La extracción de la aorta se realizó llevando a cabo una toracotomía que prolongaba la laparotomía ya realizada previamente, apartando el corazón y pulmón izquierdo y diseccionando el diafragma para permitir la visualización de la aorta al completo. Tras la liberación de la aorta de sus ramificaciones se diseccionó por su extremo proximal a nivel del cayado y en su extremo distal antes de su bifurcación. En caso de ir destinada a la medición de actividades enzimáticas se ultracongeló en nitrógeno líquido mediante “freeze-clamping” para la posterior conservación a -80°C . Posteriormente esta muestra se utilizó para la realización de los correspondientes homogenados que permitirían medir la actividad XO y XDH en el tejido. En caso de ir destinada la aorta a la determinación de la producción del radical superóxido por quimioluminiscencia, la arteria se sumergió inmediatamente en Krebs-Henseleit, en el cual se la liberó de la adventicia y se cortó en cuatro partes iguales.

La extracción del músculo gastrocnemio se realizó mediante una incisión longitudinal en la cara anterior de las extremidades posteriores de la rata, tras la cual se diseccionó el músculo en cuestión, se extrajo y se troceó en bloques de 2 x 2 mm de tejido en caso de ir destinado al estudio histológico. El resto del músculo se ultracongeló mediante “freeze-clamping” en nitrógeno líquido para la posterior conservación a -80°C . Posteriormente esta muestra se utilizó para la realización de los correspondientes homogenados que permitirían medir la actividad XO y XDH, además de la concentración de GSH y GSSG en el tejido.

Por último se procedió al sacrificio del animal.

3.4.3. PROTOCOLO DE PERFUSIÓN HEPÁTICA Y RECOGIDA DEL LÍQUIDO ELUIDO.

La perfusión hepática se hace mediante una solución salina atemperada a 37 °C. y a pH fisiológico que pasa a través del hígado en sentido cava-porta, de forma que en el líquido eluido se pueden medir sustancias liberadas por las células hepáticas.

3.4.3.1. Solución de perfusión.

Se utiliza la solución salina de Krebs y Henseleit (1932) cuya composición es la siguiente:

- 100 partes de cloruro sódico 0,9 % (p/v)
- 4 partes de cloruro potásico 1,15 % (p/v)
- 3 partes de cloruro cálcico 0,11 % (p/v)
- 1 parte de fosfato monopotásico 2,11 % (p/v)
- 1 parte de sulfato magnésico 2,11 % (p/v)
- 21 partes de bicarbonato sódico 1,3 % (p/v)

Esta solución es gaseada previamente con una mezcla de CO₂:O₂ (5:95, v/v) durante 30 minutos hasta alcanzar un pH de 7,4 y durante todo el proceso de perfusión se mantiene la solución gaseándose.

3.4.3.2. Procedimiento.

Tras la administración de pentotal intraperitoneal para anestesiarse la rata se inyectaron en la vena femoral 0,2 ml. de heparina sódica (10 mg./ml.) para evitar la formación de trombos que dificultarían una correcta perfusión de todas las áreas del hígado. Después se practicó una laparotomía media amplia, se rechazó hacia la derecha todo el paquete intestinal y se pasaron dos ligaduras, una alrededor de la vena porta, en su extremo proximal al hígado, y la otra en la vena cava inferior, por encima de las venas renales. Ambas ligaduras se dejan sin anudar. A continuación se realizó una toracotomía con resección de toda la parrilla costal anterior conservando íntegro el diafragma. Tras la toracotomía se pasa una ligadura sin anudar alrededor de la vena cava (próxima al corazón), canulándola a continuación a través de una incisión en la

aurícula derecha y cerrando la ligadura, para luego cerrar la ligadura de la cava inferior y seccionar la vena porta previamente localizada con una ligadura, permitiendo la salida del eluyente a través de ella. El tiempo transcurrido desde que se practica la toracotomía y la canulación de la vena cava a través de la aurícula derecha debe ser lo más breve posible, ya que la toracotomía hace que los pulmones no se ventilen y por tanto la sangre no realice correctamente el intercambio gaseoso.

Una vez ligado todo y al cortar la vena porta se abre el paso de la solución a través del hígado. Los primeros minutos (6-8) de perfusión sirven para lavar el hígado de los restos de sangre y el eluato sanguinolento se desecha. En estos primeros minutos de perfusión se disecciona el hígado manteniendo las ligaduras y se extrae cuidadosamente para ser colgado de forma que la solución entre por la vena cava en la parte superior y el eluyente salga por la vena porta en la parte inferior, el cual se recoge para volver a ser introducido en el circuito de la bomba de perfusión, que lo vuelve a inyectar al hígado. Se toman muestras del eluyente a los 5, 10, 15, 30 y 45 minutos.

Es importante mantener el flujo constante durante toda la perfusión.

3.4.4. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SANGRE A INTERVALOS DE TIEMPO CONCRETOS.

Para valorar si la administración de heparina provocaba un aumento de la concentración de XO por liberación de la proporción de XO pegada al endotelio, se anestesió la rata y se le practicó una laparotomía media hasta acceder a la vena cava en el retroperitoneo, tal como se ha descrito en apartados anteriores

Una vez allí se tomó una muestra de 1 ml. de sangre y con la misma aguja se le inyectó un volumen de entre 300 y 500 μ l. de heparina (1.500.2.500 U.) a razón de 5 U. de heparina/gr. de peso. El tiempo de esta primera extracción es considerado como tiempo 0, extrayendo 1 ml. de sangre más cada 10 minutos hasta llegar a los 50 minutos.

Se estableció un grupo control al cual se le administró el correspondiente volumen de suero salino fisiológico en lugar de la heparina.

Es de vital importancia que las agujas que se utilicen para las extracciones sanguíneas no se extraigan de la vena, ya que provocan una hemorragia incontrolable en el animal, dado que está heparinizado.

Por otra parte, es importante cubrir las vísceras y cavidad abdominal del animal con una gasa humedecida con suero fisiológico en el tiempo de espera entre las extracciones, para evitar la deshidratación del animal.

3.4.5. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE LOS HOMOGENADOS DE HÍGADO.

3.4.5.1. Para determinación de GSH.

Del tejido congelado se rompe un fragmento aproximado de 0,1 g., el cual se pesa y se deposita en un mortero con poco nitrógeno. Antes de que se evapore el nitrógeno se machaca de forma que el tejido congelado se convierte en polvo. Este polvo se deposita en un vaso de homogenización junto con ácido perclórico (PCA) al 6 %, EDTA 1 mM. a razón de 1 ml. de ácido por cada 0,1 g. de tejido. Inmediatamente se homogeniza a 980 r. p. m. manteniendo el vaso de homogenización en hielo. El homogenado resultante se centrifuga a 15.000 G. durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se recogen y se depositan en hielo hasta el momento de su análisis.

3.4.5.2. Para determinación de GSSG.

El proceso es similar al apartado anterior con la diferencia de que para hacer el homogenado el ácido utilizado es PCA al 6 % con BPDS 1 mM. y NEM 20 mM. Los sobrenadantes se recogen y se congelan a -20 °C hasta el momento de su análisis.

3.4.5.3. Para determinación de XO-XDH.

Del tejido congelado se rompe un fragmento aproximado de 0,2 g., el cual se pesa y se deposita en un mortero con poco nitrógeno. Antes de que se evapore el nitrógeno se machaca de forma que el tejido congelado se convierte en polvo. Este polvo se deposita en un vaso de homogenización junto con KPI 50 mM, EDTA 0,1 mM, sacarosa 0,5 M. DTT 10 mM. a pH 7,4. A este tampón se le añade en el último momento antes de realizar el homogenado 2 ml. de PMSF disuelto en etanol (0,035 g. de PMSF en 2 ml. de etanol). La relación debe ser de 3 ml. de tampón por cada 0,2 g. de tejido. Inmediatamente se homogeniza a 980 r. p. m. manteniendo el vaso de homogenización en hielo. El homogenado resultante se centrifuga a 15.000 G. durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se recogen y se depositan en hielo hasta el momento de su análisis, y si se congelan, debe hacerse a -80 °C., ya que a -20 °C. se ha observado que existe conversión de XDH a XO.

3.4.6. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE LOS HOMOGENADOS DE MÚSCULO GASTROCNEMIO.

3.4.6.1. Para determinación de GSH.

El proceso es idéntico al utilizado para la obtención de los homogenados de hígado.

3.4.6.2. Para determinación de GSSG.

El proceso es idéntico al utilizado para la obtención de los homogenados de hígado.

3.4.6.3. Para determinación de XO-XDH.

El proceso es idéntico al utilizado para la obtención de los homogenados de hígado, con la salvedad de que en músculo gastrocnemio la relación debe ser de 1 ml. de tampón por cada 0,2 g. de tejido.

3.4.7. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Los fragmentos de hígado y músculo se fijaron con una solución de glutaraldehído 0,1 M. a pH 7,2 tamponado al 2,5 % en tampón fosfato a 4 °C. Tras dos horas se postfijaron en una solución de tetracloruro de osmio tamponada con tampón fosfato al 2 % durante otras dos horas. Después de incluir los bloques de tejido en epon, se realizaron cortes semifinos (0,5-1 μ m.) que se tiñeron con azul de toluidina, seleccionando las áreas más representativas de cada caso. A continuación se realizaron cortes ultrafinos mediante un ultramicrotomo, los cuales se trataron posteriormente con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se estudiaron y fotografiaron con el microscopio electrónico (Jeol Jem 1010).

3.4.8. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

3.4.8.1. Determinación de la actividad xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa.

3.4.8.1.1. En plasma.

Se sigue un método fluorimétrico descrito por Beckman y cols. (1989). Este método está basado en la monitorización fluorimétrica de la formación de isoxantopterina a partir de pterina. Para la determinación de la forma oxidasa se utiliza como aceptor de electrones al oxígeno. Para la determinación conjunta de la oxidasa y deshidrogenasa se utiliza el azul de metileno como aceptor de electrones.

3.4.8.1.1.1. Reactivos.

- Tampón fosfato 50 mM., EDTA 0.1 mM., pH 7,4.
- Pterina (2-amino-4-hidroxipteridina) 1 mM. Se pesan entre 3 y 4 mg. de pterina y se resuspenden inicialmente en 100 μ l. de NaOH 1 M. Una vez disuelta se le añade el agua necesaria para alcanzar una concentración de 1 mM. Esta solución es estable durante 1 ó 2 días a T^a ambiente.
- Isoxantopterina 1 mM. Se pesan entre 3 y 4 mg. de isoxantopterina y se resuspenden inicialmente en 100 μ l. de NaOH 1 M. Una vez disuelta se le añade el agua necesaria para alcanzar una concentración de 1 mM. A partir de esta solución se diluye hasta alcanzar una concentración de 10 μ M. La concentración exacta de isoxantopterina se determina espectrofotométricamente a 336 nm., debiendo estar entre 8 y 13 μ M. Esta solución se ha de preparar y valorar diariamente.
- Azul de metileno 1 mM. en agua. Esta solución se puede conservar congelada.
- Alopurinol 1 mM en agua. Esta solución se realiza directamente a 1 mM. Para conseguir una perfecta disolución se ha de preparar en agitación y calentándose. Una vez disuelta se separan alícuotas que se pueden conservar congeladas.

3.4.8.1.1.2. Procedimiento.

La formación de isoxantopterina se sigue fluorimétricamente a 345 nm. de excitación y 390 nm. de emisión.

Todo el proceso se realiza con el fluorímetro termostatzado a 37 °C.

Añadimos en una cubeta de cuarzo 25 µl. de muestra y tampón fosfato 50 mM., EDTA 0.1 mM., pH 7,4, hasta un volumen final de 2 ml. Se sigue la emisión de fluorescencia a 345 nm. de excitación y 390 nm. de emisión durante un minuto. Luego se añaden 20 µl. de una solución de pterina 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante 2 minutos. Esta pendiente nos indica la actividad xantina oxidasa. Luego añadimos 20 µl. de una solución de azul de metileno 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante dos minutos. Esta pendiente nos indica la actividad total xantina oxidoreductasa. Añadimos 20 µl. más de una solución de alopurinol 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante un minuto. No debe variar la fluorescencia, pues el alopurinol inhibe tanto la xantina oxidasa como la deshidrogenasa. Después se realiza una medida puntual que se utilizará como blanco para la calibración de la isoxantopterina. Se añaden 20 µl. de una disolución de isoxantopterina 10 µM. Se realiza otra medida puntual. Obtendremos el incremento de fluorescencia debido a la isoxantopterina. La isoxantopterina se utiliza como patrón interno en esta determinación.

3.4.8.1.1.3. Cálculos.

Para calcular la actividad, la unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un µmol. de isoxantopterina por minuto. En el plasma la expresamos en unidades por litro de plasma.

Para la actividad xantina oxidasa:

$$U = (\Delta F/\text{min.}) \times \frac{[\text{Isoxantopterina}] \times 0.02 \quad V_{\text{final}}}{2.08 \times 1000 \times F_{\text{isoxantopterina}} \quad V_{\text{muestra}}}$$

Siendo:

$\Delta F/\text{min.}$ es la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir la pterina.

$[\text{Isoxantopterina}]$ es la concentración de isoxantopterina.

$F_{\text{isoxantopterina}}$ es el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la isoxantopterina.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (2,02 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,025 ml.).

Para la actividad total xantina oxidoreductasa:

$$U = (\Delta F/\text{min.}) \times \frac{[\text{Isoxantopterina}] \times 0.02 \quad V_{\text{final}}}{2.08 \times 1000 \times F_{\text{isoxantopterina}} \quad V_{\text{muestra}}}$$

Siendo:

$\Delta F/\text{min.}$ es la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir el azul de metileno.

[Isoxantopterina] es la concentración de isoxantopterina.

$F_{\text{isoxantopterina}}$ es el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la isoxantopterina.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (2,04 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,025 ml.)..

Para la actividad xantina deshidrogenasa:

La actividad xantina deshidrogenasa se calcula restando la actividad xantina oxidasa a la actividad total xantina óxidoreductasa.

3.4.8.1.2. En homogenado de hígado.

El proceso es el mismo que en plasma, con la salvedad de que el volumen de muestra es de 20 $\mu\text{l.}$, y el resultado se expresa en función de la concentración de proteínas.

3.4.8.1.3. En homogenado de músculo gastrocnemio.

El proceso es el mismo que en plasma, con la salvedad de que el volumen de muestra es de 100 $\mu\text{l.}$, y el resultado se expresa en función de la concentración de proteínas.

3.4.8.1.4. En homogenado de aorta.

El proceso es el mismo que en músculo gastrocnemio.

3.4.8.1.5. En líquido eluido de la perfusión de hígado.

El proceso es el mismo que en plasma, con la salvedad de que el volumen de muestra es de 950 μ l., y el resultado se expresa en función de la concentración de proteínas.

3.4.8.2. “*Western blot*” de xantina óxidoreductasa (XOR) en homogenado de músculo gastrocnemio y aorta.

3.4.8.2.1. Reactivos.

- Gel de electroforesis.
 - “*Running Gel*” al 12% (5,62 ml.): 2,24 ml. de Acrilamida-Bisacrilamida 29:1, SDS al 10 %, 0,74 ml. de Tris-TEMED, 2,56 ml. de agua, APS al 10 %.
 - “*Stacking Gel*” al 4,5 % (5,0 ml.): 0,75 ml. de Acrilamida-Bisacrilamida 29:1, SDS al 10 %, 0,73 ml. de Tris-TEMED, 2,56 ml. de agua, 0,002 ml. de TEMED, APS al 10 %.
- Tampón de electroforesis (“*Running Buffer*”).
 - Tampón Tris 25 mM., glicina 0,2 M., SDS 1 % w/v.
- Tampón de transferencia (“*Transfer Buffer*”).
 - Tampón Tris 25 mM., glicina 0,2 M., metanol al 20 % v/v. (pH 8,3-8,5)
- Tampón de la muestra (“*SDS Sample Buffer*”).
 - Tampón Tris-HCl 6,25 mM. (pH 6,8 @ 25 °C.), SDS 2 % w/v., glicerol 10 %, DTT 50 mM. Azul de bromofenol al 0,1 % w/v.
- Tampón de bloqueo (“*Blocking Buffer*”).
 - TBS 1x, Tween-20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) al 0,1 %, leche en polvo desnatada al 5 % w/v. (Añadir 1 g de leche a 20 ml de TBST). Cuando se use debe estar a T^a ambiente.
- 10 x TBS (“*Tris Buffered Saline*”). (Se utiliza a 1x).
 - Se prepara 1 l. De TBS 10x diluyendo 24,2 g. de Tris base, 80 g. de NaCl y se ajusta a pH 7,6 con HCl.
- Tampón de lavado TBST (“*Wash Buffer*”).

TBS 1x, Tween-20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) al 0,1 %,

- Detección del “*Western Blot*”.

Marcador de proteínas biotiniladas, Anticuerpo secundario (“*anti-rabbit*”) conjugado a peroxidasa (HRP) de la casa Roche[®], Anticuerpo antibiotina conjugado al HRP, Reactivo quimioluminiscente LumiGLO[®], peróxido. El anticuerpo primario anti xantina oxidasa es un anticuerpo policlona suministrado por la casa Chemicon[®].

- Tampón de dilución del anticuerpo primario.
0,5 g. de BSA en 10 ml. de TBST.
- Soluciones de Revelado.

3.4.8.2.2. Procedimiento.

➤ Preparación del gel.

El primer paso es la preparación de un gel de 0.75 mm. de espesor. Para la preparación del “*Running Gel*” se disuelven los reactivos en el orden en el que se ha especificado en el apartado anterior. Con la ayuda de una jeringa de 2 ml. sin aguja se rellena el espacio de 0,75 mm. que queda entre los cristales para la preparación de este gel dejando espacio en la parte superior para el “*Stacking Gel*”. Este espacio superior se rellena con butanol con la ayuda de una pipeta de 1 ml. y se espera 24 horas para que solidifique el gel.

Posteriormente se prepara el “*Stacking Gel*” disolviendo los reactivos en el orden en el que se ha especificado en el apartado anterior. Se decanta el butanol que se había colocado en la parte superior del “*Running Gel*” en su lugar se pone el “*Stacking Gel*”, dentro del cual se introduce el “peine” para modelar los 10 pocillos, y se espera 3 horas para que solidifique este gel.

Por último, se lavan los pocillos con “*Running Buffer*” y ya está preparado para cargar las muestras.

- Preparación de las muestras.

Las muestras son de homogenado de músculo gastrocnemio y de aorta cuyo procesado se ha explicado previamente. Tras haber medido la concentración de proteínas en el homogenado, se calcula el volumen de muestra que hay que poner para que en el pozillo haya 30 µg. de proteínas. El doble de dicho volumen se diluye 1:1 con “SDS *Sample Buffer*”, lo cual se calienta a 95-100 °C. durante 5 minutos y se enfría rápidamente en hielo para desnaturalizar las proteínas. Se centrifuga durante 5 minutos para agrupar toda la muestra y de ésta se deposita en cada pocillo el volumen que contiene 30 µg. de proteínas (como lo habíamos disuelto 1:1 “SDS *Sample Buffer*”, ahora el volumen será el doble del calculado inicialmente antes de diluirlo).

Uno de los pocillos se reservará para el marcador de peso molecular, el cual se trata como una muestra, diluyéndolo 1:1 con 15 µl. de “SDS *Sample Buffer*”.

- Electroforesis vertical.

Una vez cargados las muestras se inicia la electroforesis con el gel sumergido en “*Running Buffer*” a 90 mV. Hasta que el frente de la electroforesis se ha salido del gel, ya que las bandas que da la XOR tienen un alto peso molecular.

- Transferencia.

Tras la electroforesis, se elimina el “*Stacking Gel*” y se sumerge el gel en “*Transfer Buffer*” para eliminar los restos de “*Running Buffer*”, de sales y detergentes generados durante la electroforesis, y para que el gel adopte su tamaño definitivo. El “*Transfer Buffer*” ha de estar frío a 4 °C.

Se corta una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel y se marca con un lápiz para identificar la orientación del gel. Se moja la membrana introduciéndola lentamente con un ángulo de 45 ° en “*Transfer Buffer*” y se deja que se empape durante 15-30 minutos. Es importante este paso porque si la membrana se moja demasiado rápido puede atrapar burbujas de aire que pueden interferir en la transferencia. Todo este proceso se debe realizar con guantes o pinzas para evitar la contaminación de la membrana.

Se deben preparar también 2 papeles de filtro del tamaño de la membrana, los cuales también se deben mojar.

Antes de colocar la membrana en el “*cassette*” se deben mojar las láminas de fibra.

Con el “*cassette*” abierto con su parte negra horizontal, se coloca una de las láminas de fibra mojada sobre dicha parte, luego se coloca encima uno de los papeles de filtro, mojándolo por encima con “*Transfer Buffer*” y pasándole cuidadosamente un rodillo para eliminar las posibles burbujas de aire. Se moja con más “*Transfer Buffer*” y se coloca encima el gel. Enzima de éste se ubica la membrana de nitrocelulosa, mojándolo más y pasando el rodillo. Se coloca encima el otro papel de filtro, se moja y se pasa el rodillo, y por último se coloca la otra lámina de fibra que también se moja y se eliminan las burbujas.

Una vez realizado este proceso se cierra el “*cassette*” y se coloca en la camarilla de la electroforesis, con la parte negra de aquél en el mismo lado que la parte negra de la camarilla y se rellena la camarilla con “*Transfer Buffer*” frío. Todo el recipiente de electroforesis se sumerge en hielo y se inicia el paso de corriente a 100 mV. durante 1 hora.

- Bloqueo de la membrana e incubación con los anticuerpos.

Una vez realizada la transferencia, se extrae la membrana de nitrocelulosa y se lava con 25 ml. de TBS durante 5 minutos a T^a ambiente.

Posteriormente se incuba con 25 ml de “*Blocking Buffer*” durante 1-3 horas a temperatura ambiente o a 4 °C. durante 12 horas.

El siguiente paso es incubar la membrana con el anticuerpo primario (se diluyen 2,5 µl. de anticuerpo en 5 ml. de tampón de dilución del anticuerpo primario) durante 12 horas con agitación suave a 4 °C.

Se lava tres veces durante 5 minutos cada una con 15 ml. de TBST.

Se incuba la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (2,5 µl. de anticuerpo en 5 ml. de “*Blocking Buffer*”) y con el anticuerpo antibiotina conjugado al HRP (5 µl. de anticuerpo en los 5 ml. de “*Blocking Buffer*”) durante 1 hora con agitación suave a temperatura ambiente.

Se lava tres veces durante 5 minutos cada una con 15 ml. de TBST.

- Detección de proteínas.

La membrana se incuba con 5 ml de Reactivo quimioluminiscente LumiGLO[®] y peróxido disuelto en agua (0,25 ml. de Reactivo quimioluminiscente LumiGLO[®] y 0,25 ml. de peróxido en 4,5 ml. de agua) durante 1 minuto a T^a ambiente.

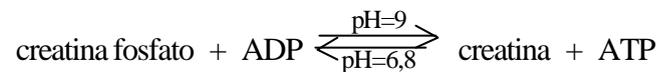
Se seca la membrana del exceso de solución, se envuelve en plástico tipo “film” y se expone a papel fotográfico durante el tiempo necesario para que se revele éste.

3.4.8.2.3. Cálculos.

El film revelado se “escaneó” para poder analizar la densidad de las bandas con el programa TotalLab[®] v1.11.

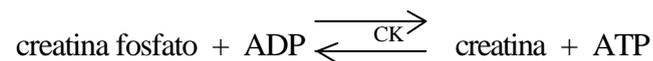
3.4.8.3. Determinación de la actividad creatina kinasa (CK).

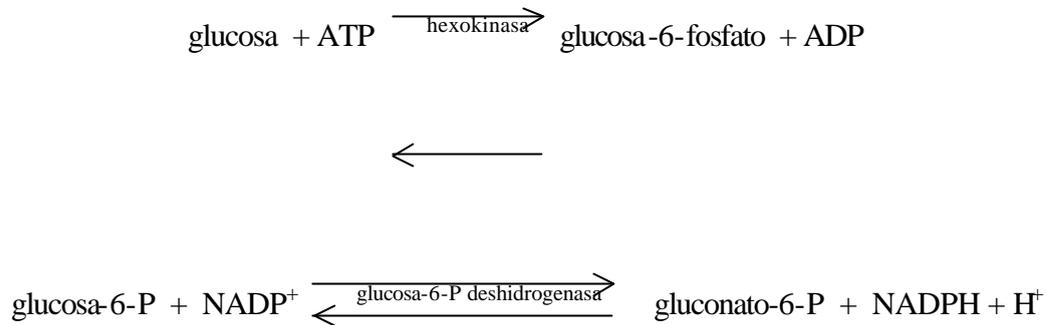
La creatina kinasa (E. C. 2.7.3.2) es una enzima intracelular, ampliamente distribuida en los tejidos del organismo. Su función fisiológica está asociada con la generación de adenosinatrifosfato (ATP). La CK cataliza la fosforilación reversible de la creatina, reacción en la cual el ATP actúa como dador del grupo fosfato. La reacción es la siguiente:



Tal como se puede observar, la reacción es dependiente del pH, y si éste es neutro, se favorece la formación de ATP.

Se sigue un método espectrofotométrico, descrito por Szasz y cols. (Szasz y cols., 1976) que detecta la interconversión NADPH-NADP⁺, siendo un método estándar optimizado de la ‘*Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie*’, basado en las siguientes reacciones:





La muestra se obtiene a partir de la sangre mediante centrifugación a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido es la muestra que utilizaremos para la determinación.

La medición se realiza con el espectro atemperado a 37 °C., a una longitud de onda de 340 nanómetros. En una microcubeta se ponen 1150 µl. de reactivo comercial Boehringer Mannheim® que a su vez ha estado atemperado durante 1 minuto, al cual se le añaden 23 µl. de muestra. Se deja uncubando durante 1 minuto y se determina el aumento de la absorbancia a 340 nm. durante los 3 minutos siguientes.

Los cálculos se realizan a partir de la variación de absorbancia por minuto en cada lectura y se calcula el valor de la actividad en U/l a partir de la siguiente ecuación:

$$U/l = (\text{variación de la absorbancia} / \text{minuto}) \times 8095$$

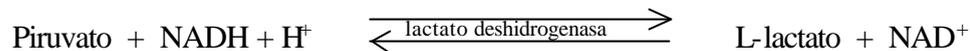
El factor 8095 tiene en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADH, el volumen final de la cubeta, así como el volumen de muestra empleado.

Se debe tener en cuenta que la actividad de esta enzima disminuye un 2% tras siete días a 4 °C ó 24 horas a 25 °C.

3.4.8.4. Determinación de la actividad láctico deshidrogenasa (LDH).

La láctico deshidrogenasa (E. C. 1.1.1.27) es una enzima presente en todas las células del organismo, que cataliza la conversión de piruvato en lactato.

Se sigue un método espectrofotométrico descrito por Keiding y cols. (Keiding y cols., 1974), que detecta la interconversión NADH-NAD⁺, siendo un método estándar optimizado de la “Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie”, basado en las siguientes reacciones:



La muestra se obtiene a partir de la sangre mediante centrifugación a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido es la muestra que utilizaremos para la determinación.

La medición se realiza con el espectro atemperado a 37 °C, a una longitud de onda de 340 nanómetros. En una microcubeta se ponen 1440 μlitros de reactivo comercial Boehringer Mannheim[®] que a su vez ha estado atemperado durante 1 minuto, al cual se le añaden 24 μlitros de muestra. Se deja uncubando durante 30 segundos y se determina el aumento de la absorbancia a 340 nm. durante los 3 minutos siguientes.

Los cálculos se realizan a partir de la variación de absorbancia por minuto en cada lectura y se calcula el valor de la actividad en U/l a partir de la siguiente ecuación:

$$U/l = (\text{variación de la absorbancia} / \text{minuto}) \times 9683$$

El factor 9683 tiene en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADH, el volumen final de la cubeta, así como el volumen de muestra empleado.

Se debe tener en cuenta que la actividad de esta enzima disminuye tras tres días y que la hemólisis interfiere en el test.

3.4.8.5. Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).

3.4.8.5.1. En sangre.

Para la determinación de la concentración de GSH se ha seguido el método de Brigelius (Brigelius y cols., 1983), basado en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro 2,4-dinitrobenzeno. Esta reacción está catalizada por la glutatión-S-transferasa. El aducto formado, el 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm.

3.4.8.5.1.1. Reactivos.

- Tampón fosfato sódico, 0,1 M a pH 7,0 que contiene ácido etilen-diamino tetraacético (EDTA), 1 mM.
- Cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 mM, disuelto en etanol al 100 %.
- Glutatión-S-transferasa. Se prepara una solución de 500 U/ml en tampón fosfato sódico 0,1 M EDTA, 1 mM, pH 7,4. Esta solución se dializa durante 6 horas en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada dos horas. Una vez preparada la solución se conserva a -20°C hasta su utilización.

3.4.8.5.1.2. Procedimiento.

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

.825 ìl. de fosfato potásico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0.

.25 ìl. del sobrenadante ácido de la muestra.

.10 ìl. de la solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.

Se realiza un autocero (ha de tenerse en cuenta que la absorbancia de la línea de base debe ser estable) y se dispara la reacción añadiendo 10 ìl. de glutatión-S-transferasa. Se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción.

3.4.8.5.1.3. Cálculos.

Para hallar la concentración de GSH

$$\text{ì M./ml.} = (\Delta\text{OD}) \times \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{muestra}}} \times \frac{1}{9,6} \times 2$$

Siendo:

ΔOD es la variación de absorbancia observada tras añadir la transferasa.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (0,870 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,025 ml.).

1/96 es el coeficiente del CDNB.

2 es la inversa de la dilución que hacemos al mezclar la sangre inmediatamente tras su extracción con el ácido.

3.4.8.5.2. En homogenado de hígado.

El proceso es similar a la medición en sangre, con la salvedad de que en los cálculos hemos de tener en cuenta las condiciones de realización del homogenado.

Para hallar la concentración de GSH:

$$(\Delta\text{OD}) \times \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{muestra}}} \times \frac{1}{9,6} \times 5 \times 0,25$$

$$\text{ì M./mg. prot.} = \frac{\text{-----}}{[\text{Proteínas}]}$$

Siendo:

ΔOD es la variación de absorbancia observada tras añadir la transferasa.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (0,870 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,025 ml.).

1/96 es el coeficiente del CDNB.

0,25 son los 250 ìl. de ácido que añadimos a las mitocondrias.

[Proteínas] es la concentración de proteínas (mg.prot./ml.) en la dilución de las mitocondrias en ácido.

3.4.8.5.3. En homogenado de músculo gastrocnemio.

El proceso es similar a la medición en homogenado de hígado.

3.4.8.6. Determinación de la concentración de glutatión oxidado (GSSG).

3.4.8.6.1. En sangre.

Para la determinación de la concentración de GSSG se ha seguido el método descrito por Asensi (Asensi y cols., 1994). Este método está basado en la separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa de los dinitrofenil derivados y su posterior detección a 365 nm. Para evitar la autooxidación del GSH, se bloquean los grupos tioles con N-etilmaleimida (NEM).

3.4.8.6.1.1. Reactivos.

- γ glutamilglutamato 1 mM en PCA, 0,3 %. Es el patrón interno y debe estar calibrado previamente respecto a concentraciones conocidas de GSSG.
- KOH 3M, ácido 3-N-morfolino propensulfónico (MOPS), 0,3 M.
- 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno 1 % en etano absoluto.
- Eluyente A: es una solución de metanol al 80 %.
- Eluyente B: es una solución de acetato sódico 0,5 M en metanol al 64%. Se parte de una solución madre acético/acetato que se prepara disolviendo 272 gr. De acetato sódico trihidratado en 122 ml de agua y 372 ml de ácido acético glacial. El eluyente B está formado por un 80% de eluyente A y un 20 % de la solución madre acético/acetato.

3.4.8.6.1.2. Procedimiento.

Para derivatizar la muestras, a 0,2 ml. de sobrenadante ácido de la muestra se añaden 20 μ l. de la solución de γ -glutamylglutamato 1 mM en PCA, 0,3 %. Posteriormente se añaden 0,5 μ l. de indicador universal y se lleva a pH 6,5-9 con KOH 3M, MOPS 0,3 M. A continuación se centrifuga a 15000 g durante 5 min a 4

°C. Se toman 25 ìl. de sobrenadante y se pasan a un tubo pequeño de vidrio (pico-tag) que contiene 50 ìl. de la solución de fluorodinitrobenceno al 1 % en etano. Se incuba durante 45 min. a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, se deseca a vacío hasta 70 miliTorr. Llegado a este punto, las muestras son estables a -20 °C durante varias semanas. Antes de inyectarlo en el H. P. L. C., el precipitado se resuspende en 50 ìl. de eluyente A.

En la fase móvil de la cromatografía, el flujo es constante a 1 ml./min. La elusión del GSSG se realiza en gradiente: la fase móvil se mantiene durante 5 min. A un 80 % del eluyente A y 99 % del B durante 15 min. En estas condiciones se mantiene de 5 a 10 min., hasta que se eluya el último compuesto, el GSSG. Posteriormente se recupera la columna a las condiciones iniciales durante 15 min.

En la fase estacionaria se utiliza una columna Spherisorb aminada. Las dimensiones de la columna son de 20 x 0,46 cm. El tamaño de partícula de relleno es de 5 ìm.

La detección de los dinitrofenil derivados se realiza con un detector ultravioleta visible a 365 nm.

3.4.8.6.2. En homogenado de hígado.

El proceso es similar al descrito para sangre.

3.4.8.6.3. En homogenado de músculo gastrocnemio.

El proceso es similar al descrito para sangre y homogenado de hígado, con la diferencia de que el precipitado se resuspende en 150 ìl. de eluyente A, de forma que de estos, el aparato inyecta 80 ìl.

3.4.8.7. Determinación de la producción de radical superóxido en aorta de rata.

Se ha utilizado el método desarrollado por White y cols. (1996). Este método se basa en la cuantificación de fotones emitidos por la lucigenina al interaccionar con el radical superóxido. Para la cuantificación de fotones hemos utilizado un contador â, operando en la forma Contaje Simple de Fotones.

3.4.8.7.1.1. Reactivos.

- PBS. Es un tampón fosfato sódico 5 mM. pH 7,4, NaCl 9 g./litro.
- Lucigenina. Se prepara una solución 1,25 mM. en PBS.
- Xantina. Se prepara una solución 0,25 mM. en PBS. Para ello se pesan 7,6 mg. Y se disuelven en 1 ml. de NaOH 0,1 N. Una vez disuelta, se añaden 199 ml. de PBS y se agita bien.
- Alopurinol. Se prepara una solución 0,25 mM. en PBS. Para ello, se pesan 6,8 mg. Y se disuelven en 1 ml. de NaOH 0,1 N. Una vez disuelta, se añaden 199 ml. de PBS y se agita bien.
- Medio Krebs-Henseleit con la siguiente composición:
 - NaCl 118mM.
 - KCl 4,6 mM.
 - NaHCO₃ 27,2 mM.
 - KH₂PO₄ 1,2 mM.
 - MgSO₄ 1,2 mM.
 - CaCl₂ 1,75 mM.
 - Na₂EDTA 0,03 mM.
 - Glucosa 1,11 mM.

Esta solución es gaseada previamente con una mezcla de CO₂:O₂ (5:95, v/v) durante 30 minutos hasta alcanzar un pH de 7,4.

- Xantina oxidasa 0,2 U/ml. Se prepara a partir de una suspensión comercial de 20 U/ml. con diluciones en PBS.
- Heparina 5 U/ml. Se prepara a partir de una presentación comercial de 5000 U/ml. de ROVI, diluida en PBS a una concentración de 1000 U/ml.

3.4.8.7.1.2. Procedimiento.

Todos los segmentos de la aorta de un mismo animal se colocaron en viales de centelleo que contenían 2 ml. de PBS, xantina 50 μ M. y lucigenina 0,25 mM., e inmediatamente se determinó la emisión de fotones durante 10 minutos en el contador \hat{a} .

En cada experimento realizamos un blanco, es decir, la emisión de luminiscencia en ausencia de arteria. También realizamos un control positivo, es

decir, la emisión de luminiscencia en viales que contienen una actividad conocida de xantina oxidasa (4 mU/ml.).

Determinamos también la luminiscencia en presencia de alopurinol a una concentración final de 100 μ M.

Asimismo determinamos también la luminiscencia de anillos aórticos incubados previamente en una concentración de heparina que teóricamente provocaba la liberación de xantina oxidasa pegada en el endotelio.

3.4.8.8. Determinación de la concentración de proteínas en plasma, homogenado de hígado, de músculo gastrocnemio y de aorta.

Se ha utilizado un “kit” de la casa Sigma basado en la modificación de Peterson del método de Lowry, que utiliza dodecilsulfato sódico, el cual está incluido en el reactivo de Lowry para facilitar la disolución de lipoproteínas relativamente insolubles. El tartrato cúprico alcalino del reactivo de Lowry se une a los enlaces peptídicos de las proteínas, dando lugar a un color azul purpúreo cuando el reactivo que lleva el fenol es posteriormente añadido. La absorbancia es leída a una longitud de onda de 660 nm., siendo el valor de la absorbancia indicativo de la concentración de proteínas de la muestra. La concentración de proteínas se determina a partir de una curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino (BSA) (Lowry y cols., 1951).

El procedimiento es el siguiente: se diluyen 20 μ l. de muestra en 980 μ l. de agua (previamente la muestra se debe agitar bien durante 2 minutos para que sea homogénea). Se hace un blanco de 1 ml. únicamente con agua. A continuación se añade 1 ml. de reactivo de Lowry tanto al blanco como a las muestras, y se agita bien. Seguidamente se incuba a T^a ambiente durante 20 minutos en oscuridad. Después se añaden 0,5 ml. de reactivo fenólico de Folin, tanto al blanco como a las muestras y se incuba durante 39 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo se mide la absorbancia a 660 nm. La concentración de proteínas en la muestra se determina a partir de la curva de calibración de la absorbancia en función de diferentes concentraciones de BSA. Para construir la curva de calibración, se sigue el mismo procedimiento para las diferentes concentraciones de BSA que para las muestras. En caso de medir proteínas

en muestras de mitocondrias se debe diluir previamente la muestra 1/7 en agua, y de esta dilución tomar los 20 μ l. En caso de medir proteínas de plasma la muestra se debe diluir previamente 1/10. En caso de medir proteínas de homogenado de músculo, la muestra se debe diluir previamente 1/2.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Todos los resultados presentados en esta tesis se expresan como valores de la media y la desviación típica, indicando el número de observaciones.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, al tratarse de más de dos grupos y con un nº de observaciones menor de 30, ha sido realizado utilizando pruebas no paramétricas para muestras independientes. Se realizó mediante dos pasos. En primer lugar se estudiaba si había algún grupo experimental que presentaba diferencias estadísticamente significativas con la prueba H de Kruskal-Wallis, y en caso de demostrarse diferencia por parte de alguno de los grupos, se utilizaba la prueba U de Mann-Whitney. Se compararon los grupos considerando dos niveles de significación: uno cuando $p < 0,05$ y otro cuando $p < 0,01$.

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el *software* SPSS 10.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. Los animales viejos se agotan antes que los animales jóvenes.

Se utilizó el mismo protocolo de agotamiento para los dos grupos experimentales sometidos a ejercicio físico, presentando el grupo joven un tiempo de agotamiento superior al grupo viejo en más de un 100 % ($p < 0,01$), por tanto, los animales viejos se agotan antes que los animales jóvenes (ver tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la edad sobre el tiempo de agotamiento.

	n	minutos
Agotado Joven	8	43,5 ± 8,39
Agotado Viejo	10	20,2 ± 3,27 ##

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “##” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo agotado joven.

4.2. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad creatina kinasa (CK) en plasma de animales jóvenes y viejos.

A pesar de que el tiempo de agotamiento es inferior en los animales viejos, la actividad creatina kinasa en plasma, un indicador de daño muscular, nos demuestran que el ejercicio físico agotador provoca el aumento de esta actividad en ambos grupos de edad en relación con sus respectivos controles de la misma edad no agotados ($p < 0,01$).

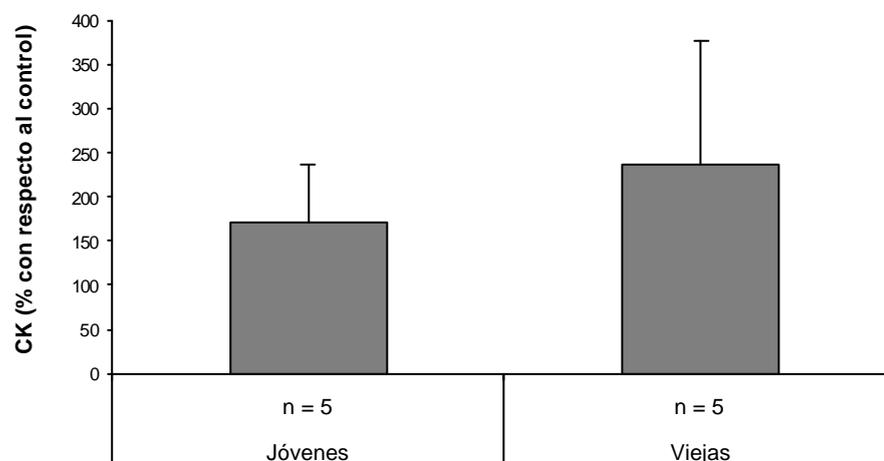
Tabla 8. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad CK en plasma de animales jóvenes y viejos.

	n	CK (U/L)
Control Joven	5	202 ± 60
Agotado Joven	5	321 ± 54 **
Control Viejo	5	195 ± 57 ##
Agotado Viejo	6	398 ± 85 ** †† #

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “##” una diferencia ($p < 0,01$) ambos con respecto al grupo agotado joven. El símbolo “††” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo control viejo.

A pesar de que, tal como se puede observar en la tabla 8, existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo Agotado Joven y el grupo Agotado Viejo ($p < 0,01$) y el aumento en los animales viejos (104 %) es mayor que en los jóvenes (59 %), la comparación de estos dos aumentos no llega a ser estadísticamente significativa.

Figura 15. Porcentaje de variación de la actividad CK en plasma de animales jóvenes y viejos agotados.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

4.3. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad láctico deshidrogenasa (LDH) en plasma de animales jóvenes y viejos.

Otro indicador de daño muscular que se utilizó fue la actividad LDH la cual

Tabla 9. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad LDH en plasma de animales jóvenes y viejos.

	n	LDH (U/L)
Control Joven	5	245 \pm 101
Agotado Joven	6	546 \pm 188 **
Control Viejo	5	411 \pm 202
Agotado Viejo	6	837 \pm 159 ** †† ##

*Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), con respecto al grupo control joven. El símbolo “##” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo agotado joven. El símbolo “††” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo control viejo.*

sigue un comportamiento similar al de la actividad CK. La LDH muestra además una tendencia a elevarse con la edad que no llega a ser estadísticamente significativa. En conjunto vemos que el ejercicio físico agotador provoca un aumento de los indicadores de daño muscular, alcanzando éstos niveles mayores en los animales viejos que en los jóvenes, a pesar de que la masa magra de los animales viejos suele ser menor que la de los animales jóvenes.

Tabla 10. Variación de la actividad LDH en plasma de animales jóvenes y viejos agotados.

	n	LDH (% de actividad con respecto al control)	
Joven	5	230 ±	74
Viejo	6	257 ±	150

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

4.4. Efecto del ejercicio físico agotador sobre las fibras de músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

Además de los indicadores bioquímicos, se estudiaron las muestras histológicas de hígado y músculo, tanto del grupo Agotado Joven como del grupo Agotado Viejo.

Las muestras musculares muestran cambios estructurales típicos de haber sometido el músculo a ejercicio físico tanto en el grupo agotado joven como en el grupo agotado viejo, aunque con las membranas íntegras y con las organelas dentro de los límites normales. El músculo de animales jóvenes agotados presenta áreas de degeneración mitocondrial preferentemente bajo el sarcolema. Los músculos viejos muestran cambios típicos del envejecimiento, con mayor nº de campos conteniendo células de pequeño tamaño, atróficas, con disminución de las miofibrillas y alteraciones nucleares.

Figura 16. Imagen obtenida con microscopio electrónico de músculo gastrocnemio de rata joven agotada. Detalle de las mitocondrias subsarcolémicas.

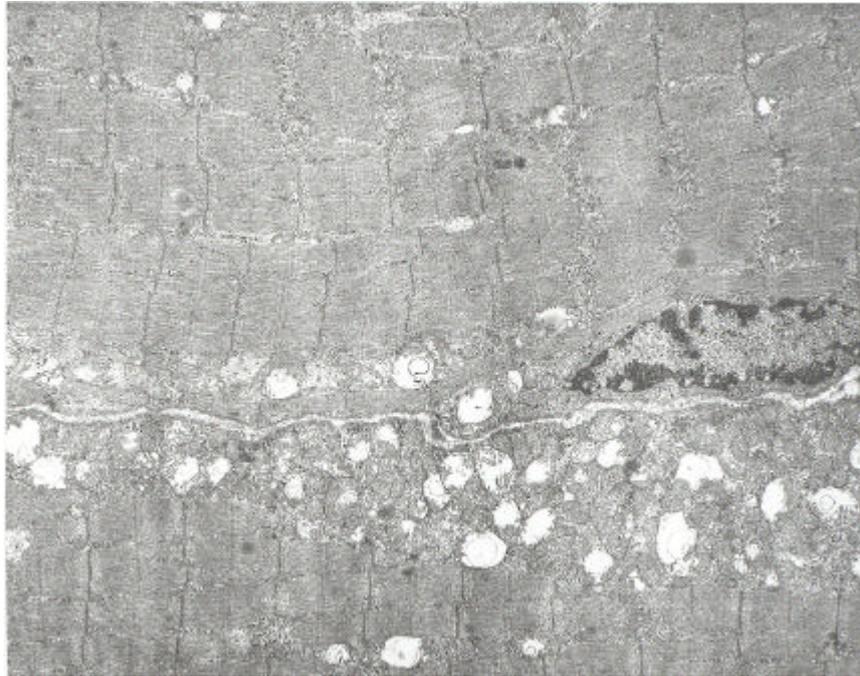


Figura 17. Electromicrografía de músculo gastrocnemio de rata joven agotada. Detalle de vasos sanguíneos entre las fibras.

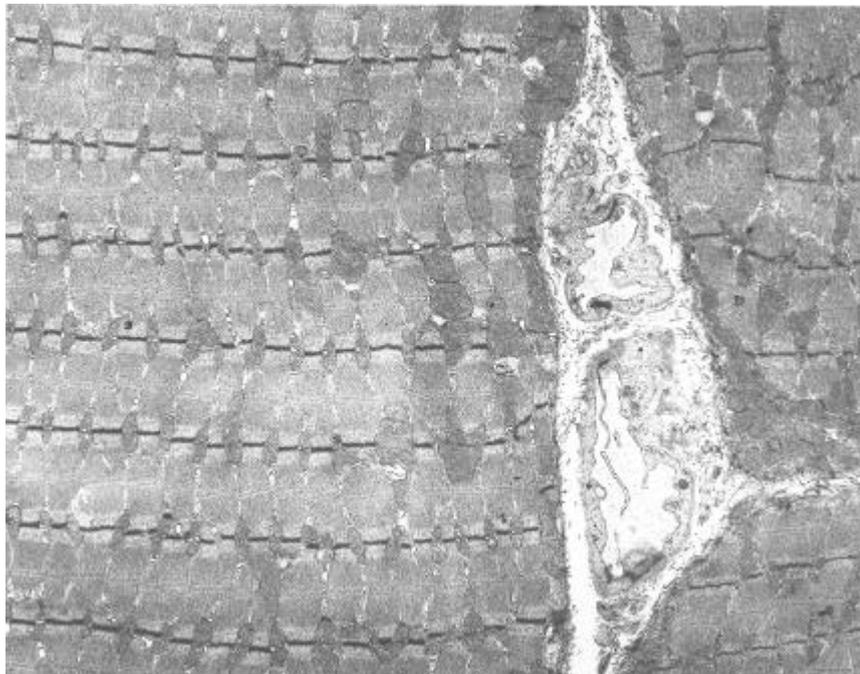
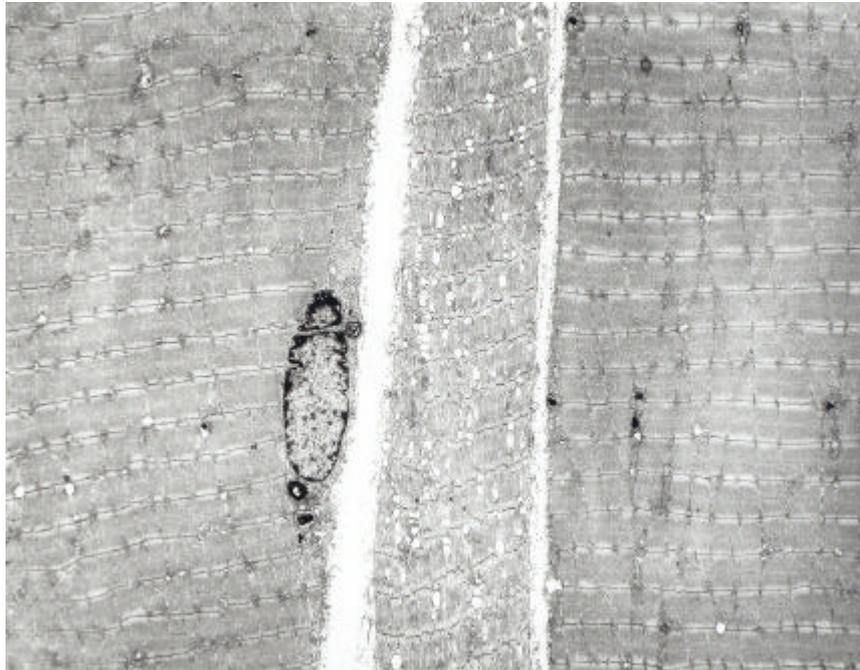


Figura 18. Imagen ultraestructural de músculo gastrocnemio de rata vieja agotada.
Detalle de una fibra degenerativa entre dos fibras normales.



4.5. Efecto del ejercicio físico agotador sobre las células hepáticas de animales jóvenes y viejos.

Las muestras hepáticas denotan los cambios típicos provocados en los hepatocitos por la edad, no observándose cambios estructurales atribuibles al efecto del ejercicio físico; sin embargo sí que posiblemente el ejercicio provoque una disminución del glucógeno citoplasmático en los hepatocitos jóvenes, en los cuales se observa un alta densidad mitocondrial y de retículo endoplásmico, sin prácticamente espacio citoplasmático. En el hígado de rata vieja se observa la heterogeneidad citológica, que es habitual, con núcleos simples o dobles de cromatina laxa, y una menor proporción de mitocondrias que en los hepatocitos jóvenes agotados. En cambio, el número de lisosomas es mayor.

Figura 19. Imagen obtenida con microscopio electrónico de hígado de rata joven agotada.

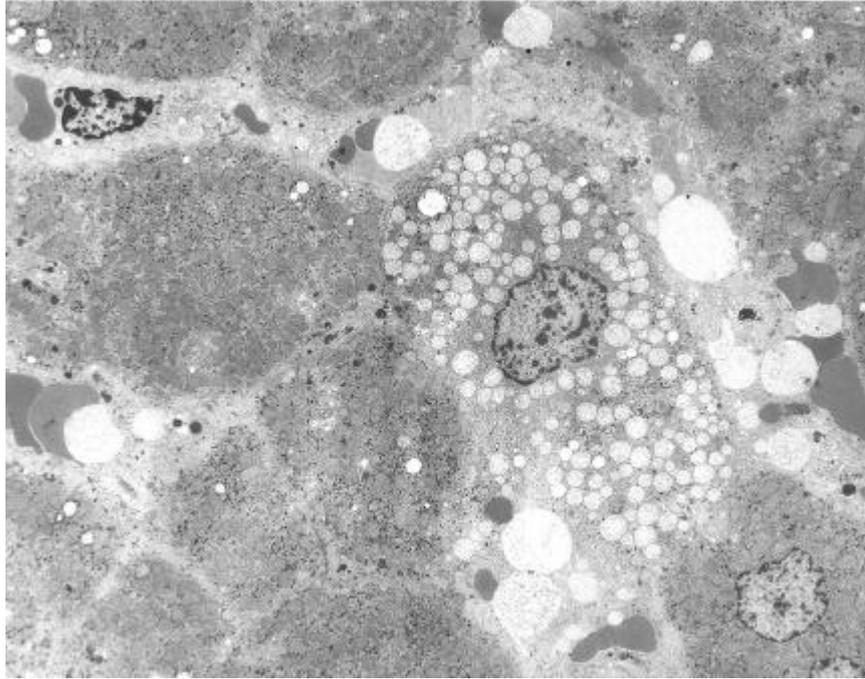
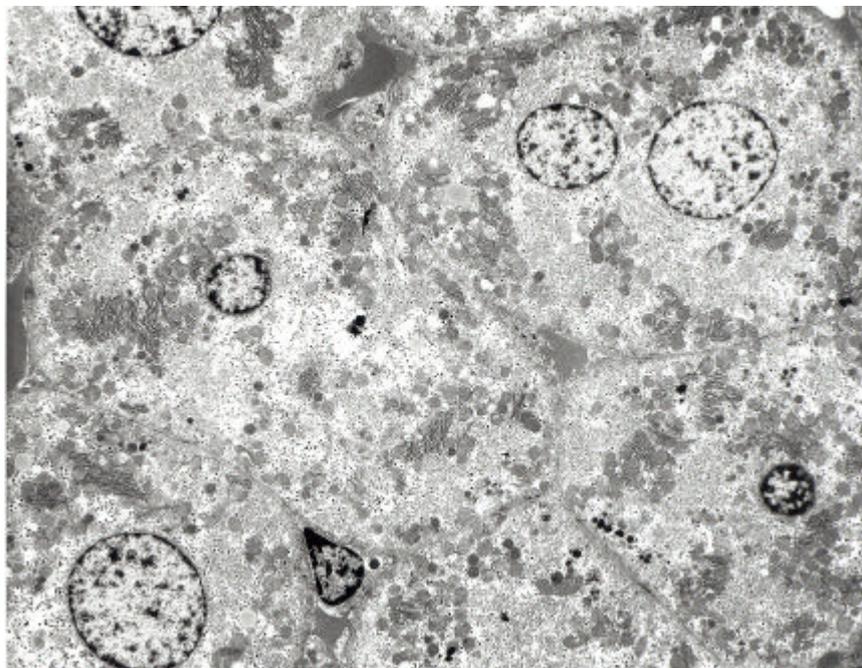


Figura 20. Imagen ultraestructural de hígado de rata vieja agotada.



4.6. Efecto del ejercicio físico agotador sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) y cociente GSSG/GSH en sangre de animales jóvenes y viejos.

Tanto el ejercicio físico agotador, como el proceso de envejecimiento se asocian a un aumento del estrés oxidativo. En ambos casos, y tal como se ha establecido en la introducción, este desplazamiento del estado “redox” general asociado a estos procesos podría estar implicado en las alteraciones musculares que provocan, tal como se evidencia por los indicadores de daño muscular y por las imágenes de microscopía electrónica. Para estudiar el efecto del ejercicio físico sobre el estrés oxidativo en animales jóvenes y viejos se determinó el estatus del glutatión en sangre, hígado, y músculo. Los resultados obtenidos en sangre fueron los que se muestran a continuación.

La concentración de GSH no muestra diferencia con el envejecimiento de forma basal. Por su parte, el ejercicio físico agotador tiene el efecto de consumir estas reservas de GSH tanto en el grupo Agotado Joven como en el grupo Agotado Viejo, y ligeramente más en este último, tal como se puede observar en la tabla 10 y en la figura 21, sin embargo ninguna de estas diferencias llega a ser significativa a nivel $p < 0,05$.

Tabla 11: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH en sangre de animales jóvenes y viejos.

	n	GSH (μ M/ml.)
Control Joven	5	0,473 \pm 0,194
Agotado Joven	4	0,443 \pm 0,120
Control Viejo	13	0,539 \pm 0,206
Agotado Viejo	6	0,344 \pm 0,169

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

La tabla 12 y la figura 21 nos muestran el comportamiento de la concentración de glutatión oxidado, el cual aumenta significativamente ($p < 0,01$) con la edad en

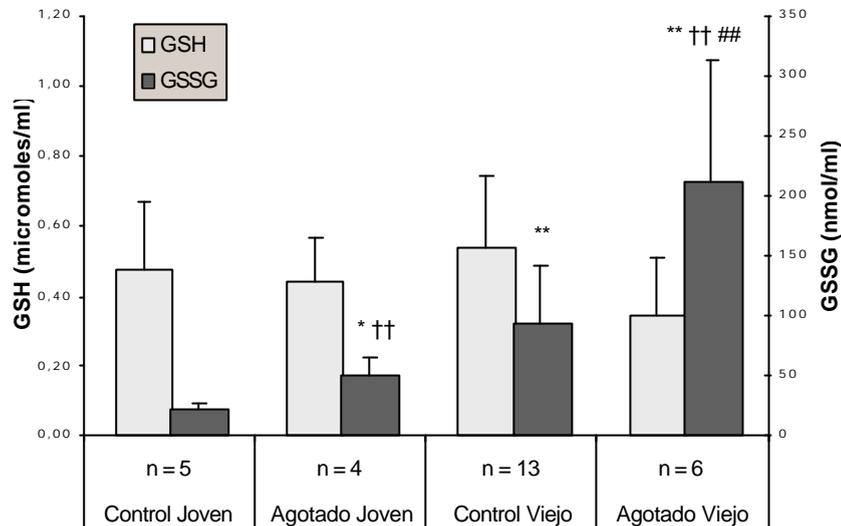
condiciones basales. Además, el ejercicio físico agotador en los animales jóvenes también provoca un aumento de GSSG del 120 % ($p < 0,05$), siendo el efecto del ejercicio igual de pronunciado en los animales viejos, en los que la concentración es un 125 % la concentración basal ($p < 0,01$). El aumento provocado por el ejercicio físico en los animales viejos no es estadísticamente diferente al provocado en los animales jóvenes.

Tabla 12: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSSG en sangre de animales jóvenes y viejos.

	n	GSSG (nM/ml.)	
Control Joven	5	22,68 ±	5,20
Agotado Joven	4	49,94 ±	13,82 * ††
Control Viejo	13	93,46 ±	48,46 **
Agotado Viejo	6	210,95 ±	104,09 ** †† ##

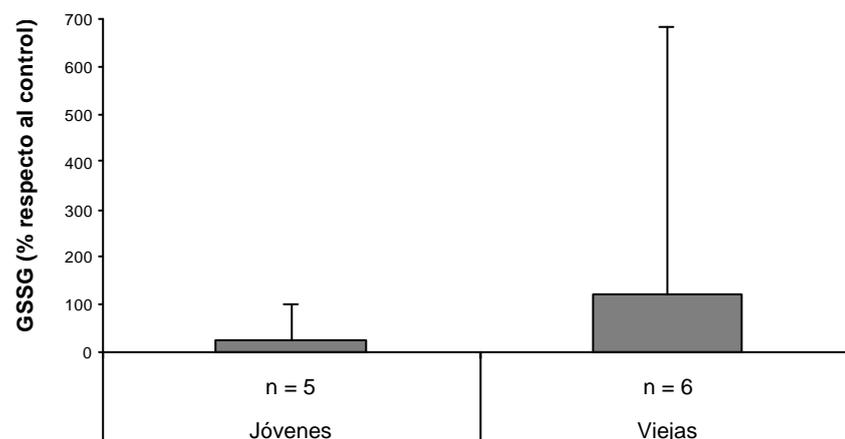
Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control joven. El símbolo “##” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo agotado joven. El símbolo “††” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo control viejo.*

Figura 21. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH y GSSG en sangre de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media \pm desviación e estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control joven. El símbolo “##” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo agotado joven. El símbolo “††” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo agotado joven.

Figura 22. Variación de la concentración de GSSG en sangre de animales jóvenes y viejos como consecuencia del ejercicio físico agotador.

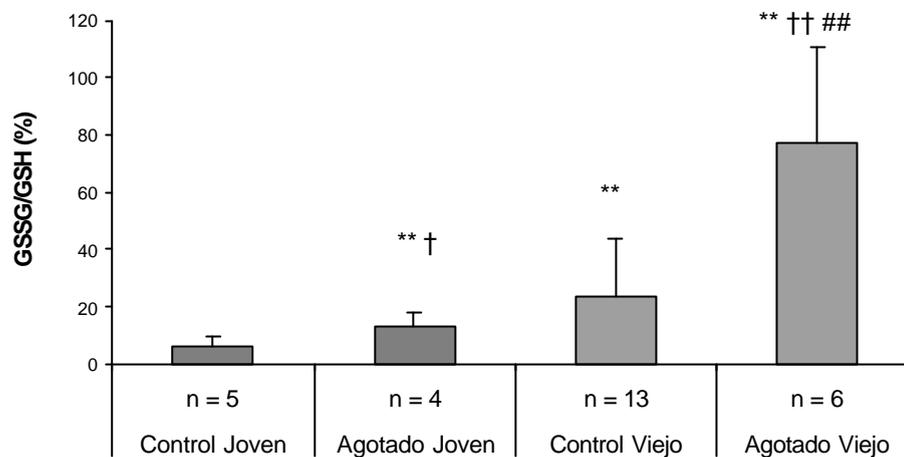


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

El comportamiento del cociente GSSG/GSH presenta un patrón similar al del GSSG, si bien la variación de la concentración del GSH con el ejercicio y con el envejecimiento ayuda a aumentar las diferencias existentes entre los distintos grupos. Con ello se pone de manifiesto que con el envejecimiento, el factor que hace aumentar el cociente es el aumento de GSSG, mientras que el GSH en condiciones basales no contribuye al aumento del cociente, dado que con la edad también aumenta un 14 %. Dado que el aumento del GSSG (87 %) es mayor que el del GSH (14 %), el primero es el que marca la tendencia del cociente.

Con el ejercicio físico, ambos factores contribuyen al aumento del cociente, es decir, tanto en los animales jóvenes como en los viejos el ejercicio físico agotador provoca una disminución de la concentración de GSH (6 % en el grupo Agotado Joven y 38 % en el grupo Agotado Viejo) y un aumento de la concentración de GSSG (120 % en el grupo Agotado Joven y 125,7 % en el grupo Agotado Viejo), el cual sigue siendo el factor más influyente. Ello hace que el aumento del cociente que se produce por el ejercicio físico sí sea diferente entre los animales jóvenes y viejos, es decir, el ejercicio físico agotador provoca un mayor aumento del cociente en los animales viejos (228 %) que en los animales jóvenes (124 %) , diferencia que es estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Figura 23. Efecto del ejercicio físico agotador sobre el cociente GSSG/GSH en sangre de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control joven. El símbolo “†” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “††” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control viejo. El símbolo “##” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo agotado joven.

4.7. Efecto del ejercicio físico agotador sobre los niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y cociente GSSG/GSH en hígado de animales jóvenes y viejos.

La tabla 13 nos muestra el comportamiento de la concentración de glutatión reducido (GSH), el cual no muestra variación ni con el envejecimiento ni con el ejercicio físico agotador.

Tabla 13: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH en hígado de animales jóvenes y viejos.

	n	GSH (μ M/mg.prot.)
Control Joven	6	5,74 \pm 0,58
Agotado Joven	4	5,97 \pm 0,98
Control Viejo	12	5,53 \pm 0,92
Agotado Viejo	5	6,17 \pm 1,03

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

En la tabla 14 y la figura 24 podemos observar el comportamiento de la concentración de glutatión oxidado, el cual sí se ve afectado significativamente con la edad ($p < 0,05$) en condiciones basales (grupo Control Joven vs Control Viejo). Sin embargo, el ejercicio físico agotador sólo afecta este parámetro en los animales jóvenes provocando un aumento de GSSG estadísticamente significativo ($p < 0,05$), no aumentando significativamente en los animales viejos, en los cuales ya está aumentado basalmente con respecto a los jóvenes.

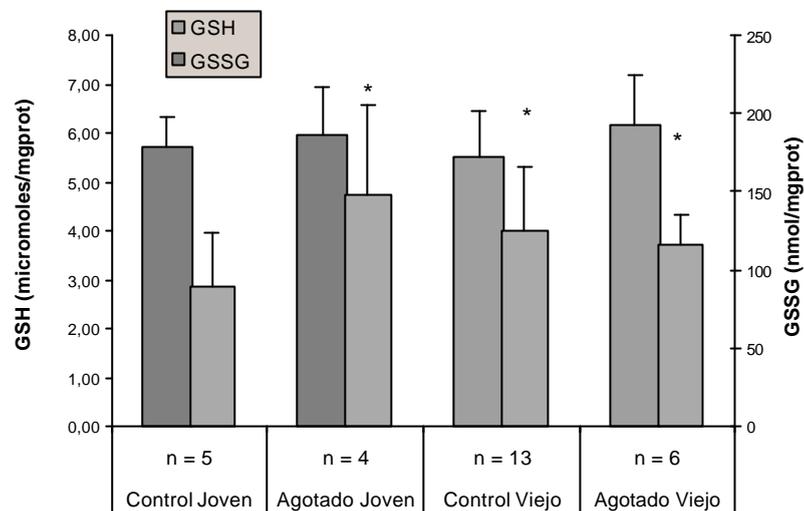
Tabla 14: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSSG en hígado de animales jóvenes y viejos.

	n	GSSG (nM/mg.prot.)
Control Joven	6	89,43 \pm 34,37
Agotado Joven	4	148,20 \pm 57,27 *
Control Viejo	12	125,68 \pm 40,64 *
Agotado Viejo	5	115,85 \pm 19,35 *

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven.*

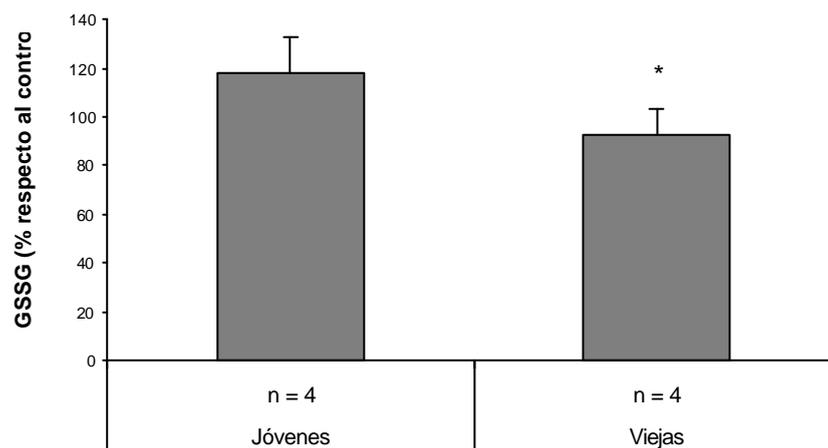
El comportamiento del cociente GSSG/GSH presenta un comportamiento similar al del GSSG. Con el envejecimiento, el factor que hace aumentar el cociente es el aumento de GSSG, mientras que el GSH en condiciones basales no contribuye

Figura 24. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH y GSSG en hígado de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven.

Figura 25. Variación de la concentración de GSSG en hígado de animales jóvenes y viejos agotados.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo joven.

al aumento del cociente. Con el ejercicio físico, también es el GSSG el que contribuye al aumento del cociente. El ejercicio físico en los animales viejos no provoca un aumento del cociente, aunque tanto el grupo Control Viejo como el grupo Agotado Viejo presentan valores superiores ($p < 0,05$) al grupo Control Joven (aumento del 43 %).

Tabla 15: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el cociente GSSG/GSH en hígado de animales jóvenes y viejos.

	n	GSSG/GSH (%)	
Control Joven	6	1,57	± 0,67
Agotado Joven	4	2,48	± 1,06 *
Control Viejo	12	2,25	± 0,72 *
Agotado Viejo	5	1,91	± 0,18 *

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven.*

4.8. Efecto del ejercicio físico agotador sobre los niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y cociente GSSG/GSH en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

La concentración de GSH muestra una tendencia a aumentar con la edad, lo cual significa que los animales viejos tienden a presentar una mayor protección antioxidante en forma de GSH. El ejercicio físico agotador no parece tener influencia en la concentración de esta molécula antioxidante, tal como se puede observar en la tabla 16. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Tabla 16: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	GSH (μ M/mg.prot.)
Control Joven	3	0,78 \pm 0,25
Agotado Joven	3	0,81 \pm 0,45
Control Viejo	6	0,90 \pm 0,36
Agotado Viejo	6	0,91 \pm 0,43

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

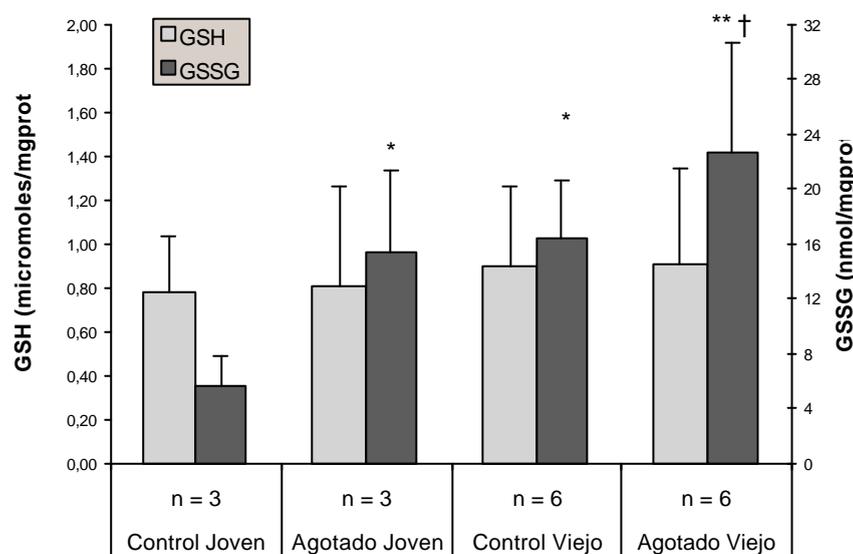
La tabla 17 y la figura 26 nos muestran el comportamiento de la concentración de glutatión oxidado, el cual aumenta significativamente ($p < 0,05$) un 195 % con la edad en condiciones basales. Además, el ejercicio físico agotador provoca un aumento de GSSG ($p < 0,05$) del 175 % en los animales jóvenes y de 37 % en los animales viejos. El incremento en los animales jóvenes tiende a ser mayor, aunque esta tendencia no llega a ser significativa.

Tabla 17: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSSG en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	GSSG (nM/mg.prot.)	
Control Joven	3	5,58	± 2,27
Agotado Joven	3	15,37	± 5,94 *
Control Viejo	6	16,49	± 4,11 *
Agotado Viejo	6	22,57	± 8,08 * †

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “†” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control viejo.

Figura 26. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la concentración de GSH y GSSG en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control joven. El símbolo “†” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control viejo.

El comportamiento del cociente GSSG/GSH presenta un comportamiento similar al del GSSG. Con ello se pone de manifiesto que con el envejecimiento, el factor que hace aumentar el cociente es el aumento de GSSG, superando la escasa influencia del GSH. Mientras que el GSH, en condiciones basales, no contribuye al aumento del cociente, dado que con la edad también aumenta un 15 %, es el aumento del GSSG (196 %) el que marca la tendencia del cociente.

Con el ejercicio físico, sólo el GSSG influye en el aumento del cociente, es decir, tanto en los animales jóvenes como en los viejos el ejercicio físico agotador provoca un aumento de la concentración de GSSG (175 % en el grupo Agotado Joven y 37 % en el grupo Agotado Viejo), el cual sigue siendo el factor más influyente, provocando un aumento del cociente del 139 % y del 36 % en los jóvenes y viejos respectivamente.

Tabla 18: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el cociente GSSG/GSH en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	GSSG/GSH (%)	
Control Joven	3	0,76 ±	0,16
Agotado Joven	3	1,82 ±	0,78 *
Control Viejo	6	2,43 ±	0,56 *
Agotado Viejo	6	3,30 ±	2,65 * †

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “†” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control viejo.*

4.9. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO) en plasma de animales jóvenes y viejos.

Tal como se puede observar en la tabla 19 y figura 27, la actividad xantina oxidasa en plasma aumenta un 27 % como consecuencia del ejercicio físico agotador sólo en los animales jóvenes, en los animales viejos, el ejercicio físico provoca un aumento del 12 % que no llega a ser estadísticamente significativo. Por su parte, el envejecimiento provoca un aumento del 25 % estadísticamente significativo ($p < 0,01$).

Tabla 19: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en plasma de animales jóvenes y viejos.

	n	XO (mU/ml)
Control Joven	21	5,74 ± 0,93
Agotado Joven	10	7,26 ± 2,04 *
Control Viejo	27	7,16 ± 1,68 **
Agotado Viejo	7	8,01 ± 3,01 **

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control joven.*

4.10. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina óxidoreductasa (XOR) y porcentaje de XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en hígado de animales jóvenes y viejos.

El hecho de que el ejercicio físico agotador tuviera una influencia en la actividad XO plasmática, y que el envejecimiento por sí mismo también la afectara, despertaron nuestra curiosidad respecto al origen de dicha actividad enzimática.

¿De dónde podía venir la enzima que provocaba este aumento de actividad enzimática en plasma? Para indagar en este sentido, decidimos averiguar el efecto del ejercicio físico agotador y el envejecimiento sobre la actividad xantina óxidoreductasa en el hígado, uno de los órganos que presenta una mayor cantidad de dicha enzima, tal como hemos podido ver en la introducción.

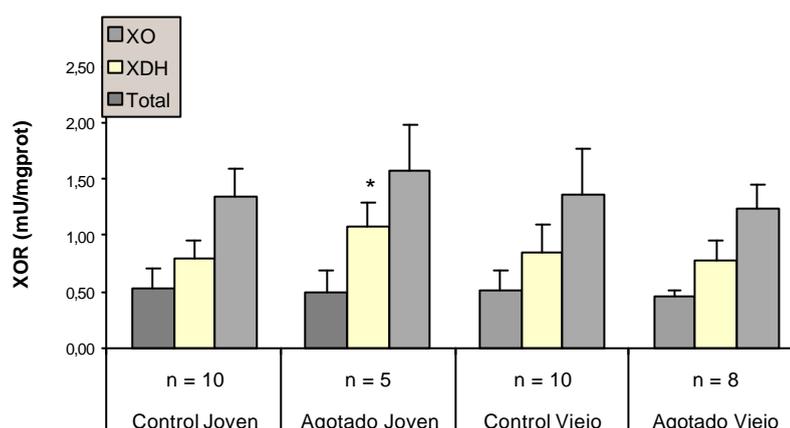
La tabla 20 y la figura 27 nos muestran que la actividad xantina oxidasa en el hígado no parece verse afectada ni por el ejercicio físico agotador ni por el envejecimiento, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ni tendencia alguna entre los grupos experimentales.

Tabla 20 : Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en hígado de animales jóvenes y viejos.

	n	XO (mU/mg.prot.)
Control Joven	10	0,538 ± 0,16
Agotado Joven	5	0,502 ± 0,19
Control Viejo	10	0,515 ± 0,18
Agotado Viejo	8	0,460 ± 0,05

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Figura 27. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidoreductasa (XO, XDH y Total) en hígado de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven.*

Sin embargo, en lo que se refiere a la xantina deshidrogenasa, encontramos una tendencia a aumentar por efecto del ejercicio físico agotador que llega a ser significativa ($p < 0,05$) en el grupo joven sometido a ejercicio con respecto a su correspondiente control. En el grupo viejo sin embargo, el ejercicio no provoca un aumento de la actividad xantina deshidrogenasa con respecto al control de la misma edad (Ver tabla 21 y figura 27).

Tabla 21: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina deshidrogenasa en hígado de animales jóvenes y viejos.

	n	XDH (mU/mg.prot.)
Control Joven	10	0,806 ± 0,16
Agotado Joven	5	1,070 ± 0,23 *
Control Viejo	10	0,848 ± 0,26
Agotado Viejo	8	0,770 ± 0,18 #

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.*

Tabla 22: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad total xantina oxidoreductasa en hígado de animales jóvenes y viejos.

	n	(XO+XDH) (mU/mg.prot.)
Control Joven	10	1,344 ± 0,25
Agotado Joven	5	1,573 ± 0,40
Control Viejo	10	1,362 ± 0,40
Agotado Viejo	8	1,230 ± 0,21

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

El porcentaje de la actividad enzimática que corresponde a la forma oxidasa con respecto a la actividad total sí llega a presentar diferencias estadísticamente significativas como resultado del ejercicio físico agotador en los animales jóvenes. Este resultado es consecuencia, sobretodo, del comportamiento de la actividad xantina deshidrogenasa, que tal como hemos visto en el párrafo anterior, aumenta significativamente en el grupo Agotado Joven (ver tabla 21).

Tabla 23: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total en hígado de animales jóvenes y viejos.

	n	Actividad XO en homogenado de hígado (% del total)
Control Joven	10	39,57 ± 7,88
Agotado Joven	5	31,05 ± 5,61 *
Control Viejo	10	37,77 ± 5,57
Agotado Viejo	8	37,88 ± 4,16

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven.*

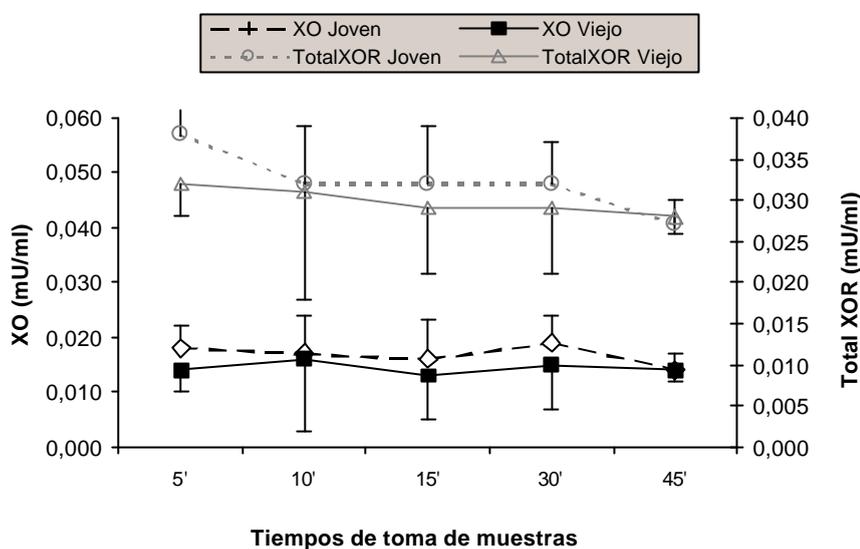
Tal como se puede observar en la tabla 23 y figura 27, la actividad total xantina óxidoreductasa en hígado muestra una tendencia a verse afectada por el ejercicio físico sólo en el grupo joven, en el que el ejercicio físico agotador provoca una clara tendencia al aumento de la actividad total, que no llega a ser significativa por muy poco. Sin embargo, el envejecimiento no tiene efecto sobre la actividad total XOR mostrando valores muy similares en ambos grupos controles, el Control Joven y el Control Viejo.

4.11. Efecto del envejecimiento sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina óxido-reductasa (XOR) y porcentaje de XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en eluato de perfusión de hígado de animales jóvenes y viejos.

El hecho de que el ejercicio físico agotador aumentara la actividad enzimática XDH sólo en jóvenes podría explicar, al menos en parte, el aumento de la actividad XO en plasma. Sin embargo, al no verse afectada cualquiera de estas actividades enzimáticas por el envejecimiento, se hacía poco probable que el hígado contribuyera al aumento de actividad XO provocada por el envejecimiento. No obstante, pensamos que aunque la actividad no aumentara en el propio hígado, cabía la posibilidad de que cualquiera de las actividades enzimáticas de las distintas formas de la XOR fuera liberada a la sangre desde el hígado, contribuyendo con ello al aumento de la actividad plasmática sin que aumentara la actividad tisular. Para comprobar si el hígado liberaba la enzima en mayor cantidad en los animales viejos que en los jóvenes, decidimos perfundir hígados aislados y medir la actividad xantina óxido-reductasa en el eluato.

La figura 28 nos muestran el comportamiento de la actividad xantina oxidasa, deshidrogenasa y total XOR en el eluato de perfusión de hígado en distintos tiempos de toma de muestra durante 45 minutos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los animales jóvenes y los animales viejos en ninguna de las dos actividades.

Figura 28. Efecto del envejecimiento sobre la actividad XO y Total XOR en eluato de perfusión de hígado de animales jóvenes y viejos.



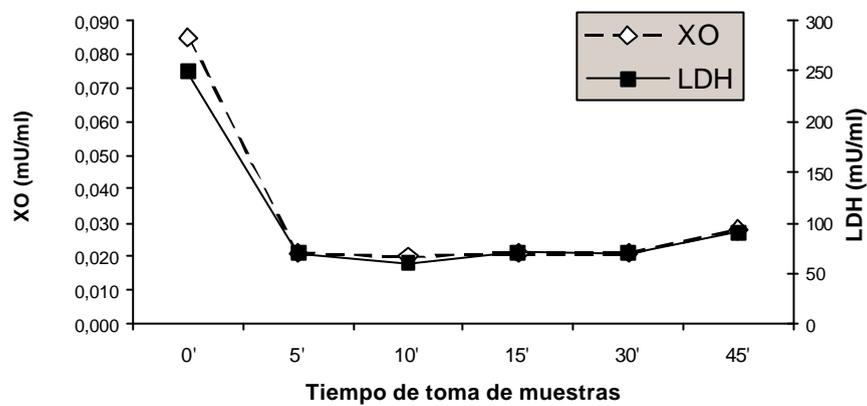
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. ($n=3$).

Tal como era de esperar al no haber diferencias estadísticamente significativas ni tendencias en el comportamiento de las actividades xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa, el porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas a lo largo del experimento.

La actividad enzimática estudiada en el eluato de perfusión de hígado podría ser consecuencia de la liberación de la enzima al torrente sanguíneo, que era nuestra posibilidad inicialmente planteada, pero también podía ser consecuencia de daño celular que provocara la liberación de dicha enzima. Si fuera éste el caso, además de la actividad XOR también se produciría liberación de otras enzimas intracelulares, cuya liberación conllevaría el mismo comportamiento que el de la XOR. Para ello medimos en las mismas muestras de eluato de perfusión de hígado de uno de los animales la actividad XO y la actividad LDH, otra enzima intracelular que se libera cuando hay daño celular. En la figura 29 se muestran los resultados, pudiéndose apreciar que el comportamiento de la actividad enzimática de ambas se solapa, lo cual nos sugiere que el comportamiento de la actividad XOR en el eluato de perfusión de

hígado no es consecuencia de la liberación normal de esta enzima, sino que es consecuencia del daño celular que se produce como consecuencia de la perfusión.

Figura 29: Comparación de la actividad XO y de la actividad LDH en eluato de perfusión de hígado de una rata joven.



4.12. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina

óxidoreductasa (XOR) y porcentaje de XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

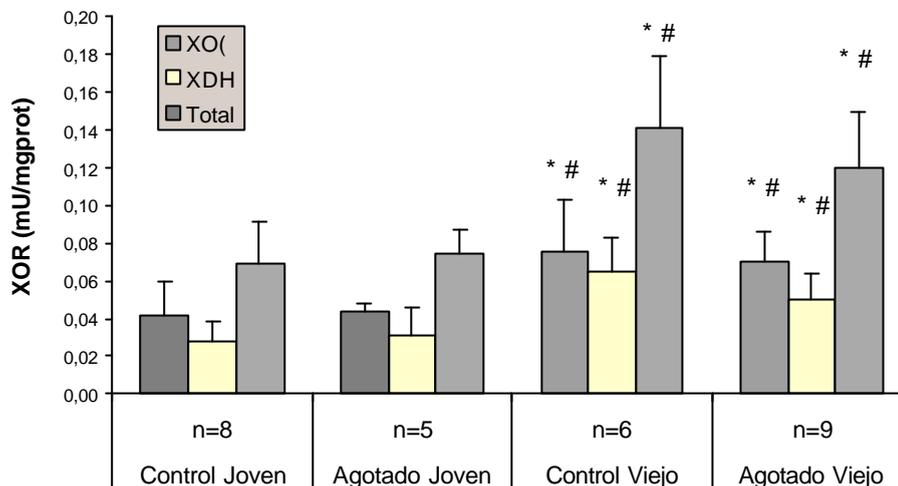
El efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en músculo gastrocnemio es el que se muestra en la tabla 24 y en la figura 30, en las que se observa que el ejercicio físico no aumenta la actividad ni en los animales jóvenes ni en los viejos. Sin embargo, el envejecimiento sí tiene un efecto sobre esta actividad enzimática en músculo, provocando un aumento del 79 %.

Tabla 24. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	XO (mU/mg.prot.)
Control Joven	8	0,042 ± 0,018
Agotado Joven	5	0,043 ± 0,005
Control Viejo	6	0,075 ± 0,027 * #
Agotado Viejo	9	0,071 ± 0,016 * #

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.*

Figura 30. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad XO, XDH y Total XOR en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.

La actividad xantina deshidrogenasa muestra un incremento similar al observado en la actividad xantina oxidasa, no observándose efecto alguno por el hecho del ejercicio físico, pero sí como efecto del envejecimiento, el cual provoca que la actividad xantina deshidrogenasa se incremente un 141 % en el grupo Control Viejo con respecto al grupo Control Joven, una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). La actividad xantina deshidrogenasa del grupo Agotado Viejo muestra diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Agotado Joven, sin embargo, comparado con el grupo Control Viejo, de su misma edad, no muestra diferencias estadísticamente significativas, por tanto, el ejercicio físico agotador no provoca un aumento de esta actividad en los animales viejos, al igual que en los animales jóvenes (Tabla 25 y Figura 30).

Tabla 25: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina deshidrogenasa en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	XDH (mU/mg.prot.)
Control Joven	8	0,027 ± 0,011
Agotado Joven	5	1,031 ± 0,014
Control Viejo	6	0,065 ± 0,018 * #
Agotado Viejo	9	0,055 ± 0,014 * #

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.*

Tabla 26: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad total xantina oxidoreductasa en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	XO+XDH (mU/mg.prot.)
Control Joven	8	0,069 ± 0,021
Agotado Joven	5	0,074 ± 0,016
Control Viejo	6	0,141 ± 0,039 * #
Agotado Viejo	9	0,125 ± 0,029 * #

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.*

En la tabla 27 se muestra cómo el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto al total no muestra cambios significativos por efecto del ejercicio físico ni por efecto de la edad. Hemos visto anteriormente que el envejecimiento provoca un aumento de la actividad xantina oxidasa y de la actividad xantina deshidrogenasa, sin embargo la proporción entre ambas se sigue manteniendo alrededor del 55 %.

Tabla 27: Efecto del ejercicio físico agotador sobre el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total XOR en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	XO (% del total)	
Control Joven	8	59,44	± 12,06
Agotado Joven	5	59,58	± 12,94
Control Viejo	6	52,76	± 10,74
Agotado Viejo	9	58,78	± 2,44

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

4.13. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína xantina oxidasa en músculo gastrocnemio.

Una vez estudiada la actividad enzimática no podíamos continuar sin saber si el comportamiento de la enzima era debido a cambios postranscripcionales de la enzima sin cambios en la expresión enzimática o si estos cambios en la actividad se correspondían con un cambio en la cantidad de enzima. Dado que la actividad enzimática no sufría cambios con el ejercicio físico, sino que sólo cambiaba por efecto del envejecimiento, estudiamos el comportamiento de la enzima en músculo de animales jóvenes y viejos mediante “western blot”. Tal como se puede observar en la tabla 28 y en la figura 31, las muestras pertenecientes a los animales viejos presentan una mayor expresión de la enzima que las pertenecientes a los animales jóvenes, con un nivel de significación de 0,05.

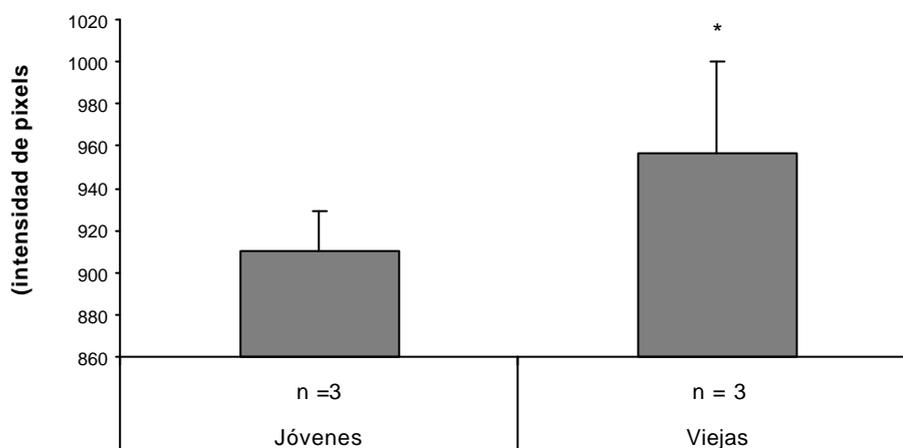
Tabla 28: Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína XO en músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.

	n	XO (intensidad de pixel)	
Joven	3	910	± 19
Viejo	3	957	± 43 *

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo joven.*

Por lo tanto, podemos observar que los cambios observados en apartados anteriores que muestran un aumento de la actividad xantina oxidasa con el envejecimiento se acompañan también de un aumento de la expresión enzimática.

Figura 31. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína xantina oxidasa en músculo gastrocnemio.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo joven.*

4.14. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa (XO), actividad xantina deshidrogenasa (XDH), actividad total xantina óxidoreductasa (XOR) y porcentaje de XO con respecto a la actividad total (XO/XOR %) en aorta de animales jóvenes y viejos.

La actividad xantina oxidasa en aorta muestra un comportamiento similar al que muestra en músculo gastrocnemio, aunque con unas diferencias más significativas. El ejercicio físico no provoca un aumento de esta actividad ni en los animales jóvenes ni en los viejos, mientras que el envejecimiento sí provoca un aumento de la actividad xantina oxidasa del 107 % en el grupo Control Viejo con

respecto al grupo Control Joven que es estadísticamente significativo. El grupo Agotado Viejo presenta una mayor actividad xantina oxidasa que el grupo Agotado Joven, pero no por efecto del ejercicio físico, sino por efecto del envejecimiento, ya que ninguno de estos dos grupos sometidos a ejercicio físico agotador muestra un aumento de actividad en relación a sus respectivos grupos controles de la misma edad (Tabla 29 y Figura 32).

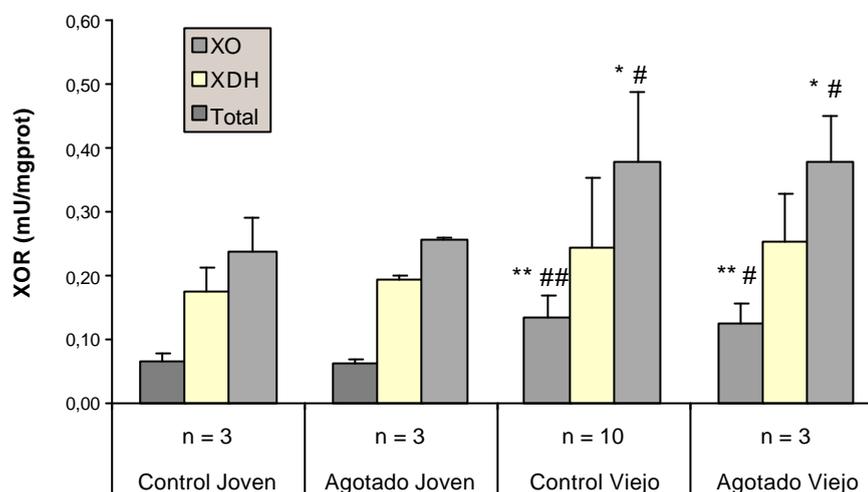
Tabla 29 : Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina oxidasa en aorta de animales jóvenes y viejos.

	n	XO (mU/mg.prot.)
Control Joven	3	0,065 ± 0,013
Agotado Joven	3	0,061 ± 0,007
Control Viejo	10	0,135 ± 0,035 ** ##
Agotado Viejo	3	0,126 ± 0,030 ** #

*Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “**” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “##” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo agotado joven.*

En la tabla 29 y la figura 32 se puede observar como la actividad xantina deshidrogenasa en aorta no se ve afectada por el ejercicio físico agotador, pero sin embargo muestra una tendencia a aumentar con la edad con un aumento del 25 % en el grupo Control Viejo con respecto al grupo Control Joven.

Figura 32. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad XO, XDH y total XOR en aorta de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “***” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “##” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo agotado joven.

Tabla 30 : Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad xantina deshidrogenasa en aorta de animales jóvenes y viejos.

	n	XDH (mU/mg.prot.)
Control Joven	3	0,194 \pm 0,037
Agotado Joven	3	0,194 \pm 0,007
Control Viejo	10	0,243 \pm 0,111
Agotado Viejo	3	0,253 \pm 0,076

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

La tabla 31 y la figura 32 podemos observar cómo el ejercicio físico agotador no tiene efecto alguno sobre la actividad total ni en los animales jóvenes ni en los animales viejos. Sin embargo, y tal como ocurre con la actividad xantina oxidasa, el

envejecimiento sí provoca un aumento en la actividad total. El grupo Control Viejo presenta una actividad total un 55 % mayor que el grupo Control Joven. El grupo Agotado Viejo presenta una actividad total un 48 % mayor que el grupo Agotado Joven, sin embargo este aumento de la actividad total es basal, no provocado por el ejercicio físico, sino por el envejecimiento, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Agotado Viejo y el grupo Control Viejo.

Tabla 31: Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad total xantina oxidoreductasa en aorta de animales jóvenes y viejos.

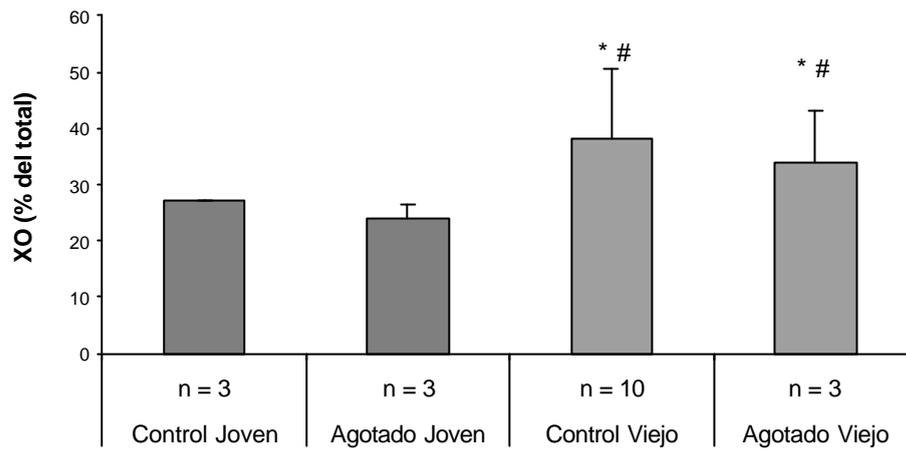
	n	XO+XDH (mU/mg.prot.)
Control Joven	3	0,239 ± 0,050
Agotado Joven	3	0,255 ± 0,004
Control Viejo	10	0,377 ± 0,110 * #
Agotado Viejo	3	0,379 ± 0,073 * #

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.*

El ejercicio físico agotador no muestra un efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total, sin embargo, sí hay una ligera tendencia a hacer disminuir ese porcentaje, de tal forma que el citado porcentaje disminuye un 11,7 % en el grupo Agotado Joven con respecto al grupo Control Joven y un 11,1 % en el grupo Agotado Viejo con respecto al grupo Control Viejo.

El hecho de que la actividad xantina oxidasa aumente significativamente con la edad y que la actividad xantina deshidrogenasa no aumente en la misma proporción hace que el envejecimiento provoque un aumento del porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total, que tal como se aprecia en la figura 33 es estadísticamente significativo a un nivel de significación del 95 %.

Figura 33. Efecto del ejercicio físico agotador sobre el porcentaje de actividad xantina oxidasa con respecto a la actividad total en aorta de animales jóvenes y viejos.

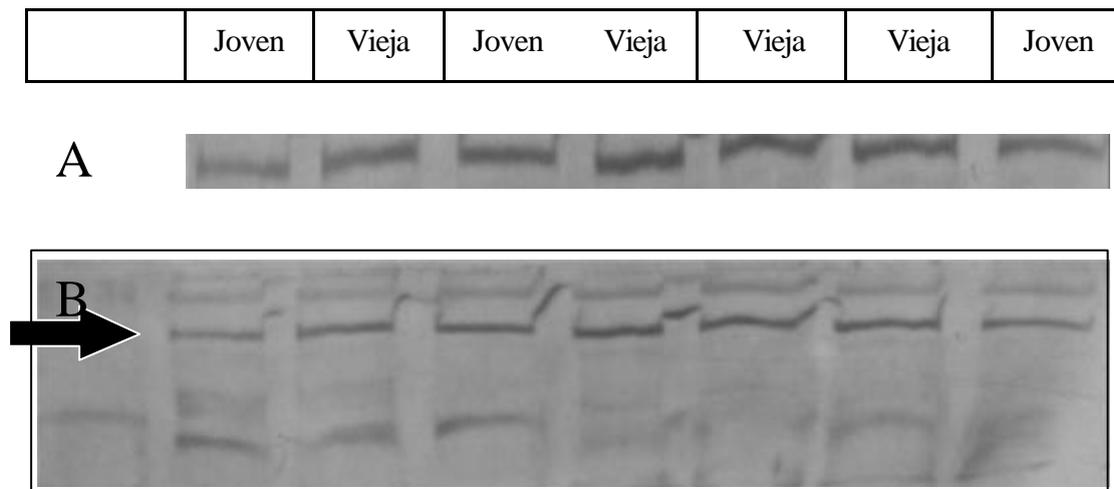


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.

4.15. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína xantina oxidasa en aorta.

Una vez estudiada la actividad enzimática no podíamos continuar sin saber si el comportamiento de esta era debido a cambios postranscripcionales de la enzima sin cambios en la expresión o si estos cambios en la actividad se correspondían con un cambio en la cantidad de enzima. Dado que la variable que se asocia a cambios en la actividad en aorta es el envejecimiento, decidimos estudiar el comportamiento de la proteína en aorta de animales jóvenes y viejos mediante “western blot”. Éste se muestra en la figura 34. Tal como se puede observar en dicha figura, las muestras pertenecientes a los animales viejos presentan una mayor expresión de la enzima que las pertenecientes a los animales jóvenes.

Figura 34. Western blot de XO en aorta de rata.

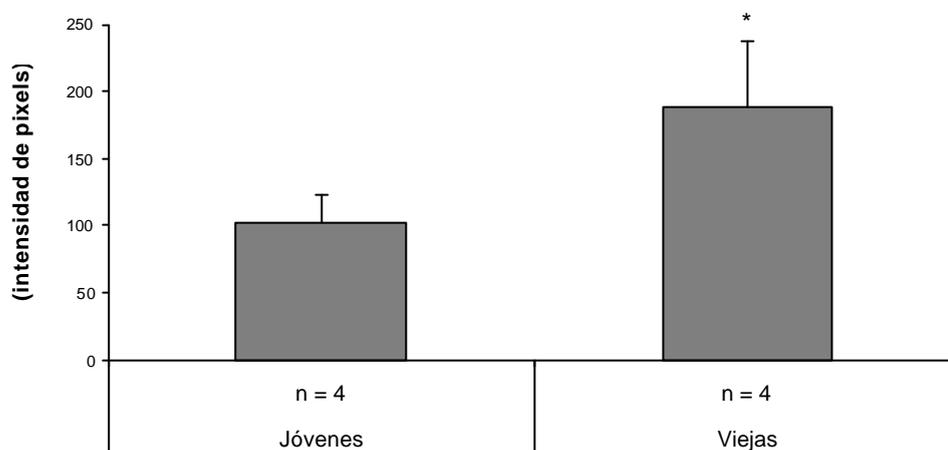


En B se observa una banda de 145 kd señalada por la flecha. Esta banda se detalla en A, donde se puede observar que las muestras correspondientes a los animales viejos muestran mayor densidad que las correspondientes a los animales jóvenes.

Las bandas correspondientes a un peso molecular de 145 kd. fueron estudiadas con el programa TotalLab para cuantificar la intensidad de dichas bandas en las

distintas muestras. Los resultados de la cuantificación nos permiten observar que las bandas pertenecientes a los animales viejos presentan una mayor intensidad que las pertenecientes a los animales jóvenes. Estos resultados se representan gráficamente en la figura 35.

Figura 35. Efecto del envejecimiento sobre la expresión de proteína xantina oxidasa en aorta.

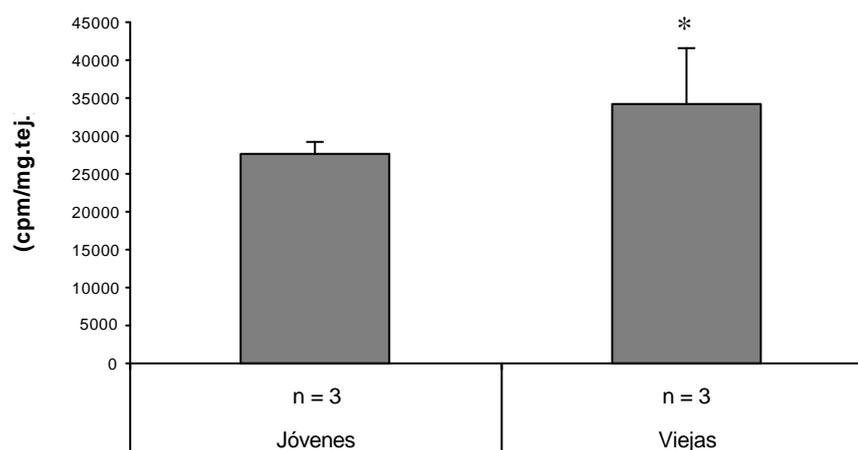


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo joven.*

4.16. Efecto del envejecimiento sobre la producción de radical superóxido por anillos aórticos de rata.

En nuestra tarea de saber si en realidad este aumento de la actividad y de la cantidad de proteína xantina oxidoreductasa contribuía a la producción de radicales libres, decidimos llevar a cabo la medición, mediante quimioluminiscencia, de la producción de radical superóxido en anillos aórticos de animales jóvenes y viejos, mostrando nuestros resultados un aumento del 24 % en los anillos de rata vieja con respecto a los anillos de rata joven. Este es el aumento correspondiente a la xantina oxidoreductasa, es decir el que es inhibible por alopurinol (figura 36), por lo que es en realidad la enzima sujeto de nuestro estudio la responsable de la producción aumentada de radical superóxido en los anillos aórticos de rata vieja en relación a los anillos aórticos de rata joven.

Figura 36: Efecto del envejecimiento sobre la producción de radical superóxido por la XOR en anillos aórticos de rata.

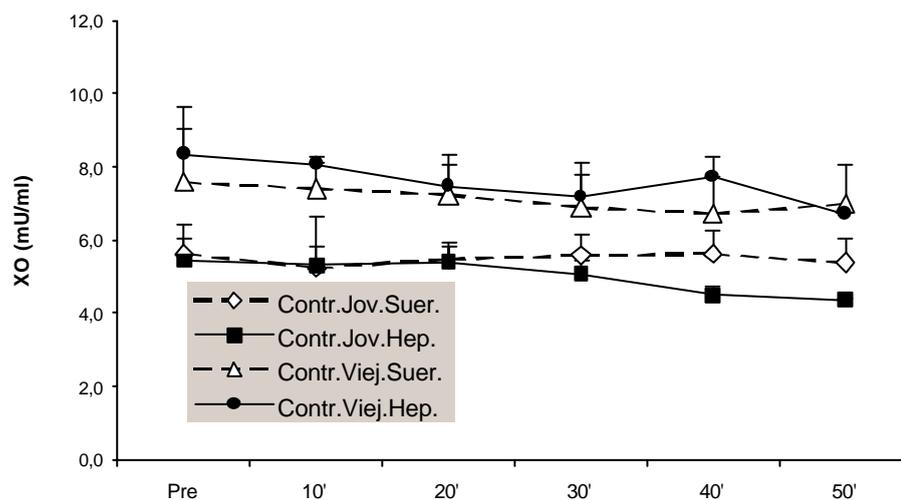


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo joven.

4.17. Efecto de la administración de heparina sobre la actividad xantina oxidasa en plasma de animales jóvenes y viejos.

Dado que en sangre de animales viejos la actividad xantina oxidasa está más elevada que en los jóvenes, y en la aorta también, decidimos averiguar si la administración de heparina liberaba parte de la enzima que estaba pegada al endotelio y con ello aumentaba la actividad enzimática en plasma. La figura 37 muestran como la administración de heparina no provoca aumentos significativos en la actividad xantina oxidasa en plasma de ratas jóvenes y viejas durante los 50 minutos tras la administración de aquella. Sí observamos claramente que la actividad xantina oxidasa de los animales viejos, tanto los tratados con heparina como los tratados con suero fisiológico, se encuentra más elevada que en los animales jóvenes. Este comportamiento es el mismo que hemos visto previamente en nuestros resultados del apartado 4.9. En este experimento, el efecto se mantiene en todos los tiempos de toma de muestras a lo largo de los 50 minutos que dura el proceso.

Figura 37. Efecto de la administración de heparina sobre la actividad xantina oxidasa en plasma de animales jóvenes y viejos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. (n=3).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

5.1. El ejercicio físico agotador provoca un aumento de los indicadores plasmáticos de daño muscular en animales jóvenes y viejos.

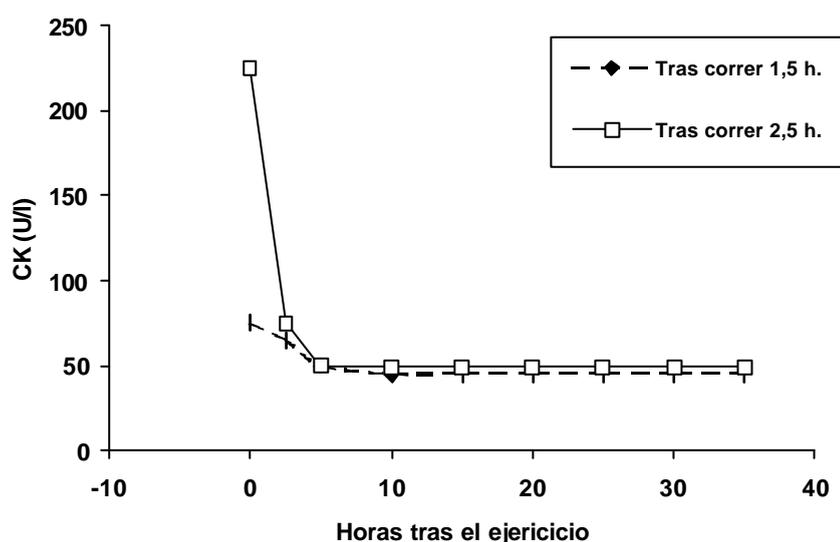
Que el ejercicio físico, sobretodo el excéntrico provoca daño muscular es un hecho universalmente aceptado. Los estudios realizados hasta el momento sugieren que los efectos inmediatos asociados a la lesión muscular son de tipo mecánico, y se originan fundamentalmente por la tensión soportada por el sarcómero de la fibra muscular. Experimentos de tipo mecánico han demostrado como una excesiva tensión en el sarcómero es la causa primaria de la lesión muscular (Lieber y cols., 1999). Estos mismos autores postulan que esta excesiva tensión provoca una disrupción intra y/o extracelular de las membranas que permite la hidrólisis de proteínas estructurales, provocando a su vez la desestructuración miofibrilar que se observa habitualmente. Posteriormente aparece el fenómeno de la inflamación, la cual ayuda a degradar y reparar el tejido. La prevención de la inflamación conlleva una pérdida de la función muscular más duradera.

El daño muscular asociado al ejercicio físico ha sido estudiado tanto desde el campo bioquímico como desde el campo histológico, viéndose que dicho daño ocurre tanto en animales como en humanos. Este daño va ligado a una alteración de las propiedades contráctiles musculares, con la correspondiente pérdida de fuerza máxima voluntaria (Balnave y cols., 1993; Nosaka y cols., 1991).

El indicador bioquímico más utilizado para valorar el daño muscular es la medición de la liberación al plasma de la enzima intramuscular Creatina Kinasa (CK). En ratas, el tiempo en que se produce la elevación de la actividad CK en plasma tras la realización de un ejercicio agudo varía según los autores, variando desde algunos que muestran el pico inmediatamente tras el ejercicio (Amelink y cols., 1986; Amelink y cols., 1988; Hayward y cols., 1999; Van Der Meulen y cols., 1991), mientras que otros que llevan a cabo carrera en pendiente hacia abajo llegan a encontrar dos picos, uno a las 0 horas y otro a las 24-36 horas (Armstrong y cols., 1983; Newham y cols., 1983; Schwane y cols., 1983). Se ha visto que algunas

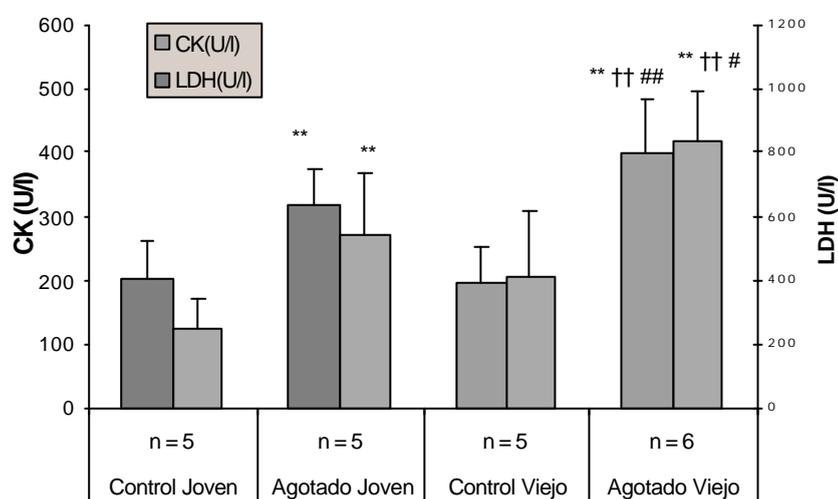
variables influyen sobre el aumento de la actividad enzimática plasmática postejercicio, como los niveles de estradiol (Bar, 1990; Bar y cols., 1988), el entrenamiento previo (Balnave y cols., 1993), el sexo (Van Der Meulen y cols., 1991) o la intensidad y duración del ejercicio (Hortobagyi y cols., 1989; Noakes, 1987; Popovich y cols., 1989). En concreto, Van der Meulen y cols. destacan la tremenda diferencia que encuentran entre los niveles de actividad CK tras ejercitar ratas durante 1,5 horas y los niveles de CK tras ejercitar ratas durante 2,5 horas (Van Der Meulen y cols., 1991) (ver figura 40), lo cual se ha comprobado también en humanos, en los que en los 12 últimos km. de una maratón, el daño muscular aumenta desproporcionadamente en comparación con el daño producido en los primeros 30 km. (Janssen y cols., 1989). Aunque con menos evidencia, otras variables que influyen son la raza (Friden y cols., 1984), la edad (Gale y cols., 1979; Nosaka y cols., 1991), la masa muscular (Manfredi y cols., 1991; Novak y cols., 1977) y la ingesta de proteínas (Hayward y cols., 1999).

Figura 38. Evolución de la actividad CK en plasma de ratas jóvenes macho tras correr durante 1,5 h. y durante 2,5 h. (Adaptado de Van Der Meulen, 1991).



Nuestros resultados, que fueron tomados inmediatamente después del ejercicio muestran cómo el ejercicio provoca un aumento de la actividad CK en plasma de animales jóvenes, que se puede considerar similar al publicado por Hayward y cols. (1999), los cuales muestran un incremento de alrededor del 100 %, pasando los valores de 130 U/L a 260 U/L aproximadamente como efecto del ejercicio. Con otros autores, aunque el comportamiento es el mismo, no existe tal coincidencia, probablemente debido a las diferencias en el protocolo de ejercicio. Así, Van Der Meulen y cols. (1991) publican valores que aumentan desde 25 a 80 U/L y Komulainen y cols. (1994) publican valores que pasan de 216 a 1183 U/L. Por otra parte, en los animales viejos se observa el mismo comportamiento, y al igual que en nuestro trabajo, en el que no se observa un mayor incremento en los viejos que en los jóvenes, Manfredi y cols. (1991) tampoco encuentran diferencias en el incremento como consecuencia del ejercicio físico, aunque ellos lo estudian en humanos.

Figura 39. Efecto del ejercicio físico agotador sobre la actividad CK y LDH en plasma de ratas jóvenes y viejas.

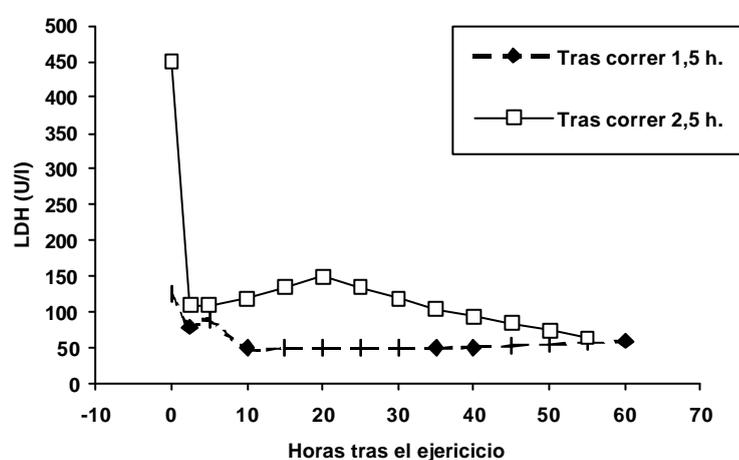


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “**” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “††” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo control viejo. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente

significativ ($p < 0,05$) y “###” una diferencia significativa ($p < 0,01$) ambos con respecto al grupo agotado joven.

Aunque menos utilizado que la actividad CK, la actividad LDH también se utiliza como marcador de daño muscular. En la figura 41 se puede observar el perfil de la actividad LDH en plasma tras llevar a cabo ejercicio físico agudo. Nuestros resultados, que manifiestan en los animales jóvenes un aumento de dicha actividad del 126 % son similares a los presentados por Komulainen y cols. en 1994, los cuales muestran un incremento del 85 % aproximadamente. El comportamiento de la actividad LDH en nuestro estudio muestra el mismo comportamiento en los animales jóvenes que en los viejos agotados, observando en estos últimos un aumento de la actividad similar al que provoca el ejercicio en los animales jóvenes. El incremento en los animales jóvenes y en los viejos es similar.

Figura 40. Evolución de la actividad LDH en plasma de ratas jóvenes macho tras correr durante 1,5 h. y durante 2,5 h. (Adaptado de Van Der Meulen, 1991).



A nivel histológico, se ha venido observando que tras el ejercicio físico se produce un edema muscular, el cual contribuye al daño a la célula muscular (Komulainen y cols., 1993; Peeze Binkhorst y cols., 1990) probablemente por aumento del volumen celular y como consecuencia de ello, estiramiento y posterior

ruptura de la membrana celular (Komulainen y cols., 1994). El aumento del agua muscular es debido tanto al edema intersticial como al edema intracelular, produciéndose ambos en este orden (Komulainen y cols., 1994). Este mismo autor encuentra, coincidiendo con otros, cambios ultraestructurales como disrupción de las líneas Z del sarcómero, pérdida de la arquitectura miofibrilar y áreas subsarcolémicas ensanchadas. Otros autores establecen que los sarcómeros están unidos entre ellos por fibras de desmina que enlazan los distintos discos Z además de entre éstos con el sarcolema, estabilizando la membrana en el estrés mecánico y que como consecuencia del ejercicio excéntrico hay una pérdida de estas fibras de desmina (Koh, 2002). Si el músculo es estudiado unas horas después del ejercicio físico, además del daño mecánico descrito anteriormente, aparecen los cambios típicos del proceso de inflamación, con infiltración leucocitaria, etc.. En nuestro estudio, sólo se observan los cambios debidos al proceso de envejecimiento de la fibra muscular, ya que las muestras fueron tomadas inmediatamente tras el ejercicio. En el músculo viejo, en el que el ejercicio no provoca un mayor aumento de la liberación de enzimas intracelulares al plasma, tampoco podemos afirmar con nuestro estudio que exista un mayor número de fibras musculares dañadas, aunque sí se observan más fibras musculares degenerativas atribuibles al envejecimiento. Algunos autores también han observado alteraciones en el endotelio capilar de los músculos ejercitados (Duarte y cols., 1994). En conjunto vemos que el ejercicio físico agotador provoca daño muscular tanto en los animales viejos como en los jóvenes, a pesar de que la masa magra de los animales viejos suele ser menor que la de los animales jóvenes.

En cuanto al tejido hepático, la viabilidad hepática y la función de los hepatocitos también ha sido estudiada previamente, mostrando como efecto del ejercicio físico agotador, un volumen hepatocitario disminuido, mientras que no disminuye el nivel de glucógeno intracelular (Latour y cols., 1999). Nosotros sí observamos en el hígado viejo una ocupación celular por parte del glucógeno y otros elementos no organulares mayor que en los hepatocitos de la rata joven, lo cual posiblemente sea debido al menor consumo de aquel debido a la menor duración del ejercicio en los animales jóvenes.

5.2. El ejercicio físico agotador y el envejecimiento provocan estrés oxidativo en sangre, hígado y músculo gastrocnemio.

Para determinar el estrés oxidativo hemos elegido como indicador el estatus del glutatión, ya que nos permite determinar el estrés oxidativo tanto en tejidos como en fluidos biológicos (Sies, 1986). La relación entre glutatión oxidado y glutatión reducido (GSSG/GSH) es un buen indicador del estrés oxidativo que puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Viña, 1990) además de ser un indicador del estado redox celular, según el cual se regula la expresión de diversas proteínas y actividades enzimáticas.

En cuanto al efecto del envejecimiento sobre el estatus del glutatión diversos autores encuentran un aumento de la oxidación de éste con el envejecimiento tanto en animales (Allen y cols., 1986; Viña y cols., 1992) como en humanos (Goldschmidt, 1970). Sobre todo se destaca un aumento del glutatión oxidado, acompañado probablemente de una disminución del GSH (Sastre y cols., 1996). Nuestro estudio sigue en la misma línea que estos autores, en la medida en que tanto en hígado como en músculo el GSH muestra una tendencia a disminuir con la edad, la cual no llega a ser significativa, pero el GSSG sí muestra un cambio claro con el envejecimiento, aumentando claramente en los animales viejos. El cociente GSSG/GSH, también lo hace significativamente. En este comportamiento posiblemente influyan las vías de oxidación-reducción del glutatión. En este sentido, el envejecimiento se asocia, en general, a un descenso de la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones vinculadas con la reducción del glutatión oxidado, como la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa o la glutatión reductasa, más que a un aumento de la actividad de las enzimas que contribuyen a la oxidación del glutatión reducido, como la glutatión peroxidasa o transferasa (Viña y cols., 1992). Además, cuando el GSH se oxida, el GSSG tiende a liberarse desde las células (Sies y cols., 1978). Por tanto, la oxidación del glutatión puede aumentar la liberación de éste desde las células, contribuyendo al

aumento de GSSG que se observa en sangre de ratas viejas (García de la Asunción y cols., 1996; Sastre y cols., 1996).

Aunque cabría la posibilidad lógica de que el GSH disminuyera con el envejecimiento, los estudios realizados muestran comportamientos contradictorios, sobretodo en los tejidos (Christon y cols., 1995; De y cols., 1991; Favilli y cols., 1994; Hazelton y cols., 1980; Lantomasi y cols., 1993; Liu, 2002; Liu y cols., 2000; Nakata y cols., 1996; Ravindranath y cols., 1989; Samiec y cols., 1998; Sanz y cols., 1997; Sasaki y cols., 2001; Teramoto y cols., 1997; Yang y cols., 1995).

Nuestros estudios muestran que el GSH en plasma no presenta cambios significativos con el envejecimiento. Algunos autores han referido una disminución del GSH en sangre de ratas viejas y de humanos viejos (Kretzschmar y cols., 1991; Nuttall y cols., 1998; Samiec y cols., 1998), y a su vez, no encuentra diferencias en el GSSG con la edad .

El comportamiento del glutatión en plasma no refleja el de los tejidos, de forma que el GSH no tiene por qué comportarse igual en sangre que en tejidos. Así como el GSSG tiene el mismo comportamiento tanto en sangre como en tejidos, aumentando con la edad, a continuación podemos ver como las concentraciones de GSH de los distintos tejidos pueden diferir de las del plasma.

El glutatión hepático tiene una gran importancia en la medida en que es la fuente de este tiol para muchos otros tejidos, siendo el origen del 90 % del GSH circulante (Ji y cols., 1998). Nuestros resultados no muestran cambios en el GSH hepático con la edad, en la misma línea que algunos autores (Kretzschmar y cols., 1991; Ravindranath y cols., 1989; Rikans y cols., 1988). Algunos autores encuentran un aumento del GSH en hígado de ratas viejas, así como también en plasma y corazón (Barja de Quiroga y cols., 1990; Loguercio y cols., 1996; Ohkuwa y cols., 1997). Otros refieren una disminución (Christon y cols., 1995; Sanz y cols., 1997).

En músculo esquelético no se han encontrado diferencias en el contenido de GSH en el vasto lateral profundo, mientras que en sóleo, el contenido de GSH aumenta con el envejecimiento (Leeuwenburgh y cols., 1994) al igual que el GSH de músculo cardíaco (Fiebig y cols., 1996). Nuestros resultados muestran una ligera

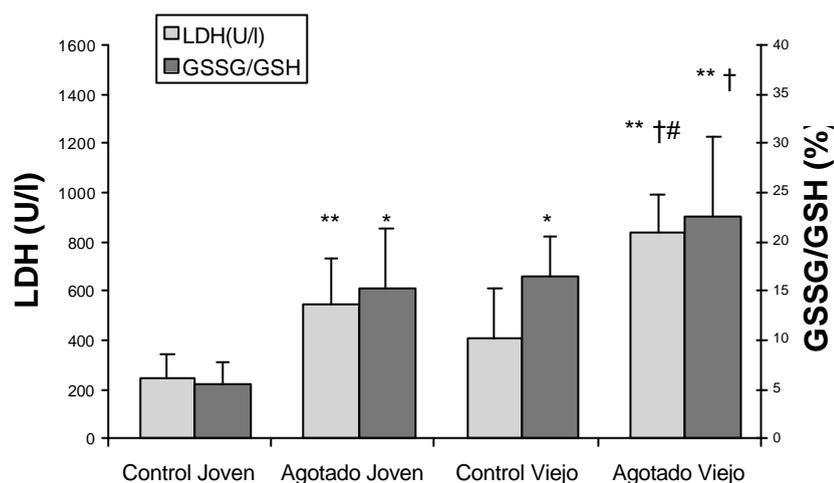
tendencia a aumentar el GSH con la edad, que no llega a ser significativa, mientras que el GSSG si aumenta significativamente con el envejecimiento.

Nosotros interpretamos estos resultados como que el músculo esquelético de los animales viejos sufre un mayor estrés oxidativo, lo cual ya ha sido demostrado por diversos autores mediante la medición de la peroxidación lipídica, la oxidación proteica y el daño al DNA (Cooper y cols., 1992; Goto y cols., 1995); (Starnes y cols., 1989). Nuestros resultados coinciden con estos autores en la medida en que tanto la concentración de GSSG como el cociente GSSG/GSH aumentan como efecto de la edad, indicando que el músculo viejo se encuentra en un estado de mayor oxidación que el músculo joven. A pesar de un aumento en la producción de radicales libres con el envejecimiento, que se manifiesta por el incremento del GSSG, el sistema de protección contra ellos no disminuye, sino que puede que tienda a aumentar para compensar esta mayor producción de agentes oxidantes, tal como apoyan otros autores (Ji y cols., 1992; Luhtala y cols., 1994; Oh-Ishi y cols., 1995). El mecanismo responsable de este aumento de las defensas antioxidantes no se conoce con claridad, pero algunos autores sugieren que los músculos de animales viejos, que son más sensibles al daño y por tanto a producir una respuesta de fase aguda, posiblemente estén en un estado de inflamación crónica en el que la producción de radicales libres esté en un estado estable elevado (Cannon y cols., 1994). Posiblemente este incremento de las defensas antioxidantes a nivel basal sea la explicación a que el entrenamiento no provoque aumentos tan marcados de estas defensas en los viejos como en los jóvenes, lo cual hace pensar a algunos autores que el umbral de entrenamiento que provoca un aumento de las defensas antioxidantes es mayor en los viejos que en los jóvenes (Ji y cols., 1998).

En conjunto, y en base al cociente GSSG/GSH como indicador de estrés oxidativo, vemos que el envejecimiento provoca un aumento de dicho cociente del 200 % en sangre. En hígado este aumento es sólo del 43 % y en músculo del 220 %. No debemos olvidar que el músculo esquelético es un tejido postmitótico y posiblemente este hecho haga que el envejecimiento le afecte en mayor grado. Probablemente el músculo esquelético juegue un papel central en el estrés oxidativo asociado al envejecimiento.

Durante las últimas décadas se ha venido proponiendo que el ejercicio físico provoca un aumento de la producción de radicales libres por parte de los grupos musculares ejercitados (Brady y cols., 1979; Davies y cols., 1982; Dillard y cols., 1978; Jackson y cols., 1985; McArdle y cols., 2001; McArdle y cols., 1995; McArdle y cols., 1999; Sjödín y cols., 1990). Que estos radicales libres estén relacionados en la patogénesis del daño muscular asociado al ejercicio físico es un hecho que no está probado, aunque todas las hipótesis apuntan a su vinculación. De hecho, se puede observar el comportamiento del cociente GSSG/GSH en músculo y la actividad LDH en plasma que se representa en la figura 41.

Figura 41. Gráfico comparativo de la actividad LDH en plasma y del cociente GSSG/GSH en músculo de los cuatro grupos experimentales.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control joven. El símbolo “†” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control viejo. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.*

La mayor parte de los estudios sobre el aumento de la producción de radicales libres durante el ejercicio físico están hechos en base a parámetros indirectos. No obstante, algunos autores han intentado demostrar las especies

reactivas que están implicadas en el ejercicio físico. En esta línea, el radical superóxido ha sido la especie detectada por algunos autores (Kolbeck y cols., 1997; Reid y cols., 1992), mientras que otros han detectado radical hidroxilo en el propio músculo (Díaz y cols., 1993) ó en los vasos musculares (O'Neill y cols., 1996). El origen exacto de dichos radicales libres no ha sido bien definido todavía, ya que en el tejido muscular, además de las células musculares, existen otros tipos celulares como células endoteliales, fibroblastos y linfocitos, los cuales pueden contribuir a la producción de radicales libres (McArdle y cols., 2001). Estos mismos autores sugieren que las células musculares producen radicales libres rápidamente incluso en el transcurso de ejercicio que no produce daño celular o que lo produce escasamente, y seguidamente se produce una oxidación de las proteínas musculares para posteriormente producirse una respuesta adaptativa de la actividad de las enzimas antioxidantes y de las “*Heat Shock Proteins*” (HSP).

En cuanto al origen subcelular de los radicales libres, algunos estudios sugieren que el radical superóxido proviene de las mitocondrias de la célula muscular (Jackson, 1996; Reid, 1996), aunque otros autores argumentan que es poco probable que la mitocondria libere radical superóxido al citoplasma *in vivo* (Forman y cols., 1997) o que el radical superóxido producido en ella atraviese la membrana mitocondrial y celular hasta el espacio extracelular (McArdle y cols., 2001). Las alternativas al origen mitocondrial de estos radicales libres son las oxidasas unidas a la membrana celular o la xantina oxidasa citosólica (Reid y cols., 1992).

El hecho de que el glutatión se oxida con el ejercicio físico agotador ha sido observado por varios grupos de investigación (Gohil y cols., 1988; Ji y cols., 1992; Lew y cols., 1985; Pyke y cols., 1986; Sastre y cols., 1992; Sen y cols., 1994; Viguie y cols., 1993).

En este trabajo, hemos observado como el ejercicio físico agotador provoca un aumento tanto del glutatión oxidado como del cociente GSSG/GSH en la sangre de los animales jóvenes, lo cual coincide con los resultados aportados por Lew y cols. (1985), Sastre y cols. (1992) y Viña y cols. (2000a) realizados en ratas y por Gohil y cols. (1988), Duthie y cols. (1990), Sastre y cols. (1992), Sen y cols. (1994) y Viña y cols. (2000a) en seres humanos. Algunos de estos autores refieren que el ejercicio

físico provoca una disminución de la concentración de GSH en sangre, es decir, el ejercicio físico agotador consume las reservas del tiol no proteico más abundante de la célula. Nuestros resultados muestran una tendencia a disminuir la concentración de GSH en sangre con el ejercicio físico, en la misma línea que otros autores (Viña y cols., 2000a). Es sobretodo el grupo “Agotado Viejo” el que muestra la mayor tendencia a disminuir, aunque esta tendencia no llega a ser significativa. Posiblemente si aumentáramos el nº de muestras del estudio las diferencias llegarían a ser significativas.

En cuanto al comportamiento del estatus del glutatión en el hígado, nuestros resultados muestran una ligera tendencia no significativa a aumentar el GSH como efecto del ejercicio físico, tanto en los animales jóvenes como en los animales viejos. Posiblemente esta tendencia sea debida a un aumento de la síntesis hepática de glutatión en respuesta al ejercicio físico. El GSSG y el cociente GSSG/GSH se encuentra aumentado significativamente ($p < 0,05$) en el hígado de animales jóvenes como efecto del ejercicio físico, tal como refieren otros autores (Viña y cols., 2000a). Sin embargo, en los animales viejos el ejercicio físico no provoca aumento de estos parámetros con respecto al grupo “Control Viejo”. Una posible explicación al diferente efecto del ejercicio sobre el estatus del glutatión en hígado sea el hecho de que los animales jóvenes presentan un tiempo de agotamiento mayor que los animales viejos, pudiendo esto conllevar una mayor disminución del flujo sanguíneo al territorio esplácnico, provocando así un mayor grado de isquemia al hígado en los animales jóvenes que en los animales viejos. De hecho, tal como referimos en el primer punto de la discusión, el tiempo de agotamiento de los animales jóvenes representa un 200 % con respecto al grupo viejo.

En el músculo esquelético, el ejercicio físico agotador también aumenta el grado de oxidación, tanto de los animales jóvenes como de los viejos, en la medida en que, tanto el GSSG como el cociente aumentan significativamente en ambos grupos de edad en respuesta al ejercicio físico agotador. Otros autores han encontrado similares resultados. Bejma y cols. en 1999 observaron que el estatus del glutatión cambiaba como consecuencia del ejercicio físico agotador en ambos grupos de edad, y que este cambio era similar en los animales jóvenes y en los viejos, y lo

mismo ocurría con la peroxidación lipídica, aunque el ejercicio provocaba una mayor producción de agentes oxidantes en los animales viejos que en los jóvenes (Bejma y cols., 1999). No debemos olvidar que este aumento de la oxidación del glutatión por efecto del ejercicio físico agotador en el grupo agotado viejo ocurre a pesar de que la duración del ejercicio en dicho grupo es menor que en los animales jóvenes.

El ejercicio físico provoca un incremento del cociente en sangre del 124 % y del 228 % en animales jóvenes y viejos respectivamente. Sin embargo, en hígado el efecto del ejercicio físico es mayor en los animales jóvenes que en los viejos. Cabe la posibilidad de que la mayor duración del ejercicio físico juegue un papel importante en el mayor estrés oxidativo del hígado joven de animales agotados con respecto al hígado viejo, lo cual sería la manifestación de que el factor tiempo o duración del ejercicio sea determinante en el daño oxidativo asociado al ejercicio físico.

5.3. La xantina óxidoreductasa contribuye al estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico y el envejecimiento.

Tal como hemos visto en el apartado anterior, el ejercicio físico se asocia a un aumento del estrés oxidativo. El origen de las especies reactivas que provocan dicho estrés oxidativo ha sido predominantemente atribuido a la mitocondria de la fibra muscular (Jackson, 1996; Reid, 1996). Sin embargo algunos autores han puesto en duda que los radicales libres producidos en la mitocondria difundan fuera al citoplasma *in vivo* (Forman y cols., 1997) y que sean capaces de difundir también a través de la membrana muscular (Halliwell y cols., 1989). Según datos obtenidos de mitocondrias aisladas de músculo, éstas no presentan ni una mayor producción de peróxidos, ni una mayor oxidación de glutatión, ni una mayor lipoperoxidación en animales jóvenes (Viña y cols., 2000a) y tampoco una mayor producción de radicales libres en respuesta al ejercicio, ni en animales jóvenes ni en viejos (Bejma y cols., 1999). Si consideramos que el estrés oxidativo repetitivo, como el provocado por el entrenamiento estimula las defensas antioxidantes allí donde aquel se produce, el entrenamiento debería promover el aumento de las defensas mitocondriales del músculo esquelético. Sin embargo, aunque varían las defensas antioxidantes citoplasmáticas, las mitocondriales no varían ni con el entrenamiento, ni con la edad (Navarro-Arévalo y cols., 1999). Por lo tanto otras fuentes de radicales libres deben contribuir al estrés oxidativo asociado al ejercicio físico tanto en jóvenes como en viejos. La xantina óxidoreductasa desempeña un importante papel en el daño muscular que ocurre durante el ejercicio físico, ya que las condiciones fisiológicas del músculo esquelético durante el ejercicio agotador se asemejan a las de un tejido isquémico, con degradación de nucleótidos de adenina a hipoxantina y xantina. Otros autores ya han estudiado el papel de la xantina oxidasa en el ejercicio físico (Hellsten, 1994; Heunks y cols., 1999; Radak y cols., 1995; Viña y cols., 2000a).

Por otra parte, el envejecimiento también se asocia a un mayor estrés oxidativo, hasta el punto de postularse la teoría de los radicales libres en el

envejecimiento. El hecho de que la mitocondria sea un sitio de producción de radicales libres hizo que Miquel y colaboradores propusieran la teoría mitocondrial del envejecimiento (Miquel y cols., 1980). De acuerdo con estos autores, es esencial la presencia de las mitocondrias para que se produzca el envejecimiento celular (Miquel y cols., 1986). El papel de la mitocondria en el fenómeno del envejecimiento celular ha sido considerado central en la medida en que el envejecimiento provoca cambios en la morfología y función de estos orgánulos, provocando un cambio en el estatus del glutatión en el sentido de una mayor oxidación en mitocondrias (García de la Asunción y cols., 1996) y daño oxidativo al DNA mitocondrial, a proteínas y a lípidos (Shigenaga y cols., 1994). El papel de las mitocondrias viejas en el envejecimiento celular ha sido apoyado también por la degeneración que aquellas han provocado al microinyectarlas en fibroblastos (Corbisier y cols., 1990).

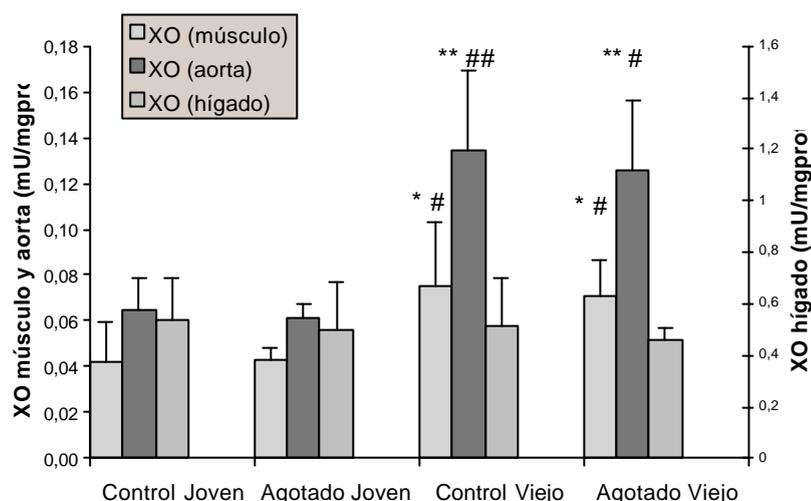
El hecho de que los radicales libres producidos por la mitocondria jueguen un papel importante en el proceso de envejecimiento no descarta la contribución de otras fuentes de radicales libres (Sastre y cols., 2000), como puede ser la xantina óxidoreductasa, cuya contribución al estrés oxidativo asociado al ejercicio físico está ampliamente aceptada. Sin embargo, el centro de atención del estrés oxidativo asociado al envejecimiento sigue manteniéndose sobre las mitocondrias.

Para ver el comportamiento de la xantina óxidoreductasa en el ejercicio físico y en el envejecimiento la hemos determinado su actividad en plasma, hígado, músculo esquelético y aorta.

Hellsten plantea dos vías por las que esta enzima puede estar implicada en el daño muscular inducido por el ejercicio físico. Una primera posibilidad es que ella misma sea la que inicie el daño provocando peroxidación de los lípidos de la membrana, con la consiguiente liberación de componentes citosólicos, pérdida de viabilidad celular e incluso posible necrosis. Esta hipótesis requiere que el ejercicio induzca la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa y una suficiente concentración del sustrato de la reacción enzimática, la hipoxantina. La otra alternativa es que la xantina oxidasa actúe una vez se ha producido el daño muscular debido a otros mecanismos, como la disrupción mecánica de las fibras musculares o el daño oxidativo por radicales libres procedentes de otro origen. En este caso la

formación de radicales libres por parte de la xantina oxidasa funcionaría como un mecanismo de amplificación para desencadenar un proceso inflamatorio (Hellsten, 2000).

Figura 42. Gráfico comparativo de la actividad XO en los distintos órganos estudiados: hígado, músculo y aorta.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “**” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), ambos con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y el símbolo “##” una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) ambos con respecto al grupo agotado joven.

Los resultados que hemos observado en plasma corroboran que el ejercicio físico agotador en animales jóvenes provoca un aumento de la actividad plasmática xantina oxidasa, provocando un aumento del 27 %, algo inferior al 42 % encontrado en estudios previos (Viña y cols., 2000a), pero igualmente estadísticamente significativo. Lo lógico sería pensar que, si es el músculo esquelético el que está activo y se daña, no tendría por qué aumentar la actividad en plasma. Sin embargo, la hipoxantina no se acumula en grandes cantidades en el músculo ejercitado durante el ejercicio físico intenso, sino que difunde a través de las membranas y pasa al plasma,

donde actúa como sustrato de la xantina óxidoreductasa (Hellsten, 2000). Además, en plasma de rata la xantina óxidoreductasa sólo existe en su forma oxidada, no detectándose actividad deshidrogenasa, por lo que cualquier aumento de la concentración de sustrato es metabolizado por la forma oxidada, y por tanto, se producen radicales libres en la reacción. En los animales viejos se observa un aumento en la actividad xantina oxidada plasmática del 12 % con el ejercicio, que no llega a ser estadísticamente significativa. El hecho de que en los animales jóvenes el ejercicio físico provoque un aumento de la actividad xantina oxidada, mientras que en los animales viejos no, lo podemos explicar mediante dos alternativas. La primera es que el factor duración del ejercicio no sea suficientemente alto en los animales viejos como para provocar el aumento que provoca en los animales jóvenes. La segunda es que, dado que basalmente en los animales viejos ya está aumentada la actividad, el posible efecto del ejercicio físico es menor.

El envejecimiento por sí sólo también provoca un aumento de la actividad xantina oxidada en plasma en reposo, tal como se puede observar en el apartado de resultados, mostrando un aumento del 25 %. Salvo error u omisión, este es el primer trabajo que encuentra una mayor actividad xantina oxidada en plasma de animales viejos en comparación con animales jóvenes. Las únicas referencias respecto a la actividad xantina óxidoreductasa y el envejecimiento las encontramos en estudios realizados en rata. La única referencia, que tengamos conocimiento, afirma que en riñones de ratas viejas la actividad total XOR aumenta con la edad hasta un máximo a los 18 meses. Este aumento corresponde tanto a la XO como a la XDH, lo cual es coincidente con nuestros resultados. Además, el porcentaje de actividad XO con respecto al total, también aumenta con la edad, incrementándose hasta más allá de los 24 meses (Chung y cols., 1999). Estos mismos autores refieren que la expresión de proteína y de RNA mensajero son paralelos a la actividad enzimática total XOR, lo cual apoya también nuestros resultados. Otro estudio relaciona la actividad xantina óxidoreductasa durante el desarrollo comparando la actividad enzimática en músculo cardíaco entre ratas recién nacidas y adultas (Schoutsen y cols., 1987). Este rango de edad no coincide con el nuestro, ya que no se trataría de un estudio de envejecimiento. No obstante, nos parece interesante resaltar aquí los resultados que

obtiene, viendo que la xantina óxidoreductasa es mayor en músculo cardíaco de adulto que de recién nacido, lo cual se relaciona con la mayor resistencia de éste a la lesión por reperfusión. Por tanto, consideramos estos resultados novedosos y de gran importancia en la medida en que puede ser una fuente importante de radicales libres y puede contribuir con ello al estrés oxidativo sistémico asociado al envejecimiento, ya que, tal como hemos mostrado en el apartado de resultados, esta enzima produce mayor cantidad de radical superóxido en aortas de ratas viejas que de jóvenes.

La explicación a este hecho nos presenta varias posibilidades. La primera es que los animales viejos presenten algún grado de isquemia en algunas áreas de tejidos periféricos, con la consiguiente hipoxia, lo cual sería debido probablemente a la presencia de cierto grado de arteriosclerosis. Con la isquemia provocaría un aumento de la concentración de hipoxantina y por tanto aumento de la actividad xantina oxidasa.

La segunda es que en los animales viejos, por el hecho de presentar un mayor estrés oxidativo, se induce la conversión de xantina deshidrogenasa a oxidasa

La tercera, la presencia de cierto grado de inflamación o inducción de proteasas, que haría aumentar la actividad xantina oxidasa en los animales viejos con respecto a los controles jóvenes.

5.4. Origen de la actividad xantina óxidoreductasa plasmática.

Para conocer el origen de la xantina oxidasa plasmática, nos planteamos medir la actividad XO y XDH en distintos órganos, pensando sobretudo en el hígado como gran candidato para liberar la enzima al torrente sanguíneo, dado que es un órgano que tiene unas actividades enzimática XO y XDH muy altas en comparación con otros órganos, tal como se puede observar en la figura 42.

En el hígado observamos cómo el ejercicio físico tiene tendencia a aumentar la actividad total XOR en los animales jóvenes, aunque no de forma estadísticamente significativa. Este aumento se produce sobretudo por el aumento de la actividad xantina deshidrogenasa, ya que la actividad XO permanece en los mismos valores que el control. Ello hace que el porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total XOR disminuya significativamente con respecto al control. Por su parte, el envejecimiento no provocaba ningún cambio en ninguna de las variables relacionadas con la XOR hepática. Este hecho nos sorprendió, ya que esperábamos que en el hígado los cambios ocurrieran en el mismo sentido que ocurren en la sangre. Por ello, nos planteamos una posible explicación a este hecho. Teniendo en cuenta que el hígado es capaz de liberar xantina oxidasa al torrente sanguíneo (Yokoyama y cols., 1990) en procesos de isquemia reperfusión hepática, cabía la posibilidad de que este hecho ocurriera también tanto como consecuencia del ejercicio físico agotador como por el propio envejecimiento, y que el hígado contribuyera al aumento de actividad XO en plasma sin que se reflejara un cambio en la actividad enzimática en el propio tejido.

Con la intención de aclarar este hecho llevamos a cabo la perfusión hepática en ratas controles jóvenes y viejas, entre las que no encontramos diferencias en ninguna de las variables estudiadas. El comportamiento de cualquiera de estas actividades enzimáticas en el eluato podría ser la manifestación de la liberación de la enzima o por el contrario podría ser la manifestación de la liberación de esta y otras proteínas intracelulares como consecuencia de que los hepatocitos se estaban dañando. Para comprobar que los hepatocitos liberaban XOR por sus características y no por un daño que provocara la liberación inespecífica de cualquier enzima,

medimos en el eluato la concentración de LDH, una enzima intracelular. Vimos que el comportamiento de ambas enzimas era superpuesto, lo cual indicaba que se estaba produciendo un daño hepático que hacía imposible sacar conclusiones acerca de estos datos.

Descartado el papel del hígado, nos quedaba por comprobar que el músculo esquelético, el órgano más abundante del organismo, estuviera relacionado con el comportamiento de la actividad xantina oxidasa en plasma. Para ello medimos la actividad enzimática en homogenados de músculo gastrocnemio, pudiendo observar cómo el ejercicio físico no tenía ninguna influencia sobre la actividad XOR, pero sin embargo, el envejecimiento sí presentaba una gran influencia, provocando aumentos de casi el 100 % tanto en la actividad XO, como en la XDH, como en la XOR total. El porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total XOR permanece constante en los cuatro grupos. Estos resultados tienen una gran importancia, ya que si tenemos en cuenta las posibles fuentes de radicales libres del músculo esquelético, la XOR es una de las más importantes. Según Li y cols., el músculo esquelético dispone de 4 fuentes de radicales libres aparte de la mitocondria:

- 1.-microsomas,
- 2.-el complejo citocromo P₄₅₀,
- 3.-los peroxisomas que producen H₂O₂ como producto de la oxidación de aminoácidos, y
- 4.-los neutrófilos activados y fagocitos que producen radicales libres para digerir las células dañadas.

Dado que las células musculares tienen escasa cantidad de microsomas y peroxisomas, las tres fuentes más importantes de radicales libres son la mitocondria, la xantina oxidasa y los neutrófilos, con una contribución variable dependiendo de las condiciones fisiológicas (Li y cols., 2001). Los resultados aquí presentados subrayarían la importancia potencial de la XOR muscular en el estrés oxidativo asociado al envejecimiento. Estudios posteriores deberán dilucidar su contribución al estrés oxidativo sistémico y considerar el fenómeno de atrofia muscular consustancial al envejecimiento humano.

5.4.1. Los vasos sanguíneos contribuyen al aumento de la XOR que ocurre durante el proceso de envejecimiento.

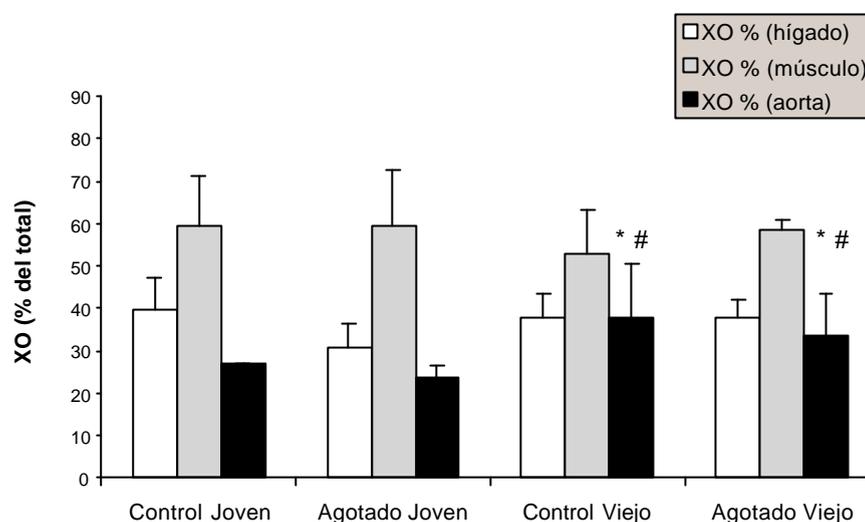
Dado que la bibliografía existente refleja que la localización de la XOR es vascular, decidimos estudiar el comportamiento de esta enzima en un vaso, la aorta de la rata. En él observamos un comportamiento parecido al que se observa en el músculo esquelético, es decir, el ejercicio físico agotador no modifica la actividad XO mientras que el envejecimiento lo aumenta. Vemos un incremento de la actividad XO del 108 %, mayor que el incremento del 79 % que se observa en el músculo esquelético. Si bien la actividad en valores absolutos es casi un orden de magnitud mayor en aorta que en músculo. Estos datos siguen apoyando la hipótesis de que en el músculo esquelético son sobretodo los vasos los que contribuyen a la mayor actividad XO que presentan los homogenados de músculo, en los cuales están incluidos también los vasos que nutren el músculo. La actividad XDH en la aorta presenta el mismo comportamiento que en el músculo, pero este aumento que se asocia a la edad no llega a ser estadísticamente significativo, aunque sí lo suficientemente importante como para contribuir junto con el aumento de la actividad XO al aumento de la actividad total XOR. Sin embargo, la gran diferencia que encontramos en la aorta con respecto al resto de tejidos es que en la aorta sí se observa que cambia el porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total. Es decir, así como en el resto de tejidos, a pesar de haber diferencias entre la actividad XO, XDH y total XOR, el porcentaje de actividad XO se mantenía similar en todos los grupos experimentales, en la aorta los animales viejos presentan un mayor porcentaje de la enzima en su forma oxidasa que los animales jóvenes (ver figura 45). Por tanto, las aortas de los animales viejos, no sólo tienen mayor actividad XOR, sino que de ésta, una mayor proporción es actividad XO, y por tanto, se supone una mayor formación de radicales libres en aorta de rata vieja que de rata joven. Para comprobar esto se midió la producción de radical superóxido en aorta de rata joven y vieja. Los resultados confirmaron la hipótesis y están en consonancia con otros autores cuando afirman que la XO circulante se ha visto que produce lesión

en el endotelio capilar, activa los procesos inflamatorios y provoca un aumento de metabolitos reactivos (Grisham y cols., 1986; Yokoyama y cols., 1990).

Consideramos además interesante hacer un “western blot” de XOR para ver si el aumento en la actividad XOR con el envejecimiento era provocado por un aumento de la expresión de proteína o sólo por un aumento de la actividad. Para ello se utilizaron muestras de ratas jóvenes y viejas, observando en los resultados como el envejecimiento provoca un aumento del 91 % estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Se puede observar pues, que el envejecimiento se asocia a un incremento en expresión de la enzima. La interpretación de estos resultados junto con los de actividad enzimática nos permiten concluir que el incremento de la expresión de la proteína contribuye al aumento de la actividad enzimática.

El porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total no se ve afectado por el envejecimiento, independientemente del comportamiento de las restantes variables, en hígado y músculo. Esto hace que nos llame la atención el hecho de que en aorta, el envejecimiento sí aumenta este porcentaje. Para explicar este hecho pensamos que, al menos en parte, la XOR que encontramos en la aorta puede tener su origen en otros órganos, tal como han observado otros autores cuando argumentan que la XOR liberada desde órganos isquémicos es capaz de producir efectos en órganos a distancia, como el pulmón (Weinbroum y cols., 1995). Es bien conocido que los niveles plasmáticos de XO aumentan tras la isquemia-reperusión. En nuestro caso, no sabemos si es por un mecanismo de isquemia-reperusión, pero el hecho es que los niveles plasmáticos de la enzima aumentan con el envejecimiento, probablemente de origen en el músculo esquelético. Esta enzima circulante cambia sus propiedades (no tiene actividad XDH) tal como afirman otros autores (Kooij y cols., 1994; Tan y cols., 1993), y la unión posterior a la superficie celular también afecta a sus propiedades catalíticas (Radi y cols., 1997). Por lo tanto, tanto la liberación de la enzima a la circulación como la subsiguiente unión a las células promueven la producción de ROS. Estos hechos nos darían la explicación de por qué el porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total está aumentado en la aorta con respecto a los otros órganos.

Figura 43. Gráfico comparativo del porcentaje de actividad XO respecto a la actividad total en los distintos órganos estudiados: hígado, músculo y aorta.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. El símbolo “*” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control joven. El símbolo “#” representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo agotado joven.

¿Por qué está aumentada la XOR en los animales viejos? Caben dos posibilidades. La primera es que la enzima esté aumentada secundariamente a algún cambio en alguno de los factores que la regulan, sin tener una función fisiológica clara, sino siendo la consecuencia del cambio con el envejecimiento de aquello que la regula. La segunda opción es que la enzima tenga una función fisiológica importante y debido a ello se modifique alguno de los factores que la regula. ¿Cuáles son los factores reguladores candidatos para aumentar la XOR en los animales viejos? Un hecho que hemos demostrado en este trabajo es que no sólo se ve afectada la actividad enzimática, sino también la expresión de la enzima. Interpretamos que la hipoxia o el hierro son los factores que pueden hacer que haya más XOR en los animales viejos que en los jóvenes, ya que son dos factores que regulan la expresión de la enzima. Entre ellos pensamos que la hipoxia debe jugar un papel importante, en la medida en que posiblemente, por la arteriosclerosis que acompaña al

envejecimiento se queden regiones poco profundidas que aumentan la expresión de la XOR.

Por otra parte, se ha visto que algunos parámetros del estatus del hierro aumentan con el envejecimiento en humanos (Cook y cols., 1974; Walters y cols., 1973; Yip, 1994), lo cual también puede influir en una sobreexpresión de la xantina óxidoreductasa, provocando un aumento de su expresión y actividad. Este hecho puede adquirir importancia si tenemos en cuenta que un exceso de hierro ha sido propuesto como factor de riesgo para sufrir coronariopatía (Halliwell y cols., 1990; Salonen y cols., 1992; Salonen y cols., 1994; Sullivan, 1981) y que tanto el hierro como la xantina oxidasa han sido demostrados en material aterosclerótico (Swain y cols., 1995). Ghio y cols. en el 2002 observaron que el hierro regula la actividad xantina óxidoreductasa en el pulmón incrementando la actividad total más que provocando la conversión de XDH a XO, y lo hace, al menos en parte, a nivel transcripcional. Lo mismo ocurre a nivel intestinal, donde un alto nivel dietético de hierro provoca un aumento de la actividad xantina oxidasa (Furth-Walker y cols., 1987; Hamalainen y cols., 1985; Kelley y cols., 1984).

En cuanto a la posible función fisiológica que desempeña la XOR en los animales viejos, además de degradar las purinas, no debemos olvidar que el ácido úrico, el producto final de la reacción de degradación de las purinas es un buen antioxidante, pudiendo desempeñar un papel importante en la neutralización del estrés oxidativo asociado al envejecimiento. Por otro lado, pensamos que puede tener una importante función en la regulación del flujo sanguíneo a través del óxido nítrico que es capaz de sintetizar. No debemos olvidar que con la edad aumenta tanto la forma XO como la forma XDH, y ésta es 50 veces más eficiente que la primera en la formación de óxido nítrico a partir de nitrito, pudiendo ser esta reacción de formación de óxido nítrico tan importante como la que lleva a cabo la NOS (Godber y cols., 2000).

Con el envejecimiento se desarrolla arteriosclerosis e insuficiencia circulatoria, la cual hace bajar el pH, debido a que se produce un aumento del ácido láctico, producto del metabolismo anaeróbico, y esta acidificación activa la reacción de reducción del nitrito a óxido nítrico catalizada por la XOR. Este óxido nítrico

formado por el endotelio de los vasos sanguíneos es una importante ayuda para regular el flujo en un vaso cuya producción por la NOS (óxido nítrico sintetasa) en condiciones de hipoxia y acidosis no funciona en toda su capacidad. El óxido nítrico desempeña diversas acciones antiaterogénicas por vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, de la proliferación de las células musculares lisas y de la adhesión leucocitaria a las células endoteliales de la pared vascular (Knowles y cols., 1994). Por otra parte, la microcirculación del músculo esquelético es responsable de gran parte de la resistencia periférica a la circulación, y la producción de óxido nítrico por parte de la xantina óxidoreductasa podría jugar un papel importante para evitar el aumento de la tensión arterial que se produce fisiológicamente con el envejecimiento.

El papel que juega la regulación del flujo sanguíneo en el ejercicio físico es fundamental, en la medida en que se ha demostrado que el entrenamiento provoca cambios adaptativos en el sistema cardiovascular (Scheuer y cols., 1977); (Bloomqvist y cols., 1983). Más recientemente se ha visto que el ejercicio físico de moderada (no baja) intensidad y de esprint protege el tejido muscular cardíaco de la lesión por reperfusión (Bowles y cols., 1992); (Bowles y cols., 1995; Korge y cols., 1990); (Paulson y cols., 1988). Entre los cambios que produce el entrenamiento se encuentra la modificación de la función del endotelio y del músculo liso vascular (Rogers y cols., 1991); (Delp y cols., 1993; Edwards y cols., 1985; Wang y cols., 1993) en grandes vasos, pero es el endotelio y no el músculo liso vascular el que responde y se adapta al entrenamiento en los vasos musculares periféricos (Koller y cols., 1995), provocando este entrenamiento un aumento de la sensibilidad vasodilatadora vascular en respuesta a un aumento del flujo como el que ocurre al realizar ejercicio físico. También se ha observado que la lesión por isquemia-reperfusión se reduce si ésta se produce tras un período de entrenamiento (Libonati y cols., 1997) y que la actividad muscular crónica provoca un aumento de la capilarización muscular (Skorjanc y cols., 1998).

¿Cuál es el punto en común entre el envejecimiento y el ejercicio físico que hace que en los animales jóvenes sometidos a ejercicio físico también esté aumentada la actividad xantina oxidasa en plasma? Nosotros pensamos que el vínculo es la

regulación del flujo sanguíneo muscular. Durante el envejecimiento se produce disfunción vascular que provoca cierto grado de hipoxia. Esta situación supone que el gasto energético del tejido (entre ellos el tejido muscular) sobrepasa el suministro de ATP que puede obtener por la vía aeróbica, con lo que se activa la vía metabólica anaeróbica, con la consiguiente acidosis. Durante el ejercicio físico, tanto al inicio de cualquier ejercicio como durante el ejercicio físico de alta intensidad (por encima del Umbral Anaeróbico) se produce una situación similar. El músculo esquelético que se está contrayendo está consumiendo energía a un mayor ritmo del que es capaz de suministrarle la vía aeróbica, con lo cual se activa la vía anaeróbica y se produce ácido láctico, con la consiguiente disminución del pH. La solución a ambas situaciones consiste en aumentar el suministro de oxígeno al tejido, para lo cual se debe producir una vasodilatación, en la cual el óxido nítrico juega un papel fundamental.

¿Por qué no está aumentada la actividad xantina óxidoreductasa en los homogenados de músculo y aorta de los animales sometidos a ejercicio físico agotador? El ejercicio físico al que han sido sometidos los animales es un ejercicio físico agudo, mientras que el envejecimiento es un proceso crónico. Si entrenáramos a los animales durante un tiempo, posiblemente observaríamos que el entrenamiento provoca un aumento de la xantina óxidoreductasa en el mismo sentido en el que lo provoca el envejecimiento. A favor de la importancia del óxido nítrico en el ejercicio físico está el hecho de que el entrenamiento aumenta la expresión de la SOD extracelular en vasos sanguíneos. Los autores interpretan este hecho como un sistema de neutralización del radical superóxido para evitar que interaccione con el óxido nítrico formado por la NOS, consiguiendo así que haya mayor concentración de éste y por tanto mayor efecto vasoregulator (Fukai y cols., 2000). Al mismo tiempo se consigue evitar la formación de peroxinitrito. Esta regulación de la SOD se lleva a cabo inicialmente por el óxido nítrico a través de la vía de la guanilato ciclasa y a través de las vías dependientes de la MAP-kinasa p38.

El hecho de que la XDH sea más eficaz en la síntesis de óxido nítrico y que no forme radical superóxido la hace una enzima beneficiosa para luchar contra la aterosclerosis. Sin embargo, la XO que da lugar a radical superóxido es una enzima

que *a priori* es perjudicial, ya que neutraliza la acción del óxido nítrico y además produce radical superóxido y agua oxigenada que provocan estrés oxidativo. Tal como se muestra en nuestros resultados, la aorta de los animales viejos presenta una mayor actividad total XOR, y un mayor porcentaje de actividad XO con respecto a la actividad total. Esto se traduce en una mayor producción de radical superóxido, tal como se puede observar en el apartado de resultados. Otros autores coinciden a la hora de demostrar que la aorta de rata vieja produce más radical superóxido que la aorta de rata joven (Csiszar y cols., 2002; Hamilton y cols., 2001; van der Loo y cols., 2000). La aorta vieja, reúne unas características favorables para desarrollar aterosclerosis, desde el punto de vista del estrés oxidativo, más favorables que la aorta de animales jóvenes. Esta afirmación estaría de acuerdo con el hecho de que la actividad xantina oxidasa en pacientes con coronariopatía está elevada con respecto a aquellos sin enfermedad (Harrison y cols., 2003). También se ha observado que los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica presenta hiperuricemia debido a una disminución del flujo sanguíneo periférico, el cual mejora tras la administración de alopurinol, un inhibidor selectivo de la XOR (Doehner y cols., 2002). Estos mismos autores comprueban que la administración de alopurinol mejora la vasodilatación dependiente del endotelio, pero no la independiente de éste, lo cual apoya nuestra hipótesis de que es el endotelio, que es donde se ubica la xantina óxidoreductasa, juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo tanto en el ejercicio como en el envejecimiento.

Que el estrés oxidativo está vinculado al ejercicio físico es algo que está universalmente aceptado. Que el estrés oxidativo está vinculado al envejecimiento también está ampliamente aceptado, independientemente de que sea la causa o no. Que la xantina óxidoreductasa contribuye al estrés oxidativo en el ejercicio físico, también está cada vez más aceptado. Nosotros proponemos aquí que la xantina óxidoreductasa contribuye al estrés oxidativo asociado al envejecimiento.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. Se ratifica que el ejercicio físico agotador provoca un aumento de la actividad plasmática de enzimas intracelulares del músculo tanto en animales jóvenes como en viejos.
2. El envejecimiento se asocia a estrés oxidativo en sangre, en hígado y en músculo esquelético.
3. El ejercicio físico agotador provoca un aumento del estrés oxidativo en sangre. Este es mayor en animales viejos que en jóvenes.
4. El ejercicio físico agotador provoca un aumento del estrés oxidativo en músculo, de igual magnitud en animales viejos que en jóvenes.
5. El ejercicio físico agotador aumenta el estrés oxidativo en hígado de animales jóvenes, mientras que en viejos no cambia.
6. El envejecimiento se asocia a una mayor actividad xantina oxidasa en plasma, músculo esquelético y aorta. Este aumento en la actividad se corresponde con un aumento de la expresión proteica de la enzima, tanto en músculo como en aorta.
7. Los vasos sanguíneos de animales viejos presentan una mayor producción de radical superóxido por la xantina oxidasa que los animales jóvenes.
8. El ejercicio físico agotador provoca un aumento de la actividad xantina oxidasa, sólo en plasma, y además sólo en animales jóvenes.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Abu-Soud, H. M.; Wang, J.; Rousseau, D. L.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J. y Stuehr, D. J. (1995). *Neuronal NO synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis*. J. Biol. Chem. 270: 22997-23006.
- 2.- Adachi, T.; Fukushima, T.; Usami, Y. y Hirano, K. (1993). *Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface*. Biochem. J. 289: 523-527.
- 3.- Akaike, T.; Ando, M. y Oda, T. (1990). *Dependence on O₂- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection*. J. Clin. Invest. 85: 739-745.
- 4.- Alessio, H. M.; Fulkerson, B. K. y Wiley, R. (1998). Med. Sci. Sport Exerc. 30.
- 5.- Alessio, H. M. y Goldfarb, A. H. (1988a). *Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training*. J. Appl. Physiol. 64: 1333-1336.
- 6.- Alessio, H. M.; Goldfarb, A. H. y Cutler, R. G. (1988b). *MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat*. Am. J. Physiol. 255: C874-C877.
- 7.- Al-Khalida, U. A. S. y Chaglassian, T. H. (1965). *Species distribution of xanthine oxidase*. Biochem. J. 97: 318-320.
- 8.- Allen, R. G. y Sohal, R. S. (1986). Role of glutathione in the aging and development of insects. Insect aging. Collatz, K. G. y Sohal, R. S. Berlin Heidelberg, Springer Verlag: 168-181.
- 9.- Amaya, Y.; Yamazaki, K.; Sato, M.; Noda, K. y Nishino, T. (1990). *Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from NAD-dependent type to O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin*. J. Biol. Chem. 265: 14170-14175.

-
- 10.- Amelink, G. J. y Bär, P. R. (1986). *Exercise-induced muscle protein leakage in the rat*. J. Neurol. Sci. 76: 61-68.
 - 11.- Amelink, G. J.; Kamp, H. H. y Bar, P. R. (1988). *Creatine kinase isoenzyme profiles after exercise in the rat: sex-linked differences in leakage of CK-MM*. Eur. J. Appl. Physiol. 412: 417-421.
 - 12.- Ames, B. N. (1983). *Dietary, carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases*. Science 221: 1256-1264.
 - 13.- Ames, B. N.; Cathcart, R.; Schwiers, E. y Hochstein, P. (1981). *Uric acid provides an antioxidant defence in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6858-6862.
 - 14.- Ames, B. N. y Gold, L. S. (1997). *Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer: misconceptions*. FASEB J. 11: 1041-1052.
 - 15.- Ames, B. N.; Shigenaga, M. K. y Hagen, T. M. (1993). *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7915-7922.
 - 16.- Anderson, M. E. (1997). *Glutathione and glutathione delivery compounds*. Adv. Pharmacol. 38: 65-78.
 - 17.- Anderson, M. E. y Meister, A. (1983). *Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathion synthesis*. Proc. Natl. acad. Sci. 80: 707-711.
 - 18.- Angermuller, S.; Bruder, G.; Volkl, A.; Wesch, H. y Fahimi, H. D. (1987). *Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study*. Eur. J. Cell Biol. 45: 137-144.
 - 19.- Apple, F. S. y Rhodes, M. (1988). *Enzymatic estimation of skeletal muscle damage by an analysis of changes in serum creatine kinase*. J. Appl. Physiol. 65: 2598-2600.
 - 20.- Armstrong, R. B. (1986). *Muscle damage and endurance events*. Sports Med. 3: 370-381.
 - 21.- Armstrong, R. B. (1990). *Initial events in exercise-induced muscular injury*. Me. Sci. Sports Exercise 22: 429-435.

-
- 22.- Armstrong, R. B.; Marum, P.; Tullson, P. y Saubert, C. W. (1979). *Acute hypertrophic response of skeletal muscle to removal of synergists*. J. Appl. Physiol. 46: 835-842.
- 23.- Armstrong, R. B.; Ogilvie, R. W. y Schwane, J. A. (1983). *Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle*. J. Appl. Physiol. 54: 80-93.
- 24.- Aruoma, O. I. y Halliwell, B. (1987). *Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?* Biochem. J. 241: 273-278.
- 25.- Aruoma, O. I. y Halliwell, B. (1989). *Inactivation of alfa1antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid*. FEBS Lett. 244: 76-80.
- 26.- Asami, S.; Hirano, T.; Yamaguchi, R.; Tsurudome, Y.; Itoh, H. y Kasai, H. (1998). *Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243(3): 678-82.
- 27.- Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardó, F. V.; García de la Asunción, J.; Estrela, J. M. y Viña, J. (1994). *A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples*. Anal. Biochem. 217: 323-328.
- 28.- Asunción, J. G.; Millan, A.; Pla, R.; Bruseghini, L. y al., e. (1996). *Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA*. FASEB J. 10: 333.
- 29.- Athar, M.; Elmets, C. A.; Bickers, D. R. y Muktar, J. (1989). *A novel mechanism for the generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative-mediated cutaneous photosensitization: activation of the xanthine oxidase pathway*. J. Clin. Invest. 83: 1137-1143.
- 30.- Aurand, L. W.; Boone, N. H. y Giddings, G. G. (1977). *Superoxide and singlet oxygen in milk peroxidation*. J. Dairy Sci. 60(3): 363-369.
- 31.- Babior, B. M. (1984). *Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction*. Blood 64: 959-966.
-

-
- 32.- Baccarini, D. P. (1978). *Coupled oxidation of NADPH wigy thiols at neutral pH*. Arch. Biochem. Biophys. 191: 315-357.
- 33.- Balnave, C. D. y Thompson, M. W. (1993). *Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage*. J. Appl. Physiol. 75: 1545-1551.
- 34.- Bangsbo, J. (1994). *Energy demands in competitive soccer*. J. Sports Sciences 12: S5-S12.
- 35.- Bar, P. R. (1990). *The influence of sex hormones on the plasma activity of muscle inzymes*. Int. J. Sports Med. 11: 409.
- 36.- Bar, P. R.; Amelink, G. J.; Oldenburg, B. y Blankenstein, M. A. (1988). *Prevention of exercise-induceck muscle membrane damage by oestradiol*. Life Sci. 42: 2677-2681.
- 37.- Barclay, J. K. y Hansen, M. (1991). *Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue*. Can. J. Pharmacol. 69: 279-284.
- 38.- Barja de Quiroga, C. (1999). *Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of produccion in states 4 an 3, organ spedificity and relation to aging and longevity*. J. Bioenergetics Biomembranes 31(4): 347-366.
- 39.- Barja de Quiroga, C.; Pérez-Campo, R. y López Torres, M. (1990). *Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats*. Biochem. J. 272: 247-250.
- 40.- Barja, G.; Cadenas, S.; Rojas, C.; Perez-Campo, R. y Lopez-Torres, M. (1994). *Low mitochondrial free radical production per unit O2 consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds*. Free Radic Res 21(5): 317-27.
- 41.- Barlow, G. H. y Margoliash, E. (1966). *Electrophoretic behavior of mammalian-type cytochromes c*. J. Biol. Chem. 241: 1473-1477.
- 42.- Barton, J. P. y Parker, J. E. (1970). *The radolysis of oxigenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O2*. Int. J. Radiat. Phys. Chem. 2: 159-166.
- 43.- Battaner, E.; Catalán, J.; López, M. F.; De Luis, J. M.; Ruiz, C. A. y Galán, M. A. (1990). 5 thMediterranean Congress on Chemical Engineering. Barcelona.
-

- Resolution of amino acid racemates with D-amino acid oxidase. Storage stability of the enzyme.
- 44.- Battelli, M. G.; Abbondanza, A. y Stirpe, F. (1992). *Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes. Conversion from D to O form and leakage from cells.* Chem. Biol. Interact. 83: 73-84.
- 45.- Battelli, M. G.; Della Corte, E. y Stirpe, F. (1972). *Xanthine oxidase type D (Dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat.* Biochem. J. 126: 747-749.
- 46.- Becker, B. F. (1993). *Towards the physiological function of uric acid.* Free Radical Biol. Med. 14: 615-631.
- 47.- Becker, B. F. y Gerlach, E. (1987). Uric acid, the major catabolite of cardiac adenine nucleotides and adenosine, originates in the coronary endothelium. Topics and perspectives in adenosine research. Gerlach, E. y Becker, B. F. Berlin., Springer-Verlag.: 209-222.
- 48.- Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A. y Freeman, B. A. (1990). *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1620-1624.
- 49.- Beckman, J. S. y Koppenol, W. H. (1996). *Nitric oxide, superoxide, and peroxyinitrite: the good, the bad and ugly.* Am. J. Physiol. 271: C1424-C1437.
- 50.- Beckman, J. S.; Ye, Y. Z.; Anderson, P.; Chen, J.; Accavetti, M. A.; Tarpey, M. M. y White, C. r. (1994). *Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry.* Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 375: 81-88.
- 51.- Beckman, K. B. y Ames, B. N. (1998). *The free radical theory of aging matures.* Physiol Rev 78(2): 547-81.
- 52.- Behar, D.; Czapski, G.; Rabami, J.; Dorfman, I. M. y Schwarz, H. A. (1979). *The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical.* J. Phys. Chem. 72(3209-3215).

-
- 53.- Bejma, J. y Ji, L. (1999). *Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle*. J. Appl. Physiol. 87: 465-470.
- 54.- Benboubetra, M.; Gleeson, A.; Harris, C. P.; Khan, J.; Arrar, L.; Brennan, D.; Reid, J.; Reckless, J. D. y Harrison, R. (1997). *Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults*. Eur. J. Clin. Invest 27: 611-619.
- 55.- Berglund, L.; Rasmussen, J. T.; Andersen, M. D.; Rasmussen, M. S. y Petersen, T. E. (1996). *Purification of the bovine xanthine oxidoreductase from milk fat globule membranes and cloning of complementary deoxyribonucleic acid*. J. Dairy Sci. 79: 198-204.
- 56.- Bielsky, B. H. y Gebieki, J. M. (1977). Application of radiation chemistry to biology. Free radicals in biology. W.A., P., Academic Press. 3: 1-19.
- 57.- Bloomqvist, C. G. y Saltin, B. (1983). *Cardiovascular adaptations to physical training*. Annu. Rev. Physiol. 45: 988-992.
- 58.- Borel, J. P.; Monboisse, J. C. y Bellon, G. (1988). Med. Sci. 5: 304-311.
- 59.- Bourgain, R. H.; Deby, C.; Deby-Dupont, G. y Andries, R. (1982). *Enhancement of arterial thromboformation by uric acid, a free radical scavenger*. Biochem. Pharmacol. 31: 3011-3013.
- 60.- Boveris, A. y Cadenas, E. (1975). *Mitochondrial generation of hydrogen peroxide anions and its relationship to the actinomycin insensitive respiration*. FEBS Lett. 54: 311-316.
- 61.- Boveris, A.; Cadenas, E. y Stoppani, O. M. (1976). *Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. Biochem. J. 191: 421-427.
- 62.- Boveris, A. y Chance, B. (1973). *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. Biochem J 134: 707-716.
- 63.- Boveris, A.; Oshino, N. y Chance, B. (1972). *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem. J. 128: 617-630.
- 64.- Bowles, D. K.; Farrar, R. P.; Fordyce, D. E. y Starnes, J. W. (1992). *Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart*. Am. J. Physiol. 263: 804-809.
-

-
- 65.- Bowles, D. K. y Starnes, J. W. (1995). *Role of exercise in the cause and prevention of cardiac dysfunction*. Exerc. Sport Sci. Rev. 23: 349-373.
- 66.- Brady, P. S.; Brady, L. J. y Ullrey, D. E. (1979). *Selenium, vitamin C and the response to swimming stressing the rat*. J. Nutr. 10: 1103-1109.
- 67.- Brass, C. A.; Narciso, J. y Gollan, J. L. (1991). *Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver*. J. Clin. Invest. 87: 424-431.
- 68.- Bray, R. C.; Lowe, D.; Godber, B.; Harrison, R. y Eisenthal, R. (1999). Properties of xanthine oxidase from human milk: The enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. Flavins and Flavoproteins. Ghisa, S., Kroneck, P. M. H., Macheroux, P. y Sund, H. Berlin, Agency for Scientific Publication.: 775-778.
- 69.- Bredt, D. S.; Hwang, P. M.; Glatt, C. E.; Lownstein, C.; Reed, R. R. y Synder, S. H. (1991). *450 Reductase*. Nature 351: 714-718.
- 70.- Brigelius, R.; Muckel, C.; Akerboom, T. P. M. y Sies, H. (1983). *Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathion disulfide*. Biochem. Pharm. 32: 2526-2534.
- 71.- Briviba, K. y Sies, H. (1994). Natural antioxidants in human health and disease. Frei, B. San Diego, Academic Press: 107-128.
- 72.- Brooks, S. V. y Faulkner, J. A. (1994). *Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms*. Med. Sci. Sports Exerc. 26: 432-439.
- 73.- Bruder, G.; Heid, H. W.; Jarasch, E. D. y Mather, I. H. (1983). *Immunological identification and determination of xanthine oxidase in cells and tissues*. Differentiation. 23: 218-225.
- 74.- Buga, G. m.; Griscavage, J. N.; Rogers, n. E. y Ignarro, L. J. (1993). *Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide*. Circ. Res. 73: 808-812.
- 75.- Burton, G. y Ingold, K. U. (1984). *beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant*. Science 224: 569-573.
- 76.- Burton, G. y Traber, M. (1990). *Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability*. Annu. Rev. Nutr. 10: 357-382.
-

-
- 77.- Burton, K. P. (1988). *Evidence of direct toxic effects of free radicals on the myocardium*. Free Rad. Biol. Med. 4: 15-24.
- 78.- Cadenas, E.; Lertsiri, S.; Otsuka, M.; Barja, G. y Miyazawa, T. (1996). Free Rad. Res. 26: 485-493.
- 79.- Campbell, M. J.; MacComas, A. J. y Petito, F. (1998). *Physiological changes in aging muscles*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 36: 174-182.
- 80.- Cannon, J. G. y Blumberg, H. B. (1994). Acute phase immune responses in exercise. Exercise and Oxygen Toxicity. Sen, C. K. New York, Elsevier Science: 447-479.
- 81.- Cannon, J. G.; Orencole, S. F.; Fielding, R. A.; Meydani, M.; Meydani, S.; Fitarone, J. B.; Blumberg, J. B. y Evens, W. J. (1990). *Acute phase response in exercise: Interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release*. Am. J. Physiol. 256: R1214.
- 82.- Capdevila, L.; Parkhill, L.; Chacos, N.; Okita, R.; Masters, B. B. S. y Estabrook, R. W. (1981). *The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101: 1357-1362.
- 83.- Castedo, M.; Hirsch, T.; Susin, S. A.; Zamzami, n.; Marchetti, P.; macho, A. y Kroemer, G. (1996). *Sequetial acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis*. J. Immunol. 157: 512-521.
- 84.- Cazzaniga, G.; Terao, M.; Lo Schiavo, P.; Galbiati, F.; Segalla, F.; Seldin, M. F. y Garattini, E. (1994). *Chromosomal mapping, isolation, and characterization of the mouse xanthine dehydrogenase gene*. Genomics 23: 390-402.
- 85.- Chance, B.; Sies, H. y Boveris, A. (1979). *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol. Rev. 59: 527-605.
- 86.- Chasseaud, L. F. (1974). Glutathione-S-transferases. XVI Conference of the German Society of Biological Chemistry., Thieme. Stuttgart.
- 87.- Chen, J. y Gollnick, P. D. (1994). *Effect of exercise on hexokinase distribution and mitochondrial respiration in sekeletal muscle*. Pflügers Arch. 427: 257-263.
-

-
- 88.- Chignell, C. F. (1979). Spin labelling in pharmacology. Espin labeling. New York, Academic Press. 2: 223-228.
- 89.- Christon, R.; Haloui, R. B. y al., e. (1995). *Dietary polyunsaturated fatty acids and aging modulate glutathione-related antioxidants in rat liver*. J. Nutr. 125: 3062-3070.
- 90.- Chung, H. Y.; Song, S. H.; Kim, K. J.; Ikeno, Y. y Yu, B. P. (1999). *Modulation of renal xanthine oxidoreductase in aging: gene expression and reactive oxygen species generation*. J. Nutr. Health Aging 3: 19-23.
- 91.- Claremont, D.; Jackson, M. J. y Jones, D. A. (1984). J. Physiol. 353: 57.
- 92.- Cohen, G. M. (1997). *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem. J. 326: 1-16.
- 93.- Commoner, B.; Townsend, J. y Pake, G. E. (1954). *Free radicals in biological materials*. Nature 174: 689-691.
- 94.- Cook, J. D.; Lipschitz, D. A.; Miles, L. E. M. y Finch, C. A. (1974). *Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects*. AM. J. Clin. Nutr. 27: 681-687.
- 95.- Cooper, D. E.; Vollaard, N. B.; Choveiri, T. y Wilson, M. T. (2002). *Exercise, free radicals and oxidative stress*. Biochem. Soc. Trans. 30: 280-285.
- 96.- Cooper, J. M.; Mann, V. M. y Schapira, A. H. V. (1992). *Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing*. J. Neurol. Sci. 113: 91-98.
- 97.- Corbisier, P. y Remacle, J. (1990). *Involvement of mitochondria in cell degeneration*. European J. Cell. Biol. 51: 173-182.
- 98.- Cornell, L. S. y Meister, A. (1976). *Glutathione and gamma-glutamyl cycle enzymes in crypt and villus tip cells of rat jejunus mucosa*. Proc. Natl. acad. Sci. 73: 420-422.
- 99.- Cross, C. E. (1987). *Oxygen radicals and human disease*. Ann. Intern. Med. 107: 526-545.
- 100.- Csiszar, A.; Ungvari, Z.; Edwards, J. G.; Kaminski, P.; Wolin, M. S.; Koller, A. y Kaley, G. (2002). *Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function*. Circ. Res. 90: 1159-1166.
-

-
- 101.- Cutler, R. G. (1984). Antioxidants, aging and longevity. Free radicals in biology. Pryor, W. A. Orlando, Academic Press. IV: 371-428.
- 102.- Davies, K. J. (1993). *Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes*. Biochem. Soc. Trans. 21: 346-352.
- 103.- Davies, K. J. A.; Delsignore, M. E. y Lin, S. W. (1987). *Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids*. J. Biol. Chem. 262: 9902-9907.
- 104.- Davies, K. J. A.; Lin, S. W. y Pacifici, R. E. (1987). *Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Denaturation of denatured protein*. J. Biol. Chem. 262: 9914-9920.
- 105.- Davies, K. J. A.; Quintanilha, A. T.; Brooks, G. A. y Packer, L. (1982). *Free radicals and tissue damage produced by exercise*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107: 1198-1205.
- 106.- Davies, K. J. A.; Sevanian, A.; Muakkassah-Kelly, S. F. y Hochstein, P. (1986). *Uric acid-iron iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid*. Biochem. J. 235: 747-754.
- 107.- Davis, M. D.; Edmonson, D. E. y Muller, D. N. (1984). *31P nuclear magnetic resonance and chemical studies of the phosphorus residues in bovine milk xanthine oxidase*. Eur. J. Biochem. 145: 237-243.
- 108.- De, A. K. y Darad, R. (1991). *Age-associated changes in antioxidants and antioxidative enzymes in rats*. Mech. Ageing Dev. 59: 123-128.
- 109.- de Jong, J. W.; van der Meer, P.; Nieukoop, A. S.; Huizer, A. S.; Stroeve, R. J. y Bos, E. (1990). *Xanthine oxidase activity in perfused hearts of various species, including humans*. Circ. Res. 67: 770-773.
- 110.- Deby, C.; Deby-Dupont, G.; Noel, F. X. y Lavergne, L. (1981). *In vitro and in vivo arachidonic acid conversions into biologically active derivatives are enhanced by uric acid*. Biochem. Pharmacol. 30: 2243-2249.
- 111.- Della Corte, E.; Gozetti, F.; Novello, F. y Stirpe, F. (1969). *Properties of the xanthine oxidase from human liver*. Biochim. Biophys. Acta 191: 164-166.
- 112.- Della Corte, E. y Stirpe, F. (1972). *The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from*
-

- dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme.* Bio. Chem. J. 126: 739-745.
- 113.- Delp, M. D.; McAllister, R. M. y Laughlin, M. H. (1993). *Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta.* J. Appl. Physiol. 75: 1354-1363.
- 114.- Deno, P. C. y I.H., G. (1982). *Free radical mechanisms involved in the formation of secuencia-dependent bristanded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin.* Chem. Res. Toxicol 5(3): 311-332.
- 115.- Díaz, P. T.; She, Z. W.; Davis, W. B. y Clanton, T. L. (1993). *Hydroxylation of salicylate by the in vitro diaphragm: evidence for hydroxyl radical production during fatigue.* J. Appl. Physiol. 75: 540-545.
- 116.- Dikov, V. A.; Alexandrov, I.; Russinova, A. y Boyadjieva-Michailova, A. (1988). *Ultracytochemical demonstration of enzymes by reduction of potassium hexacyanoferrate (III). I. A method for demonstration of xanthine oxidase.* Acta Histochem. 83: 107-115.
- 117.- Dillard, C. J.; Litov, R. E.; Savin, W. M. y Tappel, A. L. (1978). *Effects of exercise, vitamin E and ozone on pulmonary function and lipid eroxidation.* J. Appl. Physiol. 45: 927-932.
- 118.- Dixon, M. y Thurlow, S. (1924). Biochem. J. 18: 989-992.
- 119.- Doehner, W.; Schoene, N.; Rauchhaus, M.; Leyva-Leon, F.; Pavitt, D. V.; Reaveley, D. A.; Schuler, G.; Coats, A. J.; Anker, S. D. y Hambrecht, R. (2002). *Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endotrhelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies.* Circulation 105: 2619-2624.
- 120.- Dolphin, D. (1988). The generation of free radicals during de normal and abnormal functioning of citocromes P450. Oxygen radicals in biology and medicine. Simic, M. G. T., K.A.; Ward, F. F., Sonntag, C.: 491-500.
- 121.- Doroshow, J. y Hochstein, P. (1982). Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseades. Pathology of Oxigen. New York, Academic Press: 245-253.

-
- 122.- Downey, J. M.; Hearse, D. J. y Yellon, D. M. (1988). *The role of xanthine oxidase during myocardial ischemia in several species including man*. J. Mol. Cell. Cardiol. 2: 55-63.
- 123.- Dröge, W. (2002). *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. Physiol. Rev. 82: 47-96.
- 124.- Duarte, J. A. R.; Appell, H. J.; Carvalho, F.; Bastos, M. L. y Soares, J. M. C. (1994). *Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage*. Int. J. Sports Med. 14: 440-443.
- 125.- Dumont, A.; Hehner, S. P.; Hofmann, T. G.; Ueffing, M.; Dröge, W. y Schmitz, M. L. (1999). *Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondrial-derived reactive oxygen species and the activation of NFκB*. Oncogene 18: 747-757.
- 126.- Duthie, G. G.; Robertson, J. D.; Maughan, R. J. y Morrice, P. C. (1990). *Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running*. Arch Biochem Biophys 282(1): 78-83.
- 127.- Eddy, L. J.; Stewart, J. R.; Jones, H. P.; Engerson, T. D.; McCord, J. M. y Downey, J. M. (1987). *Free radical-producing enzyme, xanthine oxidase, is undetectable in human hearts*. Am. J. Physiol. 253: H709-H711.
- 128.- Edmonson, D. E.; Davis, M. D. y Muller, F. (1984). Flavins & Flavoproteins. Bray, R. C., Engel, P. C. y Mayhew, S. G. Berlin, Walter de Gruyter & Co.
- 129.- Edwards, J. G.; Tipton, C. M. y Matthes, R. D. (1985). *Influence of exercise training on reactivity and contractility of arterial strips from hypertensive rats*. J. Appl. Physiol. 58: 1683-1688.
- 130.- Engelman, K.; Watts, R. W. E.; Klineberg, J. R.; Sjoerdsina, A. y Seegmiller, J. E. (1964). *Clinical, Physiological, and biochemical studies of patient with xanthinuria and pheochromocytoma*. Am. J. Med. 37: 839-861.
- 131.- Engerson, T. D.; McKelvey, T. G.; Thyne, D. B.; Boggio, E. B.; Snyder, S. J. y Jones, H. P. (1987). *Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues*. J. Clin. Invest. 79: 1564-1570.
- 132.- Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Nishino, T. y Pai, E. F. (2000). *Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and*
-

-
- xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 20: 10723-10728.
- 133.- Ernest, M. y Kim, K. H. (1973). *Regulation of rat liver glycogen synthetase. Reversible inactivation of glycogen synthetase D by sulphydril disulfide exchange.* J. Biol. Chem. 248: 1550-1555.
- 134.- Esterbauer, J.; Striegl, G.; Puhl, H.; Oberreither, S.; Rotheneder, M.; El-Saadani, M. y Jürgens, G. (1989). *The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins.* Annal. N. Y. Acad. Sci. 570: 254-267.
- 135.- Esteve, J. M.; Mompó, J.; García de la Asunción, J.; Sastre, J.; Asensi, M.; Boix, J.; Viña, J. R.; Viña, J. y Pallardó, F. V. (1999). *Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro.* FASEB J. 13: 1055-1064.
- 136.- Favilli, F.; Lantomassi, T. y al., e. (1994). *Relationship between age and GSH metabolism in synaptosomes of rat cerebral cortex.* Neurobiol. Aging 15: 429-433.
- 137.- Fenton, H. J. H. (1894). *Oxidation of tartaric acid in the presence of iron.* J. Chem. Soc. Trans. 65: 899-910.
- 138.- Fhaolain, I. N. y Coughlan, M. P. (1976). *Turkey liver xanthine dehydrogenase. Relation between nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity and the content of functional enzyme.* Biochem. J. 157: 283-285.
- 139.- Fiebig, R.; Leeuwenburgh, C.; Gore, M. y Ji, L. L. (1996). *The interactive effects of aging and training on myocardial antioxidant enzymes and oxidative stress.* Age 19: 83-89.
- 140.- Finkel, T. y Holbrook, N. J. (2000). *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.* Nature 408(6809): 239-47.
- 141.- Fonoll, C.; Canela, E. I. y Bozal, J. (1980). *Chicken liver xanthine dehydrogenase kinetic behaviour with oxygen or NAD⁺ as electron acceptors.* J. Mol. Catal. 8: 401-409.
-

-
- 142.- Forman, H. J. y Azzi, A. (1997). *On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology*. FASEB J. 11: 374-375.
- 143.- Foster, R. R. y Estabrook, R. W. (1993). *Is oxygen an essential nutrient?* Annu. Rev. Nutr. 13: 383-403.
- 144.- Fraga, C. G.; Shigenaga, M. K.; Park, J. W.; Degan, P. y Ames, B. N. (1990). *Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in rat organ DNA and urine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4533-4537.
- 145.- Frederiks, W. M. y Bosch, K. S. (1996). *The Proportion of Xanthine Oxidase Activity of Total Xanthine Oxidoreductase Activity In Situ Remains constant in Rat Liver Under Various (Patho)Physiological Conditions*. Hepatology 24: 1179-1184.
- 146.- Freeman, B. A. y Crapo, J. (1982). *Free radicals and tissue injury*. Lab. Invest. 47: 412-426.
- 147.- Frei, B. (1994). *Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action*. Am. J. Med. 97(3A): 5S-13S.
- 148.- Frei, B.; Stocker, R. y Ames, B. N. (1988). *Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9748-9752.
- 149.- Friden, J.; Kjorell, U. y Thronell, L. (1984). *Delayed muscle soreness and dytoskeletal alterations: an immunocytological study in man*. Int. J. Sports Med. 5: 15-18.
- 150.- Friden, J. y Lieber, R. L. (1992). *Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury*. Med Sci Sports Exerc 24(5): 521-30.
- 151.- Friden, J.; Sjöström, M. y Ekblom, B. (1983). *Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man*. Int. J. Sports Med. 4: 170-176.
- 152.- Fridovich, I. (1978). *The biology of oxygen radicals*. Science 201: 875-880.
- 153.- Fridovich, I. (1986). *Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxygen Toxicity*. Free Radicals and Biology. Pryor, W. A. New York, Academic Press. 1: 239-246.
- 154.- Fridovich, I. y Handler, P. (1962). J. Biol. Chem. 237: 916-921.
-

-
- 155.- Fukui, T.; Siegfried, M. R.; Ushio-Fukai, M.; Cheng, Y.; Kojda, G. y Harrison, D. G. (2000). *Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training*. J. Clin. Invest. 105: 1631-1639.
- 156.- Furth-Walker, D. y Amy, N. K. (1987). *regulation of xanthine oxidase activity and immunologically detectable protein in rats in response to dietary protein and iron*. J. Nutr. 117: 1697-1703.
- 157.- Gale, A. N. y Murphy, E. A. (1979). *The use of serum creatine phosphokinase in genetic counseling for Duchenne muscular dystrophy*. J. Chron. Dis. 32: 639-651.
- 158.- Galley, H. F.; Davies, M. J. y Webster, N. R. (1996). *Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome*. Crit. Care Med. 24: 1649-1653.
- 159.- García de la Asunción, J.; Millan, A.; Pla, R.; Bruseghini, L.; Esteras, A.; Pallardo, F. V.; Sastre, J. y Viña, J. (1996). *Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA*. FASEB J. 10: 333-338.
- 160.- Gardner, T. J.; Stewart, J. R.; Casale, A. S.; Downey, J. M. y Chambers, D. E. (1983). *Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers*. Surgery 94: 423-427.
- 161.- Ghio, A. J.; Kennedy, T. P.; Stonehuerner, J.; Carter, J. D.; Skinner, K. A.; Parks, D. A. y Hoidal, J. R. (2002). *Iron regulates xanthine oxidase activity in the lung*. Am. J. Physiol. 283: L563-L572.
- 162.- Giesecke, G. y Tiemeyer, W. (1984). *Defect of uric acid uptake in Dalmatian dog liver*. Experientia 40: 1415-1416.
- 163.- Giler, S. H.; Sperling, O.; Broxh, S.; Urca, I. y De Vries, A. (1975). Clin. Chim. Acta 63: 37-40.
- 164.- Gimeno, A. (1998). *Papel de los radicales libres de oxígeno en el daño causado por el ejercicio físico agotador*. Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Valencia, Universitat de València: 254.

-
- 165.- Godber, B.; Sanders, S. A.; Harrison, R.; Eisenthal, R. y Bray, R. C. (1997). *> or = 95% of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin*. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 519S.
- 166.- Godber, L. J. B.; Doel, J. J.; Sapkota, P. G.; Blake, R. D.; Stevens, R. C.; Eisenthal, R. y Harrison, R. (2000). *Reduction of Nitrite to Nitric Oxide Catalyzed by Xanthine Oxidoreductase*. *J. Biol. Chem.* 275: 7757-7763.
- 167.- Godon, C.; Lagniel, G.; Lee, J.; Buhler, J. M.; Kieffer, S.; Perrot, M.; Boucherie, H.; Toledano, M. B. y Labarre, J. (1998). *The H₂O₂ stimulon in Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 22480-22489.
- 168.- Gohil, K.; Viguie, C.; Stanley, W. C.; Brooks, G. A. y Packer, L. (1988). *Blood glutathione oxidation during human exercise*. *J. Appl. Physiol.* 64: 115-119.
- 169.- Goldschmidt, L. (1970). *Seasonal variations in red cell glutathione levels with aging in mental patients and normal controls*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133: 555-559.
- 170.- Goldstein, S. y Czapski, G. (2000). *Reactivity of peroxynitrite versus simultaneous generation of (*NO and O(2)(*)(-) toward NADH*. *Chem. Res. Toxicol* 13: 736-741.
- 171.- Goldstein, S.; Czapski, G.; Lind, J. y Merényi, G. (2000). *Tyrosin nitration by simultaneous generation of NO· and O₂· - under physiological conditions. How the radicals do the job*. *J. Biol. Chem.* 275: 3031-3036.
- 172.- Gollnick, P. D.; Bertocci, L. A.; Kelso, T. B.; Witt, E. H. y Hodgson, D. R. (1990). *The effect of high-intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle*. *Pflügers Arch.* 415: 407-413.
- 173.- Gollnick, P. D.; Hodgson, D. R. y Byrd, S. K. (1989). Advances in Miochemistry. *Benzi, G.* 2:339-350.
- 174.- Gómez-Cambronero, L. G.; Sabater, L.; Pereda, J.; Cassinello, N.; Camps, B.; Viña, J. y Sastre, J. (2002). *Role of cytokines and oxidative stress in the pahophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications*. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 1: 393-403.
- 175.- Goto, S.; Hasegawa, A.; Nakamoto, A.; Nakamura, A.; Takahashi, R. y Kurochkin, I. V. (1995). *Age-associated changes of oxidative modification*
-

- and turnover of proteins. Oxidative stress and aging. Cutler, R. G. Gasel, Switzwetland, Birkhauser Verlag: 151-158.
- 176.- Grace, P. A. (1994). *Ischaemia-reperfusion injury*. Br. J. Surg. 81: 637-647.
- 177.- Granger, D. N. (1994). *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury*. Am. J. Physiol. 266: H1269-H1275.
- 178.- Granger, D. N. y Kubes, P. (1996). *Nitric oxide as anti-inflammatory agent*. Methods Enzymol. 369: 434-442.
- 179.- Granger, D. N.; Rutili, G. y McCord, J. M. (1981). *Role of superoxide radicals in intestinal ischemia*. Gastroenterology 81: 22-29.
- 180.- Greenwald, R. A.; Bannister, W. H. y Bannister, J. V. (1980). Biological and clinical aspects of superoxid and superoxide dismutase. Amsterdam, Elsevier: 160.
- 181.- Greger, R.; Lang, F. y Deetjen, P. (1976). *Renal excretion of purine metabolites, urate and allantoin, by the mammalian kidney*. Int. Rev. Physiol. 11: 257-281.
- 182.- Gresser, U. y Gathof, B. (1991). Epidemiology of hyperuricaemia. Urate deposition in man and its clinical consequences. Gresser, U. y Zöllner, N. Berlin, Springer-Verlag: 82-96.
- 183.- Griscavage, J. M.; Fukuto, J. M.; Komori, Y. y Ignarro, L. J. (1994). *Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with their heme prosthetic group: role of tetrahydrobiopterin in modulating inhibitory action of nitric oxide*. J. Biol. Chem. 269: 21644-21649.
- 184.- Grisham, M. B.; Hernández, L. A. y Granger, D. N. (1986). *Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia*. Am. J. Physiol. 251: G567-G574.
- 185.- Grisham, M. B.; Jourdeuil, D. y Wink, D. A. (1999). *Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation*. Am. J. Physiol. 276: G315-G321.
- 186.- Grisham, M. B. y McCord, J. M. (1986). Physiolog of oxygen radicals. Baltimore, Williams and Wilkins.

-
- 187.- Grum, C. M.; Ragsdale, R. A.; Ketai, L. H. y Shlafer, M. (1986). *Absence of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141: 1104-1108.
- 188.- Grum, C. M.; Ragsdale, R. A.; Ketai, L. H. y Simon, R. H. (1987). *Plasma xanthine oxidase in patients with adult respiratory distress syndrome*. J. Crit. Care 2: 22-26.
- 189.- Grum, C. M.; Ragsdale, R. A.; Ketai, L. H. y Simon, R. H. (1991). *Plasma xanthine oxidase in patients with adult respiratory distress syndrome*. J. Crit. Care 2: 22-26.
- 190.- Gryglewsl, R. J.; Palmer, R. M. J. y Moncada, S. (1986). *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor*. Nature 320: 454-456.
- 191.- Haber, F. y Weis, J. (1932). *Über die katalyse des hydroperoxydes*. Naturwiss 20: 948.
- 192.- Hakkinen, K.; Alen, M.; Kallinen, M.; Izquierdo, M.; Jokelainen, K.; Lassila, H.; Malkia, E.; Kraemer, W. J. y Newton, R. U. (1998). *Muscle CSA, force production, and activation of leg extensors during isometric and dynamic actions in middle-aged and elderly men and women*. J. Aging Phys. Act. 6: 232-247.
- 193.- Hakkinen, K.; Kallinen, M.; Izquierdo, M.; Jokelainen, K.; Lassila, H.; Malkia, E.; Kraemer, W. J.; Newton, R. U. y Alen, M. (1998). *Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people*. J. Appl. Physiol. 84: 1341-1349.
- 194.- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1985). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Press.
- 195.- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press.
- 196.- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1990). *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. Methods Enzymol. 186: 1-85.

-
- 197.- Hamalainen, M. M. y Makinen, K. K. (1985). *Duodenal xanthine oxidase (EC1.232) and ferroxidase activities in the rat in relation to the increased iron absorption caused by peroral xylitol*. Br. J. Nutr. 44: 493-498.
- 198.- Hamilton, C. A.; Brosnan, M. J.; McIntyre, M.; Graham, D. y Dominiczak, A. F. (2001). *Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction*. Hypertension 37: 529-534.
- 199.- Hamuro, J.; Murata, Y.; Suzuki, M.; Takatsuki, F. y Suga, T. (1999). *The triggering and healing of tumor stromal inflammatory reactions regulated by oxidative and reductive macrophages*. Gann. Monograph. Cancer Res. 48: 153-164.
- 200.- Harman, D. (1956). *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol. 2: 298-300.
- 201.- Harman, D. (1972). *The biological clock: The mitochondria*. Journal of de American Geriatrics Society. 20(4): 145-147.
- 202.- Harman, D. (1991). *The aging process: Major risk factor for disease and death*. Proc. Natl. acad. Sci. 88: 5360-5363.
- 203.- Harris, C. M. y Massey, V. (1994). Flavins and flavoproteins 1993. Yagi, K. Berlin, Walter de Gruyter & Co.: 723-726.
- 204.- Harris, C. M. y Massey, V. (1997). *The Reaction of Reduced Xanthine Dehydrogenase with Molecular Oxygen*. J. Biol. Chem. 272: 8370-8379.
- 205.- Harrison, D.; Griendling, K. K.; Landmesser, U.; Hornig, B. y Drexler, H. (2003). *Role of oxidative stress in atherosclerosis*. Am. J. Cardiol. 91 (suppl.): 7A-11A.
- 206.- Hassan, H. M. y Fridovich, I. (1977). *Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 252: 7667-7672.
- 207.- Hassoun, P. M.; Yu, F. S.; Cote, C. G.; Zulueta, J. J.; Sawhney, R.; Skinner, K. A.; Skinner, H. B.; Parks, D. A. y Lanzillo, J. J. (1998). *Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 158: 299-305.
- 208.- Hassoun, P. M.; Yu, F. S.; Shedd, A. L.; Zulueta, J. J.; Thannickal, V. J.; Lanzillo, J. J. y Fanburg, B. L. (1994). *Regulation of endothelial cell xanthine*
-

- dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension. Am. J. Physiol.* 266: L163-L171.
- 209.- Hayward, R.; Ferrington, D. A.; DKochanowski, L. A.; Miller, L. M.; Jaworsky, G. M. y Schneider, C. M. (1999). *Effects of dietary protein on enzyme activity following exercise-induced muscle injury. Med. Sci. Sport Exerc.* 31: 414-420.
- 210.- Hazelton, G. A. y Lang, C. A. (1980). *Glutathione contents of tissues in the aging mouse. Biochem. J.* 188: 25-30.
- 211.- Hehner, S. P.; Breikreutz, R.; Shubinsky, G.; Unsoleld, H.; Schulze-Osthoff, K.; Schmitz, M. L. y Dröge, W. (2000). *Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. J. Immunol.* 165: 4319-4328.
- 212.- Hellsten, Y. (1994). The role of xanthine oxidase in exercise. Exercise and oxygen toxicity. Sen, C., Packer, L. y Hänninen, O. Amsterdam, Elsevier Science.: 211-234.
- 213.- Hellsten, Y. (2000). The role of xanthine oxidase in exercise. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Sen, C., Packer, L. y Hänninen, O. Amsterdam, Elsevier Science B. V.: 153-176.
- 214.- Hellsten Westing, Y. (1993). *Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. Histochemistry* 100: 215-222.
- 215.- Hellsten Westing, Y.; Sollevi, A. y Sjödin, B. (1991). *Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man. Eur. J. Appl. Physiol.* 62: 380-384.
- 216.- Herrero, A. y Barja, G. (1997). *ADP regulation of mitochondrial free radical production is different wigy Complex I or Complex II-linked substrates. Implication for the exiercise paradox and brain hypermetabolism. J. Bioenergetic and Biomembranes.* 29: 241-249.
- 217.- Heunks, L. M.; Vina, J.; van Herwaarden, C. L.; Folgering, H. T.; Gimeno, A. y Dekhuijzen, P. N. (1999). *Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol* 277(6 Pt 2): R1697-704.

-
- 218.- Higuchi, M.; Cartier, L. J.; Chen, M. y Holloszy, J. O. (1985). *Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise*. J. Gerontol. 40: 281-286.
- 219.- Hille, R. (1996). *The mononuclear molybdenum enzymes*. Chem. Rev. 96: 2757-2816.
- 220.- Hille, R. y Nishino, T. (1995). *Xanthine oxidase and xanthine deshydrogenase*. FASEB J. 9: 995-1003.
- 221.- Hille, R. y Stewart, R. C. (1984). *The inhibition of xanthine oxidase by 8-bromoxanthine*. J. Biol. Chem. 259: 1570-1576.
- 222.- Holmgren, A. (1979). *Glutaredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide*. J. Biol. Chem. 254: 9627-9632.
- 223.- Holmgren, A. (1989). *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. J. Biol. Chem. 264: 13963-13966.
- 224.- Hortobagyi, T. y Denahan, T. (1989). *Variability in creatine kinase: methodological, exercise, and clinically related factors*. Int. J. Sports Med. 10: 69-80.
- 225.- Houston, M.; Estevez, A.; Chumley, P.; Aslan, M.; Marklund, S.; Parks, D. A. y Freeman, B. A. (1999). *Binding of Xanthine Oxidase to Vascular Endothelium*. J. Biol. Chem. 274: 4985-4994.
- 226.- Hunt, J. y Massey, V. (1992). *Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase*. J. Biol. Chem. 267: 21479-21485.
- 227.- Ichida, K.; Ayama, Y.; Noda, K.; Minoshima, S.; Hosoya, T.; Sakai, O.; Shimizu, N. y Nishino, T. (1993). *Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene*. Gene 133: 279-284.
- 228.- Ichikawa, M.; Nishino, T.; Nishino, T. y Ichikawa, A. (1992). *Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes: High-resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis*. J. Histochem. Cytochem. 40: 1097-1103.

-
- 229.- Ichimori, K.; Fukahori, M.; Nakazawa, H.; Okamoto, K. y Nishino, T. (1999). *Inhibition of Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase by Nitric Oxide*. J. Biol. Chem. 274: 7763-7768.
- 230.- Ikegami, T. y Nishino, T. (1986). *The presence of desulfo xanthine dehydrogenase in purified and crude enzyme preparations from rat liver*. Arch. Biochem. Biophys. 247: 254-260.
- 231.- Ikuta, N.; Sugiyama, S.; Takagi, K.; Satake, T. y Ozawa, T. (1992). *Implication of oxygen radicals on airway hyperresponsiveness after ovalbumin challenge in guinea pigs*. Am. Rev. Respir. Dis. 145: 561-565.
- 232.- Ishii, T.; Itoh, K.; Sato, H. y Bannai, S. (1999). *Oxidative stress-inducible proteins in macrophages*. Free Radical Res. 31: 351-355.
- 233.- Iwasaki, T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Mizushima, J.; Hori, H. y Nishino, T. (2000). *Sequence motif-specific assignment of tyo [2Fe-2S] clusters in rat xanthine oxidoreductase studied by site-directed mutagenesis*. J. Biochem. (Tokyo) 127: 771-778.
- 234.- Jackson, M. J. (1996). Oxygen-derived radical production and muscle damage during running exercise. Human muscular function during dynamic exercise. Medicine and sport science. Marconnet, P., Saltin, B., Komi, P. y Poortmans, J. Basel, Karger. 41: 121-133.
- 235.- Jackson, M. J.; Edwards, R. H. T. y Symons, M. C. (1985). *Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle*. Biochim. Biophys. Acta 847: 185-190.
- 236.- Jackson, M. J.; Jones, D. A. y Harris, E. J. (1984). *Inhibition of lipid peroxidation in muscle homogenates by phospholipase A2 inhibitors*. Biosci. Rep. 4: 581-587.
- 237.- Jackson, M. J.; McArdle, A. y Edwards, R. H. T. (1991). Calcium, Oxygen Radicals and Cellular Damage. Duncan, C. J. Cambridge, Cambridge University Press: 139-148.
- 238.- Jackson, R. M. y Curtis, F. V. (1989). *Re-expansion, re-oxygenation and rethinking*. Am. J. Med. Sci. 289: 44-50.
-

-
- 239.- Jacobson, M. D.; Burne, J. F. y Raff, M. C. (1994). *Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus*. EMBO J. 13: 1899-1910.
- 240.- Janero, D. (1991). *Therapeutic potential of vitamin E against myocardial ischemic-reperfusion injury*. Free Rad. Biol. Med. 10: 315-324.
- 241.- Janolino, V. G. y Swaisgood, H. E. (1975). *Isolation and characterization of sulphydryl oxidase from bovine milk*. J. Biol. Chem. 250: 2532-2538.
- 242.- Janssen, G. M. E.; Kuipers, H.; Willems, G. M.; Does R, J. M. M.; Janssen, M. P. E. y Geurten, P. (1989). *Plasma activity of muscle enzymes. Quantification of skeletal muscle damage and relationship with metabolic variables*. Int. J. Sports Med. Suppl. 3: S160-S168.
- 243.- Janssen, I.; Heymsfield, S. B.; Wang, Z. y Ross, R. (2000). *Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 years*. J. Appl. Physiol. 89: 81-88.
- 244.- Jarasch, E. D.; Bruder, G. y Heid, H. W. (1986). *Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells*. Acta Physiol. Scand. Suppl. 548: 39-46.
- 245.- Jarasch, E. D.; Grund, C.; Bruder, G.; Heid, H. W.; Keenan, t. W. y Franke, W. W. (1981). *Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium*. Cell 25: 67-82.
- 246.- Jenkins, R. R. (1988). *Free radical chemistry: relationship to exercise*. Sports Med. 5: 156-170.
- 247.- Jensen, P. K. (1966). *Antimycin insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles*. Biochem. Biophys. Acta. 122: 157-161.
- 248.- Jeroudi, M. O.; Hartley, C. J. y Bolli, R. (1994). *Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants*. Am. J. Cardiol. 73: 2B-7B.
- 249.- Jewett, S. L.; Eddy, L. J. y Hochstein, P. (1989). *Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury*. Free Radical Biol. Med. 6: 185-188.

-
- 250.- Ji, L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of cellular antioxidant systems. Exercise and Sport Science Reviews. Holloszy, J. O. Baltimore, Williams and Wilkins.: 135-166.
- 251.- Ji, L. y Fu, R. G. (1992). *Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hidroperoxide*. J. Appl. Physiol. 72: 549-554.
- 252.- Ji, L. L.; Dillon, D. y Wu, D. (1990). *Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver*. Am. J. Physiol. 258(4(Pt 2)): R918-R923.
- 253.- Ji, L. L.; Leeuwenburgh, C.; Leichtweis, S.; Gore, M.; Fiebig, R.; Hollander, J. y Bejma, J. (1998). *Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 854: 102-17.
- 254.- Ji, L. L.; Stratman, F. y Lardy, H. (1988). *Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise*. Arch Biochem Biophys 263: 150-160.
- 255.- Johnson, F. B.; Sinclair, D. A. y Guarente, L. (1999). *Molecular biology of aging*. Cell 96(2): 291-302.
- 256.- Johnson, J. L.; Rajagopalan, K. V. y Cohen, H. J. (1974). *Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of unguen on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat*. J. Biol. Chem. 249: 859-866.
- 257.- Jones, D. A.; Jackson, M. J. y Edwards, H. T. (1983). *Release of intracellular enzymes from an isolated mammalian skeletal muscle preparation*. Clin. Sci. Lond. 65: 193-201.
- 258.- Jones, D. A.; Jackson, M. J.; McPhail, G. y Edwards, R. H. T. (1984). *Experimental mouse muscle damage: the importance of external calcium*. Clin. Sci. 66: 317-322.
- 259.- Jourdeuil, D.; Jourdeuil, F. L.; Kutchukian, P. S.; Musah, R. A.; Wink, D. A. y Grisham, M. B. (2001). *Reaction of Superoxide and Nitric Oxide with Peroxynitrite*. J. Biol. Chem. 276: 28799-28805.
- 260.- Kagan, V.; Shvedova, A.; E., S.; Khan, S.; Swanson, C.; Powell, R. y Packer, L. (1992). *Dihydrolipoic acid--a universal antioxidant both in the membrane and*
-

- in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals.* Biochem. Pharmacol. 44: 1637-1649.
- 261.- Kasai, H. y Nishimura, S. (1984). *Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents.* Nucleic Acids Res. 12: 2137-2145.
- 262.- Kayyali, U. S.; Donaldson, C.; Huang, H.; Abdelnour, R. y Hassoun, P. M. (2001). *Phosphorylation of Xanthine Dehydrogenase/Oxidase in Hypoxia.* J. Biol. Chem. 276: 14359-14365.
- 263.- Keiding, R.; Horder, M. y Gerhardt, W. (1974). *Recommended methods for determination of four enzymes in blood.* Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33: 291-306.
- 264.- Kelley, M. y Amy, N. K. (1984). *Effecto of molybdenum-deficient and low iron diets on xanthine oxidase activity and iron status in rats.* J. Nutr. 114: 1652-1659.
- 265.- Kim, Y. M.; Talanian, R. V. y Billiar, T. R. (1997). *Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms.* J. Biol. Chem. 272: 31138-31148.
- 266.- Kirkwood, T. B. L. y Austad, S. N. (2000). *Why do we age?* Nature 408: 233-238.
- 267.- Kleban, S. J. (1982). Advances in Host Defense Mechanisms. Galin, J. I. y Fauci, A. S. New York, Raven Press. 1: 111-162.
- 268.- Knowles, R. G. y Moncada, S. (1994). *Nitric oxide synthases in mammals.* Biochem. J. 298: 249-258.
- 269.- Koh, T. J. (2002). *Do Small Heat Shock Proteins protects skeletal muscle from injury?* Exerc. Sport Sci. Rev. 30: 117-121.
- 270.- Kolassa, N.; Pflieger, K. y Rummel, W. (1970). *Specificity of adenosine uptake into the heart and inhibition by dipyridamole.* Europ. J. Pharmacol. 9: 265-268.
- 271.- Kolbeck, R. C.; She, Z. W.; Callahan, L. A. y Nosek, T. M. (1997). *Increased superoxide production during fatigue in the rat diaphragm.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 140-145.

-
- 272.- Koller, A.; Huang, A.; Sun, D. y Kaley, G. (1995). *Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles*. *Circ. Res.* 76: 544-550.
- 273.- Komulainen, H.; Kytölä, J. y Vihko, V. (1994). *Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats*. *J. Appl. Physiol.* 77((5)): 2299-2304.
- 274.- Komulainen, J.; Pitkänen, R. y Vihko, V. (1993). *Muscle water content and exercise-induced damage in mice after submaximal running*. *Med. Sci. Res.* 21: 111-113.
- 275.- Kooij, A.; Schijns, M.; Frederiks, W. M.; Van, N. C. J. y James, J. (1992). *Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues: a histochemical and biochemical study*. *Virchows Arch. B. Cell. Pathol.* 63: 17-23.
- 276.- Kooij, A.; Schiller, H. J.; Schijns, M.; F., V. N. C. J. y Frederiks, W. M. (1994). *Conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia*. *Hepatology* 19: 1488-1495.
- 277.- Korge, P. y Mannick, G. (1990). *The effect of regular physical exercise on the sensitivity to ischemia in the rat's heart*. *Eur. J. Appl. Physiol.* 61: 42-47.
- 278.- Korycka-Dahi, M. y Richardson, T. (1981). *Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk*. *J. Dairy. Sci.* 63: 1181-1208.
- 279.- Kosower, N. S. y Kosower, E. M. (1983). *Glutathione and cell membrane thiol status. Functions of glutathione: Biochemical, Toxicological and Clinical aspects*. Larsson, A., Holmgren, A., Orrenius, S. y Mannervick, B. New York, Raven Press: 307-315.
- 280.- Krenitsky, T. A.; Spector, T. y Hall, W. W. (1986). *Xanthine oxidase from human liver: Purification and characterization*. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 108-119.
- 281.- Krenitsky, T. A.; Tuttle, J. V.; Cattau, E. L. y Wang, P. (1974). *A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase*. *Comp. Biochem. Physiol.* 49B: 687-703.

-
- 282.- Kretzschmar, M.; Müller, D.; Hübscher, J.; Marin, E. y Klinger, W. (1991). *Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man*. Int. J. Sports Med. 12: 218-222.
- 283.- Krinsky, N. (1994). Natural antioxidants in human health and disease. Frei, B. San Diego, Academic Press: 239-262.
- 284.- Krinsky, N. y Denecke, S. (1982). *Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids*. J. Natl. Cancer Inst. 69: 205-209.
- 285.- Kroll, K.; Bukowski, T. R.; Schwartz, L. M.; Knoepfler, D. y Bassingthwaighe, J. B. (1992). *Capillary endothelial transport of uric acid in guinea pig heart*. Am. J. Physiol. 262: H420-H431.
- 286.- Kuge, S. y Jones, N. (1994). *YAP-1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides*. EMBO J. 13: 655-664.
- 287.- Kurosaki, M.; Li, C. M.; Scanziani, e.; Garattini, E. y Terao, M. (1995). *Tissue- and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide*. Biochem. J. 306: 225-234.
- 288.- Kwong, L. K. y Sohal, R. S. (2000). *Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse*. Arch. Biochem. Biophys. 373: 16-22.
- 289.- Lamas, S.; Marsden, P. A.; Li, G. K.; Tempst, P. y Michel, T. (1992). *Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6348-6359.
- 290.- Lankisch, P. G.; Pohl, U.; Otto, J.; Wereszczynska-Siemiatkowska, U. y Gröne, H. (1989). *Xanthine oxidase inhibitor in acute experimental pancreatitis in rats and mice*. Pancreas 4: 436-440.
- 291.- Lantomasi, T.; Favilli, F. y al., e. (1993). *Age and GSH metabolism in rat cerebral cortex, as related to oxidative and energy parameters*. Mech. Ageing Dev. 70: 65-82.
-

-
- 292.- Larsson, L.; Grimby, G. y Karlsson, J. (1978). *Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22-65 years*. Acta Physiol. Scand. 103: 31-39.
- 293.- Larsson, L.; Grimby, G. y Karlsson, J. (1978). *Muscle strenght and speed of movement in relation to age and muscle morphology*. J. Appl. Physiol. 46: 451-456.
- 294.- Larsson, L.; Li, X. y Frontera, W. R. (1997). *Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human muscle fibers*. Am. J. Physiol. 272: C638-C649.
- 295.- Lassen, U. V. (1961). *Kinetics of uric acid transport in human erythrocytes*. Biochim. Biophys. Acta 53: 557-569.
- 296.- Latour, M. G.; Brault, A.; Huet, P. M. y Lavoie, J. M. (1999). *Effects of acute physical exercise on hepatocyte volume and function in rat*. Am. J. Physiol. 276: H1258-H1264.
- 297.- Laughlin, M. H.; Simpson, T.; Sexton, W. L.; Brown, O. R.; Smith, J. K. y Korthuis, R. J. (1990). *Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training*. J. Appl. Physiol. 68: 2337-2343.
- 298.- Lee, P. C. (1973). *Effect of allopurinol on tissue xanthine oxidase levels in mice*. Arch. Biochem. Biophys. 157: 322-323.
- 299.- Leeuwenburgh, C.; Fiebig, R.; Chandwaney, R. y Ji, L. L. (1994). *Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems*. Am. J. Physiol. 267(2 Pt 2): R439-45.
- 300.- Leeuwenburgh, C.; Hollander, J.; Leichtweis, S.; Fiebig, R.; Gore, M. y Ji, L. L. (1997). *Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific*. Am. J. Physiol. 272: R363-R369.
- 301.- Leeuwenburgh, C. y Ji, L. L. (1995). *Glutathione depeleton in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation*. Arch. Biochem. Bhiophys. 316: 941-949.
- 302.- Leeuwenburgh, C. y Ji, L. L. (1996). *Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats*. J. Nutr. 126: 1833-1843.
-

-
- 303.- Leeuwenburgh, C.; Leichtweis, S.; Hollander, J.; Fiebig, R.; Gore, M. y Ji, L. L. (1996). *Effect of acute exercise on glutathione deficient heart*. Mol. Cell. Biochem. 156: 17-24.
- 304.- Leipert, B.; Becker, B. F. y Gerlach, E. (1992). *Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators*. Am. J. Physiol. 262: H1676-H1683.
- 305.- Lew, H.; Pyke, S. y Quintanilha, A. T. (1985). *Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats*. FEBS Lett. 185: 262-266.
- 306.- Lexell, A. (1995). *Human aging, muscle mass, and fiber type composition*. J. Gerontol. 50: 11-16.
- 307.- Lexell, J.; Taylor, C. C. y Sjoström, M. (1988). *What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15 to 83 year-old men*. J. Neurol. Sci. 84: 275-294.
- 308.- Li, H.; Samouilov, A.; Liu, X. y Zweier, J. L. (2001). *Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues*. J Biol Chem 276(27): 24482-9.
- 309.- Li, J.; Billiar, T. R.; Talanian, R. V. y Kim, Y. M. (1997). *Nitric oxide reversibility inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 240: 419-424.
- 310.- Libonati, J. R.; Gaughen, J. P.; Chafner, C. A.; Gow, A.; Paolone, A. M. y Houser, S. R. (1997). *Reduced ischemia and reperfusion injury following exercise training*. Med. Sci. Sport Exerc. 29: 509-516.
- 311.- Lieber, R. L. y Friden, J. (1999). *Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction*. J. Sci. Med. Sport 2: 253-265.
- 312.- Lieber, R. L.; Schmitz, M. C.; Mishra, D. K. y Friden, J. (1994). *Contractile and cellular remodeling in rabbit skeletal muscle after cyclic eccentric contractions*. J. Appl. Physiol. 7: 1926-1934.
-

-
- 313.- Lijnen, P.; Hespel, P.; Fagard, R.; Lysens, R.; van den Eynde, E.; Goris, M.; Goossens, W.; Lissens, W. y Amery, A. (1988). *Indicators of cell breakdown in plasma of men firing and after a marathon race*. Int. J. Sports Med. 9: 108-113.
- 314.- Linder, N.; Rapola, J. y Raivio, K. O. (1999). *Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues*. Lab. Invest. 79: 967-974.
- 315.- Liochev, S. I. y Fridovich, I. (1994). *The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: in vitro and in vivo*. Free Radical Biol. Med. 16: 29-33.
- 316.- Liu, R. M. (2002). *Down-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging*. J. Neurosci. 68: 344-351.
- 317.- Liu, R. M. y Choi, J. (2000). *Age-associated decline of gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression in rats*. Free Rad. Biol. Med. 28: 566-574.
- 318.- Loguercio, C.; Taranto, d.; Vitale, L. M.; Beneduce, f. y Del Vecchio Blanco, C. (1996). *Effect of liver cirrhosis and age on the glutathione concentration in the plasma, erythrocytes, and gastric mucosa of man*. Free Rad. Biol. Med. 20: 483-488.
- 319.- Loschen, G.; Azzi, A.; Richter, C. y Flohe, L. (1974). *Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide*. FEBS Lett. 42: 68-74.
- 320.- Lott, J. A. (1984). *Serum enzyme determinations in the diagnosis of acute myocardial infarction: an update*. Hum. Pathol. 15: 706-716.
- 321.- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farra, a. E. y Randall, R. J. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 322.- Lucas-Heron, B. y Fontenaille, C. (1979). *Urate transport in human red blood cells. Activation by ATP*. Biochim. Biophys. Acta 553: 284-294.
- 323.- Luhtala, T.; Roecher, E. B.; Pugh, T.; Feuers, R. J. y Weindruch, R. (1994). *Dietary restriction opposes age-related increases in rat skeletal muscle antioxidant enzyme activities*. J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci. 49: B231-B238.
-

-
- 324.- Lyman, S. V. y Hurst, J. K. (1995). *Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants*. J. Am. Chem. Soc. 117: 8867-8868.
- 325.- MacMicking, J.; Xie, Q. W. y Nathan, C. (1997). *Nitric oxide and macrophage function*. Annu. Rev. Immunol. 15: 323-350.
- 326.- Madsen, K.; Erbjerg, P.; Djurhuus, M. S. y Pedersen, P. K. (1996). *Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria*. Am. J. Physiol. 271: E1044-E1050.
- 327.- Malech, H. L. y Gallin, J. I. (1987). *Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases*. N. Engl. J. Med. 317: 687-694.
- 328.- Manfredi, T. G.; Fielding, R. A.; O'Reilly, K. P.; Meredith, C. N.; Lee, H. Y. y Evans, W. J. (1991). *Plasma creatine kinase activity and exercise-induced muscle damage in older men*. Med. Sci. Sports Exerc. 23: 1028-1034.
- 329.- Marin, E.; Kretzschmar, M.; Arokoski, J.; Hanninen, O. y Klinger, W. (1993). *Enzymes of glutathion synthesis in dog skeletal muscles and their response to training*. Acta Physiol. Scand. 147: 369-373.
- 330.- Mason, R. P. (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. Free radicals biology. Pryor, W. A. New York, Academic Press: 262-165.
- 331.- Mason, R. P. y Fisher, V. (1986). *Free radicals of acetaminopen: their subsequent reactions and toxicological significance*. Federation Proc. 45(2493).
- 332.- Massey, V.; Shopfer, L. M.; Nishino, T. y Nishino, T. (1989). *Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with flavin active site probes*. J. Biol. Chem. 264: 10567-10573.
- 333.- Maurice, M. M.; Van Der Voort, E.; Van Vliet, A. I.; Tak, P. P.; Breedveld, F. C. y Verweij, C. L. (1998). The rheumatoid joint: redox-paradox? Oxidative Stress in Cancer, AIDS and Neurodegenerative Diseases. Montagnier, L., Olivier, R. y Pasquier, C. New York, Dekker: 517.
-

-
- 334.- May, J.; Mendiratta, S.; Hill, K. y Burk, R. F. (1997). *Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase*. J. Biol. Chem. 272: 22607-22610.
- 335.- McArdle, A.; Edwards, R. H. T. y Jackson, M. J. (1991). *Effects of contractile activity on muscle damage in the dystrophin-deficient mdx mouse*. Clin.Sci. 80: 367-371.
- 336.- McArdle, A.; Edwards, R. H. T. y Jackson, M. J. (1992). *Accumulation of calcium by normal and dystrophin-deficient mouse muscle during contractile activity in vitro*. Clin. Sci. 82: 455-459.
- 337.- McArdle, A. y Jackson, M. J. (1994). Basic Appl. Myol. 4: 43-50.
- 338.- McArdle, A. y Jackson, M. J. (2000). *Exercise, oxidative stress and ageing*. J. Anat. 197 Pt 4: 539-41.
- 339.- McArdle, A.; Pattwell, D.; Vasilaki, A.; Griffiths, R. D. y Jackson, M. J. (2001). *Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses*. Am. J. Physiol. 280(3): C621-C627.
- 340.- McArdle, A.; van der Meulen, J. H.; Catapano, M.; Symons, M. C.; Faulkner, J. A. y Jackson, M. J. (1995). *Free radical activity during contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats*. J. Physiol. (Lond.) 487: 157P-158P.
- 341.- McArdle, A.; van der Meulen, J. H.; Catapano, M.; Symons, M. C.; Faulkner, J. A. y Jackson, M. J. (1999). *Free radical activity following contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats*. Free Radic Biol Med 26(9-10): 1085-91.
- 342.- McBride, T. A.; Gorin, F. A. y Carlsen, R. C. (1995). *Prolonged recovery and reduced adaptation in aged rat muscle following eccentric exercise*. Mech. Ageing Dev. 15(83): 185-200.
- 343.- McCarter, R. J. M. (2000). *Caloric restriction, exercise and aging*. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Sen, C., Packer, J. y Hänninen, O. Amsterdam, Elsevier Science B. V.
- 344.- McCord, J. M. (1974). *Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase*. Science 185: 5229-531.
-

-
- 345.- McCord, J. M. y Fridovich, I. (1969). *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein*. J. Biol. Chem. 244: 6049-6055.
- 346.- McCutcheon, L. J.; Byrd, S. K. y Hodgson, D. R. (1992). *Ultrastructural changes in skeletal muscle after fatiguing exercise*. J. Appl. Physiol. 72: 1111-1117 (fe de erratas en J. Appl. Physiol. (1993) 74:970).
- 347.- McKelvey, T. G.; Höllwarth, M. E.; Granger, D. N.; Engerson, T. D.; Landler, U. y Jones, H. (1988). *Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney*. Am. J. Physiol. 254: G753-G760.
- 348.- McManaman, J. L. y Bain, D. L. (2002). *Structural and Conformational Analysis of the Oxidase to Dehydrogenase Conversion of Xanthine Oxidoreductase*. J. Biol. Chem. 277: 21261-21268.
- 349.- Meister, A. (1995). *Glutathione metabolism*. Methods Enzymol. 251: 3-7.
- 350.- Meister, A. y Anderson, M. E. (1983). *Glutathione*. Ann. Rev. Biochem. 52: 711-760.
- 351.- Meydani, M.; Cannon, J. G.; Burril, J.; Orencole, S. F.; Fielding, R. A.; Fitarone, J. B.; Blumberg, J. B. y Evens, W. J. (1990). *Protective effect of vitamin E on exercise induced oxidative damage in young and elderly subjects*. Free Rad. Biol. Med. 9: 109.
- 352.- Meydani, M. y Evans, W. J. (1993). Free radicals, exercise, and aging. Free radicals in aging. Yu, B. Boca Raton. Florida, CRC Press.
- 353.- Miles, A. M.; Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B.; Winks, D. A. y Grisham, M. B. (1996). *Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide*. J. Biol. Chem. 271: 40-47.
- 354.- Millar, T. M.; Stevens, C. R.; Benjamin, N.; Eisenthal, R.; Harrison, R. y Blake, D. R. (1997). *Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia*. FEBS Lett. 427: 225-228.
- 355.- Miquel, J.; Economos, A. C.; Fleming, J. y Johnson, J. E. J. (1980). *Mitochondrial role in cell aging*. Exp. Gerontol. 15: 579-591.
- 356.- Miquel, J. y Fleming, J. (1986). Theoretical and experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of cell aging. Free radicals,
-

- aging and degenerative diseases. Johnson, J. E. J., Walford, R. y Harman, D. New York., Alan R. Liss: 51-74.
- 357.- Miyazawa, T.; Fujimoto, K.; Suzuki, T. y Yasuda, K. (1994). *Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography*. Methods Enzymol. 233C: 324-332.
- 358.- Mohazzab, K. M. y Wolin, M. S. (1994). *Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle*. Am. J. Physiol. 267: L815-L822.
- 359.- Moriwaki, Y.; Yamamoto, T.; Yamaguchi, K.; Suda, M.; Yamakita, J.; takahashi, S. y Higashino, K. (1996). *Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human tissues*. Acta Histochem. Cytochem. 29: 153-162.
- 360.- Nakamura, H.; Matsuda, M.; Furuke, K.; Kitaoka, Y.; Iwata, S.; Toda, K.; Inamoto, T.; Yamaoka, Y.; Ozawa, K. y Yodoi, J. (1994). *Adult T cell leukemia-derived factor human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide*. Immunol. Lett. 42: 75-80.
- 361.- Nakamura, H.; Nakamura, K. y Yodoi, J. (1997). *Redox regulation of cellular activation*. Annu. Rev. Immunol. 15: 351-369.
- 362.- Nakamura, M. (1991). *Allopurinol insensitive oxygen radical formation by milk xanthine oxidase systems*. J. Biochem. (Tokyo) 110: 450-456.
- 363.- Nakata, K.; Kawase, M. y al., e. (1996). *Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives*. Mech. Ageing Dev. 90: 195-207.
- 364.- Navarro-Arévalo, A.; Cañavate, C. y Sánchez-del-Pino, M. J. (1999). *Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training*. Mech. Ageing Dev. 108: 207-217.
- 365.- Nees, S.; Herzog, V.; Becker, B. F.; Böck, M.; Des Rosiers, C. y Gerlach, E. (1985). *The coronary endothelium: A highly active metabolic barrier for adenosine*. Basic Res. Cardiol. 80: 515-529.

-
- 366.- Netto, L.; Chae, H.; Kang, S.; Rhee, S. G. y Stadtman, E. R. (1996). *Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties*. J. Biol. Chem. 271: 15315-15321.
- 367.- Newham, D. J.; Jones, D. A. y Edwards, R. H. T. (1983). *Large delayed plasma creatine kinase changes after stepping exercise*. Muscle and Nerve 6: 380-385.
- 368.- Niess, A. M.; Hartmann, A.; Grunert-Fuchs, M.; Poch, B. y Speit, G. (1996). *DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men*. Int. J. Sports Med. 17(6): 397-403.
- 369.- Niki, E.; Noguchi, N.; Tsuchihashi, H. y Gotoh, N. (1995). *Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene*. AM. J. Clin. Nutr. 62 (suppl.): 1322S.
- 370.- Nimmo, M. A. y Snow, D. H. (1982). *Time course of ultrastructural changes in skeletal muscle after two types of exercise*. J. Appl. Physiol. 52: 910-913.
- 371.- Nishino, T. y Nishino, T. (1997). *The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene*. J. Biol. Chem. 272: 29859-29864.
- 372.- Nishino, T.; Nishino, T.; Schopfer, L. M. y Massey, V. (1989). *The reactivity of chicken liver xanthine dehydrogenase with molecular oxygen*. J. Biol. Chem. 264: 2518-2527.
- 373.- Noakes, T. D. (1987). *Effect of exercise on serum activities in humans*. Sports Med. 4: 245-267.
- 374.- Nohl, H. y Jordan, W. (1986). *The mitochondrial site of superoxide formation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 533-539.
- 375.- Norman, B.; Sollevi, A.; Kaijser, L. y Jansson, E. (1987). *ATP breakdown products in human skeletal muscle during prolonged exercise to exhaustion*. Clin. Physiol. 7: 503-510.
- 376.- Nosaka, K.; Clarkson, P. M.; McGuiggin, M. E. y Byrne, J. M. (1991). *Time course of muscle adaptation after high force eccentric exercise*. Eur. J. Appl. Physiol. 63: 70-76.
-

-
- 377.- Novak, L. P. y Tillery, G. W. (1977). *Relationship between serum creatin phosphokinase to body composition*. Hum. Biol. 49: 375-380.
- 378.- Nuttall, S. L.; Martin, U.; Sinclair, A. J. y Kendall, M. (1998). *Glutathione: in sickness and in health*. The lancet 351: 645-646.
- 379.- O'Neill, C. A.; Stebbins, C. L.; S., B.; Halliwell, B. y Longhurst, J. C. (1996). *Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats*. J. Appl. Physiol. 81: 1197-1206.
- 380.- Oberley, L. W. (1988). *Free radicals in diabetes*. Free Rad. Biol. Med. 5: 113-124.
- 381.- Obst, O. y Kammermeier, H. (1990). *Transcapillary gradients of noradrenaline and uric acid: Properties of the endothelial cell*. Pflügers Arch. 415 (Suppl. 1).
- 382.- Ochoa, S. (1983). *Regulation of protein synthesis initiation in eucaryotes*. Arch. Biochem. Biophys. 223: 325-349.
- 383.- Ogino, N.; Yamamoto, S.; Hayaishi, O. y Tokuyama, T. (1979). *Isolation of an activator for prostaglandin hydroperoxidase from bovine vesicular gland cytosol and its identification as uric acid*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87: 184-191.
- 384.- Oh-Ishi, S.; Kizaki, T.; Nagasawa, J.; Yamashita, H.; Nagata, N.; Suzuki, K.; Taniguchi, N. y Ohno, H. (1997). *Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 5: 326-332.
- 385.- Oh-Ishi, S.; Kizaki, T.; Ookawara, T.; Yamashita, H.; Nagata, N.; Suzuki, K.; Taniguchi, N. y Ohno, H. (1997). *Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 1579-1585.
- 386.- Oh-Ishi, S.; Kizaki, T.; Yamashita, H.; Nagata, N.; Suzuki, K.; Taniguchi, N. y Ohno, H. (1995). *Alterations of superoxide dismutase iso-enzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle*. Mech. Ageing Dev. 84(1): 65-76.
-

-
- 387.- Ohkuwa, T.; Sato, Y. y Naoi, M. (1997). *Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats*. Acta Physiol. Scand. 9: 237-244.
- 388.- Ohno, H.; Suzuki, K.; Ffujii, J.; Yamashita, H.; Kizaki, T.; Oh-ishi, S. y Taniguchi, N. (1994). Exercise and Oxygen Toxicity. Amsterdam, Elsevier Publishers.
- 389.- Ohta, H.; Adachi, T. y Hirano, K. (1994). *Internalization of human extracellular-superoxide dismutase by bovine aortic endothelial cells*. Free Radical Biol. Med. 16: 501-507.
- 390.- Okamoto, K. y Nishino, T. (1995). *Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor*. J. Biol. Chem. 270: 7816-7821.
- 391.- Ortenblad, N.; Madsen, K. y Djurhuus, M. S. (1997). *Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans*. Am. J. Physiol. 272: R1258-1263.
- 392.- Packer, J.; Slater, T. y Wilson, R. (1979). *Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C*. Nature 278: 737-738.
- 393.- Packer, L. (1994). *Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 738: 257-264.
- 394.- Page, C. C.; Moser, C. C.; Chen, X. y Dutton, P. L. (1999). *Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction*. Nature (London) 402(4):47-52.
- 395.- Paller, M. S. y Neumann, T. V. (1991). *Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation*. Kidney Int. 40: 1041-1049.
- 396.- Palozza, P.; Luberto, C.; Calviello, G.; Ricci, P. y Bartoli, G. M. (1997). *Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure*. Free Rad. Biol. Med. 22: 1065-1073.
- 397.- Papa, S.; Guerrieri, F. y Capitanio, N. (1997). *A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxygen defense system of the cell*. Biosci. Rep. 17: 23-31.
-

-
- 398.- Parks, D. A.; Williams, T. K. y Bechman, J. S. (1988). *Conversion of xanthine deshydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation*. Am. J. Physiol. 254(Gastrointest. Liver Physiol. 17): G768-G774.
- 399.- Patterson, V. H.; Kaiser, K. K. y Brooke, M. H. (1982). *Forearm exercise increases plasma hypoxanthine*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 45: 552-553.
- 400.- Paulson, D. J.; Kopp, S. J.; Peace, D. G. y Tow, J. P. (1988). *Improved potischemic recovery of cardiac pump function in exercise trained diabetic rats*. J. Appl. Physiol. 65: 187-193.
- 401.- Pearl, R. (1928). The rate of living. London, Univ. of London Press.
- 402.- Peden, D. B.; Hohman, R.; Brown, M. E.; Mason, R. T.; Berkebile, C.; Fales, H. M. y Kaliner, M. A. (1990). *Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7638-7642.
- 403.- Peeze Binkhorst, F. M.; Slaaf, D. W.; Kuipers, H.; Tangelder, G. J. y Reneman, R. S. (1990). *Exercise-induced swelling of rat soleus muscle: its ralisationhip with intramuscular pressure*. J. Appl. Physiol. 69: 67-73.
- 404.- Pfeffer, K. D.; Huecksteadt, T. P. y R., H. J. (1994). *Xanthine dehydrogenase and santhine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation*. J. Immunol. 135: 1789-1797.
- 405.- Pfeifier, R.; Karl, G. y Sholz, R. (1986). Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 367: 1061-1068.
- 406.- Phoenix, J.; Edwards, R. H. T. y Jackson, M. J. (1989). *Inhibition of Ca²⁺-induced cytosolic enzyme efflux from sekeletal muscle by vitamin E and related compounds*. Biochem. J. 287: 207-213.
- 407.- Phoenix, J.; Edwards, R. H. T. y Jackson, M. J. (1991). *The effect of vitamin E analogues and long hydrocarbon chain compounds on clacium-induced muscle damage. A novel role for alpha-tocopherol?* Biochim. Biophys. Acta. 1097: 212-218.
- 408.- Pilger, A.; Germadnik, D.; Formanek, D.; Zwick, H.; Winkler, N. y Rudiger, H. W. (1997). *Habitual long-distance running does not enhance urinary excretion of 8- hydroxydeoxyguanosine*. Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 75(5): 467-9.
-

-
- 409.- Pincemail, J.; Deby, C.; Thirion, A.; Dethier, A.; Deby-Dupont, G. y Goutier, R. (1986). *Stimulation of cyclooxygenase by activated human neutrophils is enhanced by uric acid*. Prostaglandins. 32: 101-105.
- 410.- Popovich, B. K.; Boheler, K. R. y Dillmann, W. H. (1989). *Diabetes decreases creatine kinase enzyme activity and mRNA level in the rat heart*. Am. J. Physiol. 20: E573-E577.
- 411.- Porras, A. G. y Palmer, G. (1982). *The room temperature potentiometry of xanthine oxidase with oxygen. Kinetics of peroxide and superoxide formation*. J. Biol. Chem. 257: 11617-11626.
- 412.- Porter, M. M.; Vandervoort, A. A. y Lexell, J. (1995). *Aging of human muscle: structure, function and adaptability*. Scand. J. Med. Sci. Sports 5: 129-142.
- 413.- Poss, W. B.; Hueckstaedt, T. P.; Panus, P. C.; Freeman, B. A. y Hoidal, J. R. (1996). *Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia*. Am. J. Physiol. 270: L941-L946.
- 414.- Powers, S.; Criswell, D.; Lawler, J.; Ji, L.; Martin, D.; Herb, R. y Dudley, G. (1994). *Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle*. Am. J. Physiol. 266: R375-R380.
- 415.- Powers, S.; Criswell, D.; Lawler, J.; Ji, L.; Martin, D.; Herb, R. y Dudley, G. (1994). *Regional training-induced alterations in diaphragmatic oxidative and antioxidant enzymes*. Respir. Physiol. 95: 227-237.
- 416.- Powers, S.; Ji, L. L. y Leeuwenburgh, C. (1999). *Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review*. Med. Sci. Sport Exerc. 31: 987-997.
- 417.- Powers, S.; Lawler, J.; Criswell, D.; Lieu, F. y Martin, D. (1992). *Aging and respiratory muscle metabolic plasticity: effects of endurance training*. J. Appl. Physiol. 72: 1068-1073.
- 418.- Pyke, S.; Lew, H. y Quintanilha, A. T. (1986). *Severe depletion in liver glutathione during physical exercise*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 139: 926-931.
-

-
- 419.- Quinlan, G. J.; Lamb, N. J.; Tilley, R.; Evans, T. W. y Gutteridge, J. M. (1997). *Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155: 479-484.
- 420.- Racker, E. (1951). *The mechanism of action of glyoxilase*. J. Biol. Chem. 190: 685-696.
- 421.- Radak, Z.; Asano, K.; Inoue, M.; Kizaki, T.; Oh-ishi, S.; Suzuki, K.; Taniguchi, N. y Ohno, H. (1995). *Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise*. J. Appl. Physiol. 79: 129-135.
- 422.- Radak, Z. y Goto, S. (1998). The effects of exercise, ageing and energy restriction on protein oxidation and DNA damage in skeletal muscle. Oxidative stress in skeletal muscle. Reznick, A. Z., Packer, L. y Sen, C. K. Basel, Birkhäuser: 89-103.
- 423.- Radak, Z.; Kaneko, T.; Tahara, S.; Nakamoto, H.; Ohno, H.; Sasvari, M.; Nyakas, C. y Goto, S. (1999). *The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes*. Free Radic. Biol. Med. 27(1-2): 69-74.
- 424.- Radak, Z.; Nakamura, A.; Nakamoto, H.; Asano, K.; Ohno, H. y Goto, S. (1998). *A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats*. Pflügers Arch. 273: 439-441.
- 425.- Radak, Z.; Pucsok, J.; Mecseki, S.; Csont, T. y Ferdinandy, P. (1999). *Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle*. Free Radic. Biol. Med. 26: 1059-1063.
- 426.- Radak, Z.; Pucsok, J.; Boros, S.; Josphai, L. y Taylor, A. W. (2000). *Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period*. Life Sci. 66(18): 1763-7.
- 427.- Radak, Z.; Sasvari, M.; Nyakas, C.; Pucsok, J.; Nakamoto, H. y Goto, S. (2000). *Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium*. Arch Biochem Biophys 376(2): 248-51.
-

-
- 428.- Radi, R.; Rubbo, H.; Bush, K. y Freeman, B. A. (1997). *Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes*. Arch. Biochem. Biophys. 339: 125-135.
- 429.- Ramboer, C. R. H. (1969). *A sensitive and non-radioactive assay for serum and tissue xanthine oxidase*. J. Lab. Clin. Med. 74(828-835).
- 430.- Räsänen, L. A.; Wiitanen, P. A. S.; Lilius, E.; Hyypä, S. y Pöso, A. R. (1996). *Accumulation of uric acid in plasma after repeated bouts of exercise in the horse*. Comp. Biochem. Physiol. 114B: 139-144.
- 431.- Rasmussen, J. T.; Rasmussen, M. S. y Petersen, T. E. (2000). *Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase*. J. Dairy Sci. 83: 499-506.
- 432.- Ravindranath, V.; Shivakumar, B. R. y Anandatheerthavarada, H. K. (1989). *Low glutathione levels in brain regions of aged rats*. Neurosci. Lett. 101: 187-190.
- 433.- Reid, M. B. (1996). *Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle*. News. Physiol Sci. 11: 114-119.
- 434.- Reid, M. B.; Shoji, T.; Moody, M. R. y Entman, M. L. (1992). *Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals*. J. Appl. Physiol. 75: 1805-1809.
- 435.- Reznick, A. Z.; Witt, E.; Matsumoto, M. y Packer, L. (1992). *Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189: 801-806.
- 436.- Rice-Evans, C. (1990). Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease Processes. Dass, D. K. Basel, Karger: 1-30.
- 437.- Richter, C.; Park, J. W. y Ames, B. N. (1988). *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive*. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 6465-6467.
- 438.- Rikans, L. E. y Moore, D. R. (1988). *Effect of aging on aqueous-phase antioxidants in tissues of male Fischer rats*. Biochim. Biophys. Acta 966: 269-275.

-
- 439.- Rinaldo, J. E. y Gorry, M. (1990). *Protection by deferoxamine from endothelial injury: a possible link with inhibition of intracellular xanthine oxidase*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3:525-533.
- 440.- Robinson-White, A.; Baylin, S. B.; Olivecrona, T. y Beaver, M. A. (1985). *Binding of diamine oxidase activity to rat and guinea pig microvascular endothelial cells. Comparisons with lipoprotein lipase binding*. J. Clin. Invest. 76: 93-100.
- 441.- Rodeman, H. P. y Goldberg, A. L. (1982). *Arachidonic acid, prostaglandin E2 and F2 alpha influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle*. J. Biol. Chem. 257: 1632-1638.
- 442.- Rogers, P. J.; Miller, T. D.; Bauer, B. A.; Brum, J. M.; Bove, A. A. y Vanhoutte, P. M. (1991). *Exercise training and responsiveness of isolated coronary arteries*. J. Appl. Physiol. 71: 2346-2351.
- 443.- Romero-Alvira, D.; Calvo Rebollar, M.; Villalba Martín, M. P.; Amiguet García, J. A. y Bueno Gómez, J. (1987). *Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química, Biología e implicaciones en patología médica I*. An. Med. Intern. 4: 672-679.
- 444.- Rossi, F. (1986). *The O₂--forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function*. Biochim. Biophys. Acta 853: 65-89.
- 445.- Rouquette, M.; Page, S.; Bryant, R.; Benboubetra, M.; Stevens, C. R.; Blake, D. R.; Whish, W. D.; Harrison, R. y Tosh, D. (1998). *Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture*. FEBS Lett. 426: 397-401.
- 446.- Rubbo, H.; Radi, R. y Prodanov, E. (1991). *Substrate inhibition of xanthine oxidase and its influence on superoxide radical production*. Biochim. Biophys. Acta 1074: 386-391.
- 447.- Rubner, M. (1908). Das problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zu Wachstum und Ernährung. Munich, R. Oldenburg.
- 448.- Sáez, G.; Romero, F. J. y Viña, J. (1985). *Effects of glutathione depletion on gluconeogenesis in isolated hepatocytes*. Arch. Biochem. Biophys. 241: 75-80.
-

-
- 449.- Sáez, G.; Tornalley, P. J.; Hill, H. A. O.; Hems, R. y Bannister, J. V. (1982). *The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effecto on isolated hepatocytes*. *Biochem. Biophys. Acta* 719: 24-31.
- 450.- Sahlin, K.; Cizinsky, S.; Warholm, M. y Hoberg, J. (1992). *Repetitive static muscle contractions in humans--a trigger of metabolic and oxidative stress?* *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 64: 228-236.
- 451.- Saito, T. y Nishino, T. (1989). *Differences in Redox and Kinetic Properties between NAD-dependent and O₂-dependent Types of Rat Liver Xanthine Dehydrogenase*. *J. Biol. Chem.* 264: 10015-10022.
- 452.- Saito, T.; Nishino, T. y Massey, V. (1989). *Differences in environment of FAD between NAD-dependent and O₂-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase showin by active site probe study*. *J. Biol. Chem.* 264: 15930-15935.
- 453.- Saksela, M.; Lapatto, R. y Raivio, K. O. (1998). *Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues*. *Biol. Neonate* 74: 274-280.
- 454.- Salonen, J. T.; Nyysönen, K.; Korpela, H.; Tuomilehto, J.; Seppänen, R. y R., S. (1992). *High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men*. *Circulation* 86: 803-811.
- 455.- Salonen, J. T.; Nyysönen, K. y R., S. (1994). *Body iron stores and the risk of coronary heart disease*. *N. Engl. J. Med.* 331: 1159.
- 456.- Samiec, P. S.; Drews-Botsch, C. y al., e. (1998). *Glutathione in human plasma, decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes*. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 699-704.
- 457.- Samouilov, A.; Kuppusamy, P. y Zweier, J. L. (1998). *Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems* *Arch. Biochem. Biophys.* 357: 1-7.
- 458.- Sancar, G. B. (1990). *DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair*. *Mutat. Res.* 236: 147-160.
- 459.- Sanders, S. A.; Eisenthal, R. y Harrison, R. (1997). *NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase*. *Eur. J. Biochem.* 245: 541-548.
-

-
- 460.- Sanz, N.; Diez-Fernandez, C. y al., e. (1997). *Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems*. J. Hepatol. 27: 525-534.
- 461.- Sarnesto, A.; Linder, N. y Raivio, K. O. (1996). *Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein*. Lab. Invest. 74(1): 48-56.
- 462.- Sasaki, T.; Senda, M. y al., e. (2001). *Age-related changes of glutathione content, glucose transport and metabolism, and mitochondrial electron transfer function in mouse brain*. Nucl. Med. Biol. 28: 25-31.
- 463.- Sastre, J.; Asensi, M.; Gascó, E.; Pallardó, F. V.; Ferrero, J. A.; Furukawa, T. y Viña, J. (1992). *Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration*. Am. J. Physiol. 263: R992-R995.
- 464.- Sastre, J.; Millan, A.; Garcia de la Asuncion, J.; Pla, R.; Juan, G.; Pallardo; O'Connor, E.; Martin, J. A.; Droy-Lefaix, M. T. y Vina, J. (1998). *A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress*. Free Radic Biol Med 24(2): 298-304.
- 465.- Sastre, J.; Pallardo, F. V.; Garcia de la Asuncion, J. y Viña, J. (2000). *Mitochondria, oxidative stress and aging*. Free Radic Res 32(3): 189-98.
- 466.- Sastre, J.; Pallardó, F. V. y Viña, J. (1996). *Glutathione, oxidative stress and aging*. Age 19: 129-139.
- 467.- Sato, H.; Tamba, M.; Ishii, T. y Bannai, S. (1999). *Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins*. J. Biol. Chem. 274: 11456-11458.
- 468.- Schardinger, F. (1902). Z. Untersuch. Genussmittel 5: 1113-1121.
- 469.- Scheuer, J. y Tipton, C. M. (1977). *Cardiovascular adaptations to training*. Annu. Rev. Physiol. 39: 221-231.
- 470.- Schieber, A. y Edmonson, D. E. (1993). *Studies on the induction and phosphorylation of xanthine dehydrogenase in cultured chick embryo hepatocytes*. Eur. J. Biochem. 215: 307-314.
- 471.- Schmid, P.; Simmler, M.; Walter, G. F. y Kleinert, R. (1983). *Mitochondrial reaction in skeletal muscle to induced activity*. Int. J. Sports Med. 4: 116-118.
-

-
- 472.- Schnell, N.; Krems, B. y Entian, K. D. (1992). *The PAR1 (YAP1/SNQ3) gen of Saccharomyces cerevisiae, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism.* Curr. Genet. 21: 269-273.
- 473.- Schopfer, L. M.; Massey, V. y Nishino, T. (1988). *Rapid reaction studies on the reduction and oxidation of chicken liver xanthine dehydrogenase by the xanthine/urate and NAD/NADH couples.* J. Biol. Chem. 263: 13528-13538.
- 474.- Schoutsen, B. y de Jong, J. W. (1987). *Age-dependent increase in xanthine oxidoreductase differs in various heart cell types.* Circ. Res. 61: 604-607.
- 475.- Schoutsen, B.; de Jong, J. W.; Harmsen, E.; de Tombe, P. P. y Achterberg, P. W. (1983). *Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase.* Biochim. Biophys. Acta 762: 519-524.
- 476.- Schwane, J. A.; Johnson, S. R.; Vandenakker, C. B. y Armstrong, R. B. (1983). *Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running.* Med. Sci. Sport Exerc. 15: 51-56.
- 477.- Schwartz, C. J.; Valente, A. J. y Sprague, E. A. (1993). *A modern view of atherosclerosis.* Am. J. Cardiol. 71: 9B-14B.
- 478.- Sen, C. K. (1998). *Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants.* Biochem. Pharmacol. 55: 1747-1758.
- 479.- Sen, C. K.; Atalay, M. y Hanninen, O. (1994). *Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency.* J Appl Physiol 77(5): 2177-87.
- 480.- Sen, C. K.; Marin, E.; Kretzschmar, M. y Hanninen, O. (1992). *Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization.* J. Appl. Physiol. 73: 1265-1272.
- 481.- Sen, C. K.; Rankinen, T.; Vaisanen, S. y Rauramaa, R. (1994). *Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation.* J Appl Physiol 76(6): 2570-7.
- 482.- Sevanian, A.; Davies, K. y Hochstein, P. (1985). *Conservation of vitamin C by uric acid in blood.* J. Free Radic. Biol. Med. 1: 117-124.

-
- 483.- Shibutani, S.; Takeshita, M. y Grollman, A. (1991). *Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG*. Nature (London) 349: 431-434.
- 484.- Shigenaga, M. K.; Gibeno, C. J. y Ames, B. N. (1989). *Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9697-9701.
- 485.- Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. y Ames, B. N. (1994). *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10771-10778.
- 486.- Shimada, K.; Gill, P. J.; Silbert, J. E.; Douglas, W. H. y Fanburg, B. L. (1981). *Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells*. J. Clin. Invest. 68: 995-1002.
- 487.- Shull, S.; Heintz, N. H.; Periasamy, M.; Manohar, M.; M., J. Y.; Marsh, J. P. y Mossman, B. T. (1991). *Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants*. J. Biol. Chem. 266: 24398-24403.
- 488.- Sies, H. (1986). *Biochemistry of oxidative stress*. Angew. Chem 25: 1058-1071.
- 489.- Sies, H.; Bartoli, G. M.; Burk, R. F. y Waydhas, C. (1978). *Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations, and in selenium deficiency*. Eur. J. Biochem. 89: 113-118.
- 490.- Simic, M. G. (1994). *DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis*. Cancer Res. 54: 1918s-1923s.
- 491.- Simic, M. G. y Jovanovic, S. V. (1989). *Antioxidation mechanisms of uric acid*. J. Am. Chem. Soc. 111: 5778-5782.
- 492.- Sjödin, B.; Hellsten-Westing, Y. y Apple, F. S. (1990). *Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise*. Sports Med. 10: 236-254.
- 493.- Skorjanc, D.; Jaschinski, F.; Heine, G. y Pette, D. (1998). *Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle*. Am. J. Physiol. 274: C810-C818.

-
- 494.- Slater, A. F.; Stefan, C.; Novel, I.; Van Den Dobbelseen, D. J. y Orrenius, S. (1995). *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis*. Toxicol. Lett. 82-83: 149-153.
- 495.- Slater, T. F. (1984). *Free radical mechanisms in tissue injury*. Biochem. J. 222: 1-15.
- 496.- Smith, C. D.; Carney, J. M.; Starke-Reed, P. E.; Oliver, C. N.; Stadtman, E. R.; Floyd, R. A. y Markesbery, E. R. (1991). *Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 10540-10543.
- 497.- Smith, R.; Palmer, R. M. y Reeds, P. J. (1982). *Protein synthesis in isolated rabbit forelimb muscles: The possible role of metabolites of arachidonic acid in the response to intermittent stretching*. Biochem. J. 214: 142-161.
- 498.- Sohal, R. S. (1976). Metabolic rate and life span. Cellular Aging: Concepts and Mechanisms. Witley, R. Basel, Karger.
- 499.- Sohal, R. S. y Bruk, U. T. (1989). Adv. Exp. Med. Biol. 266: 17-29.
- 500.- Sohal, R. S. y Weindruch, R. (1996). *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. Science 273(5271): 59-63.
- 501.- Stadtman, E. R. (1993). *Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions*. Annu. Rev. Biochem. 62: 797-821.
- 502.- Starke, D.; Chen, Y.; Bapna, C.; Lesnefsky, E. J. y al., e. (1997). *Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress*. Free Rad. Biol. Med. 23: 373-384.
- 503.- Starnes, J. W.; Cantu, G.; Farrar, R. P. y Kehrer, J. P. (1989). *Skeletal muscle lipid peroxidation in exercise and food-restricted rats during aging*. J. Appl. Physiol. 67: 69-75.
- 504.- Stein, G. y Weiss, J. (1948). *Chemical effects of ionizing radiation*. Nature 161: 650.
- 505.- Stirpe, F. y Della corte, E. (1969). *The regulation of rat liver xanthine oxidase: conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O)*. J. Biol. Chem. 244: 3855-3863.
-

-
- 506.- Stocker, R. y Frei, B. (1991). Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Sies, H. London, Academic Press: 213-243.
- 507.- Stone, T. W. y Simmonds, H. A. (1991). Purines: Basic and clinical aspects. Dordrecht, The Netherlands., Kluwer Academic Publishers.
- 508.- Strålin, P.; Karlsson, K.; Johansson, B. O. y Markland, S. L. (1995). *The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 20032-2036.
- 509.- Sullivan, J. L. (1981). *Iron and the sex difference in heart disease risk*. *Lancet* 1: 1293-1294.
- 510.- Sutton, J. R.; Toews, C. J.; Ward, G. R. y Fox, I. H. (1980). *Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man*. *Metabolism* 29: 254-260.
- 511.- Swain, J. y Gutteridge, J. M. C. (1995). *Prooxidant iron and copper, with ferroxidase and xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material*. *FEBS Lett.* 368: 513-515.
- 512.- Szasz, G.; Grüber, W. y Bernt, E. (1976). *Creatine kinase in serum. Determination of optimum reaction conditions*. *Clin. Chem.* 22: 650-656.
- 513.- Tan, S.; Gelman, S.; Wheat, J. K. y Parks, D. A. (1995). *Circulating xanthine oxidase in human ischemia reperfusion*. *South. Med. J.* 88: 479-482.
- 514.- Tan, S.; Yokoyama, Y.; Dickens, E.; Cash, T. G.; Freeman, B. A. y Parks, D. A. (1993). *Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock*. *Free Radical Biol. Med.* 15: 407-414.
- 515.- Terada, L. S.; Dormish, J. J.; Shanley, P. F.; Leff, J. A.; Anderson, B. O. y Repine, J. E. (1992). *Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion*. *Am. J. Physiol.* 263: L394-L401.
- 516.- Terada, L. S.; Piermattei, D.; Shibao, G. N.; McManaman, J. L. y Wright, R. M. (1997). *Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre and posttranslational levels*. *Arch. Biochem. Biophys.* 348: 163-168.
-

-
- 517.- Terada, L. S.; Rubinstein, J. D.; Lesnefsky, E. J.; Horwitz, L. D.; Leff, J. A. y Repine, J. E. (1991). *Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium*. Am. J. Physiol. 260: H805-H810.
- 518.- Terada, L. S.; Willingham, I. R.; Guidot, D. M.; Shibao, G. N.; Kindt, G. W. y Repine, J. E. (1992). *Tungsten treatment prevents tumour necrosis factor-induced injury of brain endothelial cells*. Inflammation 16: 13-19.
- 519.- Teramoto, S.; Jukuchi, Y. y al., e. (1997). *Age-related changes in the antioxidant screen of the distal lung in mice*. Lung 172: 223-230.
- 520.- Terradez, P.; Asensi, M.; Lasso de la Vega, M. C.; Puertes, I. R.; Viña, J. y Estrela, J. M. (1993). *Depletion of tumor glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth*. Biochem. J. 292: 477-483.
- 521.- Thomas, M. J. (1992). *Urate causes the human polymorphonuclear leukocyte to secrete superoxide*. Free Radical Biol. Med. 12: 89-91.
- 522.- Tiemeyer, W.; Hoferer, K. y Giesecke, D. (1986). *Uric acid uptake in erythrocytes of Beagle and Dalmatian dogs*. Comp. Biochem. Physiol. 85A: 417-421.
- 523.- Tirosh, O. y Reznick, A. Z. (2000). Chemical bases and biological relevance of protein oxidation. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Sen, C. K., Packer, L. y Hänninen, O. Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 89-114.
- 524.- Tonkonogi, M.; Harris, B. y Sahlin, K. (1998). *Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise*. J. Physiol. (Lond.) 510: 279-286.
- 525.- Tonkonogi, M. y Sahlin, K. (2002). *Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle*. Exerc. Sport Sci. Rev. 30: 129-137.
- 526.- Tonkonogi, M.; Walsh, B.; Tiivel, T.; Saks, V. y Sahlin, K. (1999). *Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise*. Pflügers Arch. 437: 562-568.
- 527.- Turrens, J. F. y Boveris, A. (1980). *Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria*. Biochem. J. 191: 421-424.
-

-
- 528.- Umansky, V.; Rocha, M.; Breitzkreutz, R.; Hehner, S. P.; Bucur, M.; Erbe, N.; Dröge, W. y Ushmorov, A. (2000). *Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis*. J. Cell. Biochem. 78: 578-587.
- 529.- Ushmorov, A.; Ratter, F.; Lehmann, V.; Dröge, W.; Schirmacher, V. y Umansky, V. (1999). *Nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome c release*. Blood 93: 2342-2352.
- 530.- van der Loo, B.; Labugger, R.; Skepper, J. N.; Bachschmid, M.; Kilo, J.; Powell, J. M.; Palacios-Callender, M.; Erusalimsky, J. D.; Quaschnig, T.; Malinski, T.; Gygi, D.; Ullrich, V. y Lüscher, T. F. (2000). *Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging*. J. Exp. Med. 192: 1731-1744.
- 531.- Van Der Meulen, J. H.; Kuipers, H. y Drukker, J. (1991). *Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats*. J. Appl. Physiol. 71: 999-1004.
- 532.- Vandervoort, A. A. y McComas, A. J. (1986). *Contractile changes in opposing muscles of the human ankle joint with aging*. J. Appl. Physiol. 61: 361-367.
- 533.- Viguie, C. A.; Shigenaga, M. K.; Ames, B. N.; Packer, L. y Brooks, G. A. (1993). *Antioxidant estatus and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise*. J. Appl. Physiol. 75: 566-572.
- 534.- Viña, J. (1990). Glutathione: Metabolism and physiological functions. Boca Raton, Florida., CRC Press.
- 535.- Viña, J.; Gimeno, A.; Sastre, J.; Desco, C.; Asensi, M.; Pallardo, F. V.; Cuesta, A.; Ferrero, J. A.; Terada, L. S. y Repine, J. E. (2000a). *Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol*. IUBMB Life 49(6): 539-44.
- 536.- Viña, J.; Gomez-Cabrera, M. C.; Lloret, A.; Marquez, R.; Minana, J. B.; Pallardo, F. V. y Sastre, J. (2000b). *Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants*. IUBMB Life 50(4-5): 271-7.
-

-
- 537.- Viña, J.; Romero, F. J.; Estrela, J. M. y Viña, J. R. (1980). *Effect of acetaminophen and its antagonists on glutathione content in rat liver*. *Biochem. Pharmacol.* 29: 1968-1970.
- 538.- Viña, J.; Romero, F. J.; Sáez, G. T. y Pallardó, F. V. (1983). *Effect of cysteine and N-acetyl cysteine on GSH content of brain of adult rats*. *Experientia* 39: 164-165.
- 539.- Viña, J.; Sastre, J.; Anton, V.; Bruseghini, L.; Esteras, A. y Asensi, M. (1992). *Effect of aging in glutathione metabolism. Protection by antioxidants. Free radicals an aging*. Emerit, I. y Chance, B. Basel. Switzerland, Birkhauser Verlag: 136-144.
- 540.- Viña, J.; Sastre, J.; Asensi, M. y Packer, L. (1995). *Assay of blood glutathione during physical exercise*. *Methods Enzymol.* 251: 237-243.
- 541.- Viña, J. y Viña, J. R. (1983a). Functions of glutathione: Biochemical, Toxicological and Clinical aspects. Larsson, A. New York, Raven Press.: 23-30.
- 542.- Viña, J.; Viña, J. R. y Sáez, G. (1986). *Glutathione: metabolism and physiological functions*. *Life Chem. Rep.* 4: 1-35.
- 543.- Waern, M. J. y Fossum, C. (1993). *Effects of acute physical stress on immune competence in pigs*. *Am. J. Veterinary Res.* 54: 596-601.
- 544.- Wajner, M. y Harkness, R. A. (1989). *Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues*. *Biochim. Biophys. Acta* 991: 79-84.
- 545.- Walsh, B.; Tonkonogi, M.; Malm, C.; Ekblom, B. y Sahlin, K. (2001). *Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans*. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33: 436-441.
- 546.- Walters, G. O.; Miller, F. M. y Worwood, M. (1973). *Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects*. *J. Clin. Pathol.* 26: 770-772.
- 547.- Wang, J.; Wolin, M. S. y Hintze, T. H. (1993). *Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs*. *Circ. Res.* 73: 829-838.
-

-
- 548.- Wang, P. y Zweier, J. L. (1996). *Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury*. J. Biol. Chem. 271: 29223-29230.
- 549.- Watts, R. W. E.; Watts, J. E. M. y Seegmiller, J. E. (1965). *Xanthine oxidase activity in human tissues and its inhibition by allopurinol (4-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine)*. J. Lab. Clin. Med. 66: 688-697.
- 550.- Waud, W. R. y Rajagopalan, K. V. (1976). *Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase as acceptor of electrons*. Arch. Biochem. Biophys. 172: 354-364.
- 551.- Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Barclay, L. R. C. y Locke, S. J. (1987). *The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma*. Biochim. Biophys. Acta 924: 208-419.
- 552.- Weinbroum, A.; Nielsen, V. G.; Tan, S.; Gelman, S.; Matalon, S.; Skinner, K. A.; Bradley, E. J. y Parks, D. A. (1995). *Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase*. Am. J. Physiol. 268: G988-G996.
- 553.- Weindruch, R. (1995). *Interventions based on the possibility that oxidative stress contributes to sarcopenia*. J. Gerontol. 50 Spec No: 157-61.
- 554.- Weiss, K. J. y Lobuglio, A. F. (1982). *Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury*. Lab. Invest. 47: 5-12.
- 555.- Werns, S. W.; Grum, C. M.; Ventura, A.; Hahn, R. A.; Ho, P. P. K.; Towner, R. D.; Fantone, J. C.; Schork, M. A. y Lucchesi, B. R. (1991). *Xanthine oxidase inhibition does not limit canine infarct size*. Circulation 83: 995-1005.
- 556.- Westerfield, W. W.; Richert, D. A. y Higgins, E. S. (1959). J. Biol. Chem. 234: 1897-1900.
- 557.- White, C. R.; Darley-Usmar, V.; Berrington, W. R.; McAdams, M.; Gore, J. Z.; Thompson, J. A.; Parks, D. A.; Tarpey, M. M. y Freeman, B. A. (1996). *Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8745-8749.
-

-
- 558.- White, R. P. (1990). *Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agents*. Neurosurg. Clin. N. Am. 1(2): 401-415.
- 559.- Wiezorek, J. S.; Brown, D. H.; Kupperman, D. E. y Brass, C. A. (1994). *Rapid conversion to hih xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia*. J. Clin. Invest. 94: 2224-2230.
- 560.- Willis, W. T. y Jackman, M. R. (1994). *Mitochondrial function during heavy exercise*. Med. Sci. Sports Exerc. 26: 1347-1353.
- 561.- Wink, D. A. y Mitchel, J. B. (1998). *The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic an cytoprotective mechanisms of nitic oxide*. Free Radical Biol. Med. 25: 434-456.
- 562.- Witmer, C. M. S.; Jollow, D. J.; Kalf, O. F.; Koccis, J. J. y Sipes, I. G. (1991). Biological Reactive IntermediatesIV. New York, Plenum Press.
- 563.- Wolff, S. y Dean, R. (1987). *Glucose autooxidation and protein modification. The potencial role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes*. Biochem. J. 245: 243-250.
- 564.- Wolff, S. P. (1993). *Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications*. Br. Med. Bull. 49(3): 642-652.
- 565.- Wong, S. H.; Knight, J. A.; Hopfer, S. M.; Zaharia, O.; Leach, C. N. J. y Sunderman, W. J. (1987). *Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct*. Clin. Chem. 33(2): 214-220.
- 566.- Xia, M.; Dempski, R. y Hille, R. (1999). *The reductive Half-reaction of Xanthine Oxidase*. J. Biol. Chem. 274: 3323-3330.
- 567.- Xu, P.; Huecksteadt, T. P.; Harrison, R. y Hoidal, J. R. (1994). *Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 998-1004.
- 568.- Yang, C. S.; Chou, S. T. y al., e. (1995). *Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. J. Cromatogr. 674: 23-30.
-

-
- 569.- Yashpe-Purer, H. N. y Yashpe, J. (1977). *Regulation of catalase level in Escherichia Coli K12*. J. Microbiol. 23: 84-91.
- 570.- Yip, R. (1994). Changes in iron metabolism with age. Iron metabolism in health and disease. Brock, H. H., Halliday, J. W., Pippard, m. J. y Powell, L. W. London, WB Saunders Co. Ltd.: 428-448.
- 571.- Yokoyama, Y.; Beckman, J. S.; Beckman, T. K.; Wheat, J. K.; Cash, T. G.; Freeman, B. A. y Parks, D. A. (1990). *Circulating xanthine oxidase potential mediator of ischemic injury*. Am. J. Physiol. 258: G564-G570.
- 572.- Yoskitake, S.; Nanri, H.; Fernando, M. y Minakami, J. (1994). J. Biol. Chem. 116: 42-46.
- 573.- Yu, B. (1994). *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. Physiol. Rev. 74: 139-162.
- 574.- Zehavi-Willner, T.; Wax, R. y Kosower, E. M. (1970). *The inhibition of ribonucleic acid synthesis by the thiol-oxidizing agent, diamide, in Escherichia coli*. FEBS Lett. 9: 100-102.
- 575.- Zhang, Z.; Naughton, D.; Winyard, P. G.; Benjamin, N.; Blake, D. R. y Symons, M. C. (1998). *Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249: 767-772.
- 576.- Zimmerman, B. J.; Parks, D. A.; Grisham, M. B. y Granger, D. N. (1988). *Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid*. Am. J. Physiol. 255: H202-H206.