

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Marcadores de Estrés Oxidativo y Envejecimiento. El ejercicio físico controlado sobre los niveles de parámetros oxidativos en mujeres mayores. Estudio especial del estado redox y la modificación oxidativa del ADN.

Doctoranda: Amaya Hernando Espinilla

Directores: Nuria Estañ Capell

Guillermo Sáez Tormo

Juan Carlos Colado Sánchez

Programa de Doctorado de Biomedicina y Biotecnología

Código de programa: 3102

Regulación: Real Decreto 99/2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Programa de Doctorado: BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA
(Codigo Programa 3102)

Dña. Nuria Estañ Capell, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y Jefa del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, D. **Guillermo Sáez Tormo**, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y D. **Juan Carlos Colado Sánchez**, Doctor en Educación Física y Profesor Titular del Departamento de Actividad Física y Deportiva de la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y el Deporte de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada "**Marcadores de Estrés Oxidativo y Envejecimiento. El ejercicio físico controlado sobre los niveles de parámetros oxidativos en mujeres mayores. Estudio especial del estado redox y la modificación oxidativa del ADN**" presentada por **Dña. Amaya Hernando Espinilla**, licenciada en Farmacia, ha sido realizada, para optar al Grado de Doctora, bajo nuestra dirección en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset, la Unidad de Patología Oxidativa del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología y el Departamento de Actividad Física y Deporte de la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y el Deporte de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado, en Valencia, a 7 de octubre de 2019.

Fdo. Dra. Nuria Estañ Capell

**GUILLERMO
MARIA|SAEZ
TORMO**

Firmado digitalmente
por GUILLERMO
MARIA|SAEZ|TORMO
Fecha: 2019.10.07
17:28:51 +02'00'

Fdo. Dr. Guillermo Sáez Tormo,

**JUAN
CARLOS|
COLADO|
SANCHEZ**

Firmado
digitalmente por
JUAN CARLOS|
COLADO|SANCHEZ
Fecha: 2019.10.07
17:54:34 +02'00'

Fdo. Dr. Juan Carlos Colado Sánchez

Agradecimientos.

Han sido muchas las personas que de una u otra forma han contribuido en este trabajo y por tanto no sería justo presentarlo sin reconocer previamente su labor, pues a ellos debo todo lo positivo que en esta tesis se pueda encontrar.

Ante todo, al Doctor Guillermo Sáez, promotor y director de esta tesis, a quien se lo debo todo, absolutamente todo. Sin él esta tesis no habría sido posible. Gracias por tu incomparable ayuda.

Igualmente, a Mar Ronda, Lidia Monzó y a todo el equipo de Patología Oxidativa del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina por su trabajo, dedicación y buena disposición.

A Pedro Gargallo, Álvaro Jueas y al Dr. Juan Carlos Colado, director del Grupo de Investigación en Prevención y Salud en el Ejercicio Físico y el Deporte de la Universidad de Valencia, por todo su trabajo, parte imprescindible en esta tesis. Su colaboración, conocimientos y ayuda han sido claves en la realización de la misma.

A la Doctora Nuria Estañ, Jefa del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Doctor Peset donde trabajo, por animarme a realizar esta tesis y no dejarme abandonar.

A todos mis compañeros y al personal de enfermería del Servicio de Análisis Clínicos y especialmente a Adela, Nati y Paqui, por su ayuda incondicional en la extracción de muestras.

A Delia, por su compañía y apoyo a lo largo de estos años y todos sus consejos en esta etapa final.

A todos los voluntarios que han participado en este estudio, sin ellos realmente hubiese sido imposible llevar a cabo este trabajo. Gracias a su colaboración podemos avanzar en el conocimiento.

A todos los que me han formado y educado desde mi infancia y especialmente a mis Padres.

A mis hijos por todo el tiempo cedido, por su ánimo y amor incondicional.

Especialmente a Agustín, quien más lo merece, por estar siempre a mi lado.

Por todos ellos, doy infinitas gracias a Dios, a quien debo esta tesis y todo lo que soy.

*A Agustín, Agus, Pablo y María,
por el Amor que a través de ellos se me ha regalado.*

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	- 7 -
1. FIGURAS INTRODUCCIÓN	- 7 -
2. FIGURAS MATERIAL Y METODOS.....	- 8 -
3. FIGURAS RESULTADOS	- 8 -
ÍNDICE DE TABLAS	- 10 -
1. TABLAS INTRODUCCION	- 10 -
2. TABLAS MATERIAL Y METODOS.....	- 10 -
3. TABLAS RESULTADOS	- 10 -
I. INTRODUCCIÓN.....	- 15 -
1. EL ENVEJECIMIENTO DE LA POBLACIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS GENERALES	- 15 -
2. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.....	- 17 -
3. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.....	- 17 -
3.1. LA TEORÍA MITOCONDRIAL	- 21 -
4. RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y SUS IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS.	- 25 -
4.1. DEFINICIÓN DE RADICAL LIBRE.....	- 25 -
4.2. FORMACIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DE OXÍGENO	- 26 -
4.2.1. Fuentes endógenas	- 27 -
4.2.2. Fuentes exógenas.....	- 30 -
4.3. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS ESPECIES REACTIVAS.....	- 31 -
4.3.1. Expresión génica y hormesis	- 32 -
5. LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES	- 38 -
5.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	- 38 -
5.1.1. Superóxido Dismutasa.....	- 42 -
5.1.1.1. Superóxido Dismutasa Cobre/Zinc	- 42 -
5.1.1.2. La Manganese Superóxido dismutasa	- 43 -

5.1.1.3. Superóxido dismutasa extracelular	- 44 -
5.1.2. Catalasa	- 45 -
5.1.3. Glutation peroxidasa	- 46 -
5.1.4. El eje Tiol-Selenio peroxidasa.....	- 49 -
5.1.4.1. Peroxidoxinas	- 49 -
5.1.4.2. Tiorredoxinas	- 50 -
5.2. <i>ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS</i>	- 52 -
5.2.1. Vitamina C.....	- 52 -
5.2.2. Vitamina E	- 52 -
5.2.3. Carotenoides.....	- 53 -
5.2.4. Ubiquinonas	- 54 -
5.2.5. Flavonoides.....	- 55 -
5.2.6. Estilbenos.....	- 57 -
5.2.7. Estrógenos.....	- 58 -
5.2.8. Glutati3n, GSH.....	- 59 -
6. <i>ESTRÉS OXIDATIVO. INTERACCIONES MOLECULARES Y PRODUCTOS DE OXIDACI3N MOLECULAR</i>	- 62 -
6.1. <i>DAÑO OXIDATIVO A LOS LÍPIDOS</i>	- 63 -
6.2. <i>DAÑO OXIDATIVO A LAS PROTEINAS</i>	- 66 -
6.3. <i>LA OXIDACI3N DE ÁCIDOS NUCLEICOS</i>	- 68 -
7. <i>EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ENFERMEDADES LIGADAS AL ENVEJECIMIENTO.</i>	- 71 -
7.1. <i>ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES</i>	- 73 -
7.2. <i>ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS</i>	- 77 -
7.3. <i>TRASTORNOS NEUROMUSCULARES</i>	- 81 -
7.4. <i>ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER</i>	- 83 -
8. <i>PRODUCTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO COMO MARCADORES BIOL3GICOS DEL ENVEJECIMIENTO</i>	- 88 -
8.1. <i>OXIDACI3N Y MODIFICACI3N DE PROTEÍNAS</i>	- 89 -
8.2. <i>PEROXIDACION DE LÍPIDOS</i>	- 94 -

8.3.	<i>OXIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</i>	- 98 -
8.4.	<i>ANTIOXIDANTES EN EL ENVEJECIMIENTO</i>	- 103 -
9.	<i>ACTIVIDAD FÍSICA Y ESTRÉS OXIDATIVO</i>	- 107 -
II.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	- 117 -
III.	OBJETIVOS EXPERIMENTALES PLANTEADOS	- 121 -
1.	OBJETIVOS GENERALES	- 121 -
2.	OBJETIVOS SECUNDARIOS	- 121 -
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	- 125 -
1.	VALORACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO SISTÉMICO EN SUJETOS DE DISTINTAS EDADES.....	- 127 -
2.	ESTUDIO DEL EJERCICIO FÍSICO CONTROLADO SOBRE LOS PARÁMETROS DE ACTIVIDAD FÍSICA Y DE ESTRÉS OXIDATIVO	- 128 -
3.	PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO CLÍNICO Y PARÁMETROS BIOQUÍMICO MOLECULARES	- 130 -
3.1.	<i>MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS</i>	- 130 -
3.2.	<i>MEDICIONES DE LA FUNCIÓN FÍSICA</i>	- 131 -
3.2.1.	“30-Second Arm Curl Test” (Arm Curl)	- 132 -
3.2.2.	“30-Second Chair Stand Test”	- 133 -
3.2.3.	Eight-Foot Up and Go Test (TUG)	- 134 -
3.2.4.	Six Minute Walking Test (6MWT).....	- 135 -
3.2.5.	Programa para entrenamiento de la fuerza con bandas elásticas	- 135 -
3.3.	<i>ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICO Y HEMATOLÓGICOS</i>	- 139 -
3.3.1.	Análisis de parámetros bioquímicos.	- 139 -
3.3.2.	Análisis de los parámetros hematimétricos	- 140 -
3.4.	<i>ANÁLISIS DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS MONONUCLEARES CIRCULANTES (CMNc), EN SUERO Y ORINA</i>	- 141 -
3.4.1.	Aislamiento de CMNc de sangre completa.	- 141 -

3.4.2.	Extracción de muestra de suero	- 141 -
3.4.3.	Recolección de orina	- 142 -
3.4.4.	Ensayo de actividades antioxidantes y del estado redox en CMNc y de la Actividad Antioxidante Total en Plasma en suero.....	- 142 -
3.4.5.	Análisis de los productos de estrés oxidativo.	- 143 -
3.4.5.1.	Cuantificación de proteínas carboniladas	- 143 -
3.4.5.2.	El ensayo MDA en CMNs por HPLC-UV	- 143 -
3.4.5.3.	Aislamiento, separación y cuantificación de 8-oxo-dG del ADN genómico a partir de CMNc.	- 144 -
3.4.5.4.	Separación y cuantificación 8-oxo-dG en suero por HPLC-EC...	- 145 -
3.4.5.5.	Cuantificación de 8-oxo-dG en orina por HPLC-EC.....	- 147 -
3.4.5.6.	Análisis de F2-8-isoprostanos.....	- 148 -
3.5.	<i>RESUMEN DE LOS METABOLITOS ANALIZADOS, MUESTRA BIOLÓGICA ESTUDIADA Y MÉTODO ANALÍTICO UTILIZADO</i>	<i>- 148 -</i>
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	- 150 -
4.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARÁMETROS DE EO EN DISTINTAS EDADES ...	- 150 -
4.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EJERCICIO FÍSICO	- 151 -
V.	RESULTADOS	- 155 -
1.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-ANTROPOMÉTRICAS DE LA POBLACIÓN	- 155 -
2.	VALORACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN DISTINTAS EDADES.	- 156 -
2.1.	<i>EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA SANGUÍNEO.....</i>	<i>- 156 -</i>
2.2.	<i>NIVELES DE GLUTATIÓN Y ESTADO REDOX EN CÉLULAS CMNc.</i>	<i>- 161 -</i>
2.3.	<i>CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS. MDA Y F2-ISOPROSTANOS</i>	<i>- 164 -</i>
2.4.	<i>NIVELES DE PROTEÍNAS CARBONILADAS.</i>	<i>- 166 -</i>

2.5.	<i>VALORACIÓN DE LA OXIDACIÓN DEL ADN EN CMNC, SUERO Y ORINA EN DISTINTAS EDADES.</i>	- 168 -
2.6.	<i>ESTUDIO DE CORRELACIONES ESTADÍSTICAS.</i>	- 171 -
3.	ESTUDIO DEL EJERCICIO SOBRE ACTIVIDAD FÍSICA Y PARAMETROS DE EO. ..	- 176 -
3.1.	<i>FLUJO DE PARTICIPANTES Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO ANTROPOMÉTRICAS DE LA POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN CON EJERCICIO FÍSICO.</i> -	177 -
3.2.	<i>DAÑO DE ADN Y ESTADO REDOX.</i>	- 183 -
VI.	DISCUSIÓN	- 189 -
1.	DISCUSION DE LOS RESULTADOS SOBRE EL PAPEL DE LOS MARCADORES DEL EO Y SU EVOLUCION A LO LARGO DEL ENVEJECIMIENTO.	- 189 -
1.1.	<i>EL ENVEJECIMIENTO Y EL EO</i>	- 190 -
1.2.	<i>ENZIMAS ANTIOXIDANTES</i>	- 192 -
1.3.	<i>VALORACIÓN ESTADO REDOX A TRAVÉS DE LA RELACIÓN GSSG/GSH</i> .	- 195 -
1.4.	<i>PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA</i>	- 196 -
1.5.	<i>PRODUCTOS DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.</i>	- 200 -
1.6.	<i>LESIÓN OXIDATIVA DEL MATERIAL GENÉTICO (ADN INTRACELULAR Y SISTÉMICO)</i>	- 200 -
1.7.	<i>ESTUDIOS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.</i>	- 203 -
2.	DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL EJERCICIO FISICO	- 204 -
VII.	CONCLUSIONES	- 215 -
IX.	BIBLIOGRAFÍA	- 221 -
VIII.	ANEXOS	- 263 -
1.	ANEXO I. ABREVIATURAS	- 263 -
2.	ANEXO II. CORRELACIONES ESTADÍSTICAS	- 269 -
2.1.	<i>CORRELACIONES 18 - 90 AÑOS</i>	- 269 -

2.2.	<i>CORRELACIONES 18 - 40 AÑOS</i>	- 272 -
2.3.	<i>CORRELACIONES 41 - 60 AÑOS.</i>	- 275 -
2.4.	<i>CORRELACIONES 61 – 90 AÑOS</i>	- 278 -
3.	ANEXO III. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA PROCEDENTE DE ESTE ESTUDIO.....	- 281 -

ÍNDICE DE FIGURAS

1. FIGURAS INTRODUCCIÓN

Figura I- 1. Porcentaje de envejecimiento en España según el INE	- 15 -
Figura I- 2. Formación de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte de electrones y lesión del ADN mitocondrial.....	- 22 -
Figura I- 3. Reducción monovalente del oxígeno molecular.....	- 26 -
Figura I- 4. Dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$	- 28 -
Figura I- 5. Reacción de Fenton.....	- 28 -
Figura I- 6. Oxido-reducción cíclica	- 29 -
Figura I- 7. Reacción de Haber-Weiss.....	- 29 -
Figura I- 8. Esquema de la secuencia reaccional del sistema de glutatión peroxidasa-reductasa.	- 46 -
Figura I- 9. La estrategia antioxidante.....	- 48 -
Figura I- 10. Esquema de la secuencia reaccional del sistema de las tiorredoxinas ...	- 51 -
Figura I- 11. Estructura base de un flavonoide	- 56 -
Figura I- 12. Estructura del Pterostilbeno	- 57 -
Figura I- 13. Estructura básica del 17β -estradiol	- 58 -
Figura I- 14. Función antioxidante de GSH.....	- 61 -
Figura I- 15. Fases de peroxidación lipídica, intermediarios y productos activados. ...	- 65 -
Figura I- 16. Interacciones moleculares de los radicales libres y sus efectos.	- 70 -
Figura I- 17. Implicaciones fisiopatológicas del estrés oxidativo	- 72 -
Figura I- 18. Oxidación, reparación y eliminación de 8-oxo-dG	- 87 -

2. FIGURAS MATERIAL Y METODOS

Figura M- 1. Arm Curl Test.(220)	- 132 -
Figura M- 2. Chair Stand Test (220)	- 133 -
Figura M- 3. Eight Foot Up and Go Test (220)	- 134 -
Figura M- 4. Diseño experimental del Programa de Entrenamiento de la Fuerza....	- 138 -

3. FIGURAS RESULTADOS

Figura R- 1. Cambio en la actividad de SOD en adultos de distintas edades.	- 157 -
Figura R- 2. Cambio en la actividad de GPx en adultos de distintas edades	- 158 -
Figura R- 3. Cambio en la actividad de catalasa en adultos de distintas edades	- 159 -
Figura R- 4. Cambio en PAO en adultos de distintas edades	- 160 -
Figura R- 5. Porcentaje de cambio en las actividades enzimáticas en función de la edad de la población estudiada.	- 160 -
Figura R- 6. Cambios en los niveles de GSH, GSSG y relación GSSG/GSH% en células mononucleares circulantes de personas mayores.....	- 163 -
Figura R- 7. Porcentaje de cambio de los niveles de GSH, GSSG y estado redox GSSG/GSH% en la células mononucleares circulantes	- 164 -
Figura R- 8. Cambios en los niveles de MDA en células mononucleares circulantes de personas adultas con distintas edades.	- 165 -
Figura R- 9. Cambios en los niveles de isoprostanos en orina de personas adultas con distintas edades.	- 166 -
Figura R- 10. Cambios en los niveles de proteínas carboniladas en células mononucleares circulantes y en la orina de adultos de distintas edades.	- 167 -
Figura R- 11. Porcentaje de cambio en los niveles de MDA, F2-IP y Proteínas Carboniladas en función de la edad.....	- 167 -

Figura R- 12. . Niveles de la base modificada 8-oxo-dG en células mononucleares de personas adultas	- 169 -
Figura R- 13. . Niveles de la base 8-oxo-dG en suero de personas adultas.....	- 169 -
Figura R- 14. Niveles de la base 8-oxo-dG en orina de personas adultas	- 170 -
Figura R- 15. . Porcentaje de cambio en los niveles de 8-oxo-dG en células mononucleares circulantes, orina y suero en los grupos de diferente edad.	- 171 -
Figura R- 16. Correlación de los niveles de F2-IsoP/creat y los niveles de 8-oxo-dG/creat (A), concentración intracelular de GSH (B) y relación GSSG/GSH% (C); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	- 172 -
Figura R- 17. Correlación de los niveles de 8-oxo-dG/creat. con las concentraciones intracelulares de GSH (A), GSSG/GSH% (B) y GPx (C); ** $p < 0,01$	- 173 -
Figura R- 18. Correlación entre los productos de modificación oxidativa F2-IP (A) y 8-oxo-dG (B) con la edad de la población estudiada (18 a 90); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$...	- 174 -
Figura R- 19. Correlación entre los metabolitos del sistema Glutación con la edad de la población estudiada (18 a 90).....	- 175 -
Figura R- 20. Diagrama de flujo de participación	- 178 -
Figura R- 21. Cambios en la actividad redox por grupos.....	- 185 -

ÍNDICE DE TABLAS

1. TABLAS INTRODUCCION

Tabla I- 1. Teorías más importantes sobre el envejecimiento	- 18 -
Tabla I- 2. Fuentes y procesos productores de especies reactivas.	- 31 -
Tabla I- 3. Enzimas antioxidantes. Características reaccionales y distribución.....	- 40 -
Tabla I- 4. Estructuras oxidadas de aminoácidos	- 67 -

2. TABLAS MATERIAL Y METODOS

Tabla M- 1. Metabolitos, muestra biológica y método de análisis para el estudio del estrés oxidativo.....	- 149 -
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------

3. TABLAS RESULTADOS

Tabla R- 1. Características clínico-antropométricas de la población estudiada.	- 155 -
Tabla R- 2. Actividades antioxidantes de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD), Glutati6n Peroxidasa (GPx)	- 156 -
Tabla R- 3. . Niveles intracelulares de GSH, GSSG y relaci6n GSSG/GSH% en grupos de distintas edades.	- 162 -
Tabla R- 4. Niveles intracelulares y en orina de los productos de peroxidaci6n lipídica MDA y F2-IP en grupos de personas adultas de distintas edades.	- 165 -
Tabla R- 5. Niveles intracelulares de proteínas carboniladas en grupos de personas adultas de distintas edades.	- 166 -
Tabla R- 6. Niveles intracelulares, orina y suero de 8-oxo-dG en los tres grupos de edades.....	- 168 -

Tabla R- 7. Resumen de las significancias de la correlación de F2-IsoP y 8-oxo-dG en orina con el resto de parámetros..... - 171 -

Tabla R- 8. Correlaciones de los distintos metabolitos con la edad..... - 174 -

Tabla R- 9. Características bioquímicas de la población estudiada..... - 180 -

Tabla R- 10. Características antropométricas de la población estudiada - 181 -

Tabla R- 11. Efecto de intervención de la actividad física. - 182 -

Tabla R- 12. Efecto del entrenamiento sobre el estado redox sistémico valorado en función de la relación porcentual GSSG/GSH - 184 -

Tabla R- 13. . Efecto del entrenamiento sobre los niveles de 8-oxo-dG en orina..... - 185 -

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ENVEJECIMIENTO DE LA POBLACIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS GENERALES

La población mundial está envejeciendo progresivamente y este patrón tiende a continuar durante las próximas décadas. Esta tendencia se observa en casi todos los países desarrollados como consecuencia del aumento de la esperanza de vida y la disminución de la tasa de fecundidad (1).

Las cifras hablan, y predichas por el Instituto Nacional de Estadística (INE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), el envejecimiento de la población mundial es inminente:

Se representa el porcentaje de envejecimiento como el cociente de la población mayor de 65 años y la menor de 15 años.

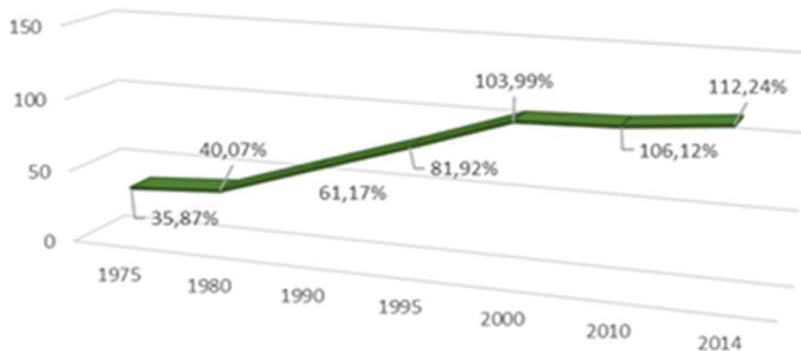


Figura I- 1. Porcentaje de envejecimiento en España según el INE

La Figura I-1 muestra el éxito de las políticas de salud pública y socioeconómica. Las personas mayores deben ser apreciados como un recurso social esencial de sabiduría adquirida a lo largo de la vida; sin embargo, implican un enorme desafío social y de salud para proporcionar las medidas específicas de atención médica (2).

El proceso de envejecimiento se considera un proceso fisiológico que comienza en la concepción y produce cambios característicos durante toda la vida que producen limitaciones en la adaptabilidad del organismo en relación con los medios (1). Los datos de la OMS son preocupantes ya que hoy en día la causa más común de muerte en todo el mundo son las enfermedades relacionadas con la edad: disfunciones cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades pulmonares crónicas; mientras tanto, las causas más comunes de discapacidad son el déficit visual, la demencia, la pérdida de la audición y la artrosis (3,4).

Desde 1987, cuando Rowe y Kahn definieron su "Teoría del Envejecimiento Exitoso" como un mecanismo de prevenir la enfermedad y la discapacidad (5), muchos autores han sugerido la importancia de investigar sobre el proceso de envejecimiento. A pesar del volumen de información al respecto con el que contamos, el hecho de poder modificar las alteraciones fisiológicas asociadas al proceso de envejecimiento mediante intervenciones fisiológicas o sociales es, a día de hoy, un tema por resolver y una cuestión de estudio (6).

El envejecimiento no es un fenómeno uniforme, está influenciado por el género, la raza, las condiciones sociales y económicas, la región demográfica, el origen y la ubicación de la residencia y muchas otras condiciones (7). Es determinante el estudio del proceso de envejecimiento, especialmente en aquellos mayores de 80 años, que son un claro ejemplo de envejecimiento exitoso ya que

han escapado de las principales enfermedades relacionadas con la edad y han alcanzado el límite extremo de la vida humana (8). De esta forma, en la actualidad y por su interés, el proceso de envejecimiento se ha convertido en una disciplina de estudio de gran interés para la comunidad científica (7).

2. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

En reglas generales, el conjunto de daños sucesivos no reparados en el organismo adulto a lo largo de la vida constituye el fenómeno del envejecimiento, lo cual provoca progresivamente una mayor susceptibilidad a las noxas y una merma en la capacidad de supervivencia del organismo, de manera que es comúnmente aceptado que las características que definen este proceso son “intrínsecas, universales, progresivas, irreversibles y se encuentran genéticamente programadas”(9,10).

La reiteración progresiva sufrida por las moléculas del organismo y su disfunción biológica continúan siendo un punto importante de debate, si bien la teoría más aceptada es la del estrés oxidativo (EO) (7,9,11).

3. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Prácticamente todas las teorías que tratan de explicar el proceso de envejecimiento intentan responder dos cuestiones fundamentales: 1) Averiguar las causas del proceso desde el punto de vista de la biología molecular y evolutiva, y 2) Averiguar qué mecanismos determinan la esperanza de vida.

Año	Autor	Teoría	Conclusión	Ref.
1825	B. Gompertz	<i>Mortalidad dependiente de la edad</i>	"Aging mortality is age-dependent exponential."	13
1835	C. McCay	<i>Modulación ambiental</i>	El envejecimiento está modulado por factores ambientales.	17
1952	P. Medewar	<i>Acumulación de mutaciones</i>	Las mutaciones se acumulan durante toda la vida en los organismos donde se expresan, pero no tienen efectos perjudiciales hasta los últimos años de la vida.	13
1956	D. Harman	<i>El radical libre</i>	El envejecimiento resulta del daño nocivo aleatorio al tejido por los radicales libres de oxígeno.	9
1957	G.C. Williams	<i>Pleiotropía antagónica</i>	Envejecimiento producido por adaptación incorrecta del mitogenoma	18
1962	R. Gershman	<i>Toxicidad residual del oxígeno</i>	La toxicidad del oxígeno está relacionada con la mayor concentración del mismo intracelularmente	19
1991	J. Miquel	<i>Teoría mitocondrial</i>	"Mitochondria as the critical component, being leaked the electrons from the ETC"	20
1998	E.J. Masoro	<i>Teoría de la mitohormesis</i>	Basado en el efecto de hormesis beneficioso resultado de la respuesta del organismo a los factores estresantes de baja intensidad	21
2006	H. Y. Chung et al.	<i>Teoría inflamatoria molecular</i>	La activación sensible a la redox de las vías transcripcionales por la SO relacionada con la edad produce un aumento de la expresión génica proinflamatoria	22

Tabla I- 1. Teorías más importantes sobre el envejecimiento

Pese a que el EO, el estrés del metabolito y el hidrolítico se reconocen como implicados en los fenómenos de mortalidad (7,12) la naturaleza molecular de los mismos permanece incierta habiéndose propuesto ya más de 300 teorías intentando resolver las incógnitas del envejecimiento y en la actualidad continúan apareciendo constantemente otras nuevas.

A este respecto, para B. Gompertz (1825) (13) la mortalidad específica por edad en humanos aumentaba de manera exponencial con el paso de los años.

Desde que comenzó el interés por el proceso de envejecimiento, se han formulado más de 300 teorías para explicar este proceso, y el número parece seguir aumentando (9).

En 1952, P. Medawar propuso el mecanismo de acumulación de mutaciones como fenómeno que explicaría el envejecimiento. La selección natural no sería capaz de eliminar todas las mutaciones que de manera fisiológica se producen en el organismo y su acumulación conduciría a la aparición tardía de efectos nocivos (13). Según esta teoría, las mutaciones que causan problemas posteriores en el tiempo no serían eficazmente eliminadas por los sistemas de reparación por lo que en el momento en que aparecen las manifestaciones clínicas de la enfermedad dichas mutaciones ya habrían pasado a las siguientes generaciones(12).

En 1957, George C. Williams et al. presentaron la "teoría de la pleiotropía antagónica"(13) según la cual los procesos de pleiotropismo de los genes serían los causantes del daño. De esta manera, un alelo con un efecto negativo en el rendimiento de la vida tardía puede seleccionarse si tiene un efecto positivo reproductivo o de desarrollo en los primeros años de la vida (12,14).

Por otra parte, tanto Denham Harman (1956) como Rebecca Hershman (1962) explican simultáneamente aunque de forma independiente el envejecimiento mediante el mecanismo de toxicidad de las ROS (especies libres de oxígeno) y su importancia en el proceso de envejecimiento (9,13). Para Denham este es resultado del daño oxidativo (DO) aleatorio causado por radicales libres producidos por procesos metabólicos que emplean oxígeno normal (10,15,16).

Cabe señalar que ya en 1835 C. McCay propuso la participación de factores ambientales como moduladores del envejecimiento (17) y pese a la precocidad de esta teoría hoy conocemos de la existencia de múltiples factores ambientales que pueden ser consecuencia de un EO (7).

Posteriores a la teoría de D. Harman, surgieron otras que recogían diversos aspectos. Entre ellas, “la adaptación mitogénica alterada” de G. C. Williams (1957) (18), la “concentración aumentada de oxígeno intracelular” de Rebeca Gershman, (1962) (19) y la teoría mitocondrial del envejecimiento de Jaime Miquel (1991) (19,20).

Masoro en 1996 contempla en su teoría la participación de “la mitohormesis y los estímulos estresantes de baja intensidad” (21) y más recientemente HYChung en 2006 formula la “teoría de la inflamación y los genes inflamatorios” (22).

No obstante, desde el momento en que se plantea la teoría de los radicales libres, una creciente cantidad de evidencia apuntó al EO como el factor principal del proceso de envejecimiento por su contribución al desarrollo de múltiples procesos patológicos dependientes de la edad (10,15,23).

Así mismo, se han propuesto también teorías relacionadas con el componente común del ROS (24) pero con la participación de otras

especies reactivas, como el nitrógeno además del oxígeno, recopiladas en la “Teoría del Daño Oxidativo del Envejecimiento” (16,23).

También las mitocondrias parecen jugar un papel en el envejecimiento mediado por la acción de ROS. Así lo afirma la “Teoría mitocondrial del envejecimiento” cuyo defensor principal fue el grupo de J. Miquel que en 1991 proporcionó el apoyo experimental (9,20), al integrar el agente agresivo (ROS) y el objetivo del daño (ADN mitocondrial (ADNmt) de manera que “la importancia de esta teoría prevalece cuando el proceso de producción del ROS / daño a ROS se establece como un proceso único”(9,15).

3.1. LA TEORÍA MITOCONDRIAL.

Es un hecho bien conocido que la mayoría (90%) del oxígeno se consume en la cadena de transporte electrónico (ETC) mitocondrial y del éste el 1-2% se convierte en ROS, lo que representa una generación continua de especies altamente lesivas para las moléculas (25).

El origen de la lesión autoinfligida al ADNmt se debe a las siguientes circunstancias:

- 1) El ADNmt se encuentra permanentemente expuesto a ROS.
- 2) El ADNmt es una estructura expuesta a noxas al no estar recubierta de proteínas protectoras como las histonas (26).

- 3) La replicación del ADNmt es más rápida que la del ADN nuclear (ADNn) y con menos mecanismos de corrección de pruebas y de reparación (23).
- 4) El ADNmt se sintetiza en la membrana interna de la mitocondria mediante un complejo membrana-ADN (25).

De esta manera el ADNmt es más susceptible al daño por ROS (23), y tasas elevadas de mutaciones de ADNmt incrementarán todavía más las tasas de ROS, facilitando así el acúmulo de mutaciones al afectar negativamente la integridad de la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Esta secuencia de daño explicaría que un daño inicial mínimo actúe exponencialmente causando un daño adicional a modo de “ciclo vicioso” (Figura I-2) (23,25,26).

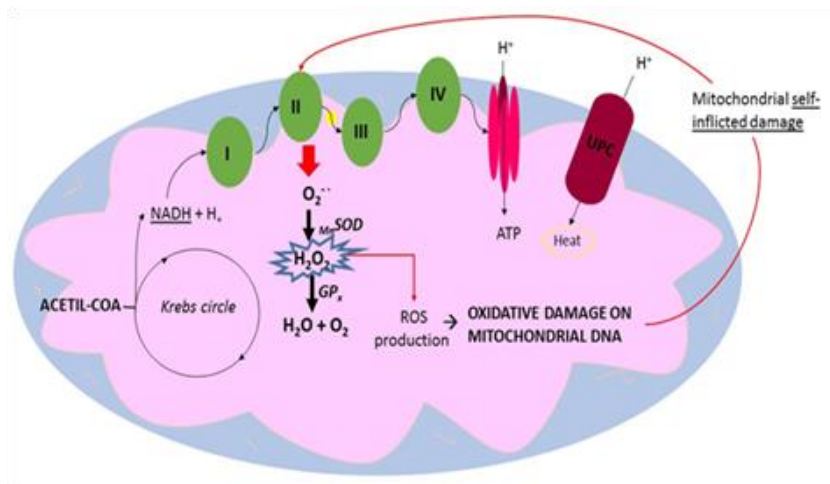


Figura I- 2. Formación de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte de electrones y lesión del ADN mitocondrial.

La lesión del genoma mitocondrial interfiere directamente a la codificación de distintas proteínas, algunas de las cuales forman parte del ETC mitocondrial. Al estar parcialmente codificado en este genoma mitocondrial, se han detectado alteraciones mayores en el citocromo C oxidasa (entre los complejos II y III) (27), en el complejo I, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) por lo que finalmente presenta una menor actividad (25).

La Teoría del Envejecimiento Radical Libre Mitocondrial propone esencialmente una degeneración acelerada exponencial de las mitocondrias (26) , apuntando a esta como la fuente principal de ROS e igualmente el objetivo primario del daño de ROS (15).

La producción en exceso de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) en las mitocondrias produce el colapso en la cadena respiratoria permitiendo el escape de algunos electrones que originan la producción de ROS (Figura I-2). Cuando la enzima prooxidante no puede realizar la desintoxicación, esta especie reactiva se acumula produciendo daños a nivel oxidativo que afectan a los componentes de la cadena respiratoria ocasionando así un incremento de la lesión del sistema operativo interno(28).

Las lesiones oxidativas así originadas reducen la longevidad de la especie mediante la lesión directa de las macromoléculas, pero también mediante la activación de distintas vías de transducción de señales sensibles a las señales de ROS e involucradas por tanto en la patogenia de los procesos degenerativos relacionados con la edad (25).

La señalización de ROS afecta a los procesos de resistencia al estrés, a procesos inflamatorios, a la mitogénesis y al umbral de

muerte tisular y por tanto pueden ocasionar la alteración de la homeostasis tisular.

De esta manera, la producción de ROS participa estrechamente en los mecanismos de muerte celular y en la modulación mitocondrial de las enfermedades crónicas degenerativas (26) y juegan un papel primordial en los fenómenos de apoptosis pues los agentes apoptóticos son en su mayoría oxidantes o estimulantes del metabolismo celular oxidativo.

Las modificaciones en la cascada de señal de apoptosis por ROS se producen mediante la alteración de moléculas fundamentales en la cascada de transducción. Así, la actividad de algunos factores transcripcionales, tanto intra-transcripcionales como post-transcripcionales, se encuentra regulada por el estado redox y específicamente la activación del factor de transcripción nuclear kappa-B (NF-κB) que es dependiente de la presencia de peróxido de hidrógeno, la cual se expresa mediante un gen de expresión proinflamatorio (29).

Además, se ha observado que el proceso de envejecimiento se acumula en células somáticas diferenciadas, especialmente en células post-mitóticas como neuronas o células mitocondriales, y además las deleciones de ADNmt se concentran focalmente en el cerebro y el músculo esquelético, es decir, se dirigen a tejidos diana que son los que se encuentran afectados en las típicas enfermedades crónicas relacionadas con la edad (25).

La posibilidad de que la producción de ROS mitocondrial y la pérdida de ADNmt sean importantes determinantes de la muerte e inflamación celular dependiente de la edad, así como la tasa de envejecimiento del organismo basal, convierten a la mitocondria en el

objetivo principal para el desarrollo de terapias dirigidas a prevenir o aliviar procesos degenerativos dependientes de la edad (26).

4. RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y SUS IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS.

4.1. DEFINICIÓN DE RADICAL LIBRE.

Por definición, un radical libre es una especie molecular que presenta en su última capa electrónica uno o más electrones desapareados (30).

Esta configuración electrónica, también conocida como paramagnética, es altamente inestable lo que justifica una reactividad muy elevada y una vida media muy corta debido, entre otras razones, a la tendencia que presentan estas especies reactivas a aparear sus electrones desapareados mediante el secuestro de electrones de otras moléculas a las que desestabilizan estructural y funcionalmente (30,31).

En los animales aerobios, las principales especies reactivas derivan de la reducción monovalente del oxígeno molecular. Se trata de un mecanismo de reducción parcial o incompleta de esa molécula que escapa a la acción de la Citocromo Oxidasa en el último eslabón de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

4.2. FORMACIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DE OXÍGENO

Una porción del oxígeno que respiramos se reduce, por una vía alternativa de la Citocromo Oxidasa, dando lugar a formas moleculares parcialmente reducidas de oxígeno (ROS, de Reactive Oxygen Species) responsables del fenómeno conocido como “Estrés Oxidativo” (31–34).

En el metabolismo aerobio, entre el 1 y el 5% del oxígeno que consumimos, se reduce parcialmente, es decir, de forma incompleta dando lugar a intermediarios o especies reactivas de oxígeno tales como el radical aniónico superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) respectivamente (Figura I-3).

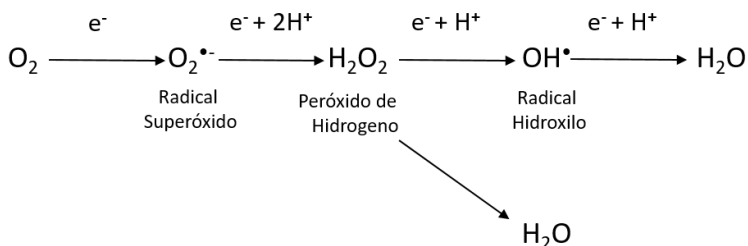


Figura I- 3. Reducción monovalente del oxígeno molecular.

Los procesos metabólicos donde estas especies moleculares se generan son numerosos destacando, por la intensidad de su producción, la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Existe otra especie reactiva, conocida como radical hidroxilo ($\bullet OH$), considerada la última responsable de los efectos citotóxicos de los ROS. Su constante de reactividad es $> 10^{-9} M^{-1}s^{-1}$, y presenta gran

afinidad hacia los ácidos grasos polidesaturados, los hidratos de carbono, las proteínas y las bases nucleotídicas del ADN (34–37).

4.2.1. Fuentes endógenas

La formación de estas especies se produce bajo condiciones fisiológicas a través de múltiples procesos metabólicos (31,34) (Tabla I-2). La autooxidación de leucoflavinas, hidroquinonas, catecolaminas, tioles, tetrahidropterinas, hemoproteínas y ferredoxinas puede producir la reducción incompleta del oxígeno y generar radicales superóxido. La autooxidación de compuestos tiolicos, (-SH) presentes en aminoácidos como la L-cisteína constituye un mecanismo importante de fuente de radicales superóxido, tiolicos e hidroxilo que se identificaron por primera vez en 1982 utilizando resonancia paramagnética de electrones (r.p.e.) y que fueron relacionados con la hepatotoxicidad de este aminoácido (38–40).

Esta especie también se genera en el interior de orgánulos celulares como los cloroplastos y las mitocondrias. A la formación de especies reactivas contribuyen un gran número de reacciones del metabolismo oxidativo donde éstas se generan ya sea como intermediarios de la reacción o como productos de la misma. La formación del radical superóxido y otras especies relacionadas tras la activación de neutrófilos y macrófagos constituye, además, la base molecular de su efecto biocida (41).

Por lo tanto, los ROS se generan, en condiciones fisiológicas a partir de procesos del propio metabolismo celular, por ejemplo, a partir de la vía sintética del ácido úrico (mediante la actividad catalítica

de la enzima xantina oxidoreductasa) y otras muchas reacciones del metabolismo oxidativo que, junto a la cadena de transporte electrónico, la activación de neutrófilos y reacciones de autooxidación espontánea, constituyen las fuentes o mecanismos endógenos de la formación de ROS.

La dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$ (Figura I-4) da lugar a la especie no paramagnética peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, cuyo poder oxidante da cuenta de su utilidad como antiséptico.



Figura I- 4. Dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$

El radical superóxido puede actuar tanto como agente reductor como oxidante. Se comporta como un buen agente mono-reductor con un potencial standard, $E_0 = -0.33$ V para la reacción parcial $O_2 + e \rightarrow O_2^{\bullet-}$ y también es un oxidante potente desde el punto de vista termodinámico, $E_0 = + 0.87$ V, si bien este proceso es más lento.

El papel del radical superóxido en la generación de radicales $\bullet OH$ tiene importantes connotaciones biológicas. El radical hidroxilo es mucho más reactivo que el radical superóxido. La formación de éste transcurre a través de la reacción de Fenton (figura I-5):

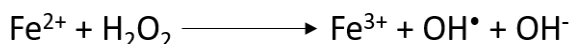


Figura I- 5. Reacción de Fenton

Y la oxido-reducción cíclica del metal por parte del superóxido (Figura I-6):

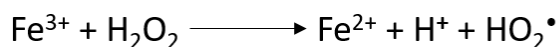
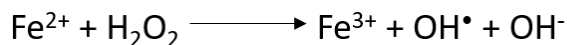


Figura I- 6. Oxido-reducción cíclica

Siendo la suma de ambas reacciones (Figura I-7):

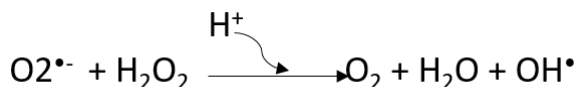


Figura I- 7. Reacción de Haber-Weiss

Conocida esta última como reacción de Haber-Weiss, desde que Beauchamp y Fridowich la bautizaran así en la década de los años 1960 (42–44).

Superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo reaccionan con relativa facilidad con macromoléculas cuya estructura y función resultan imprescindibles para la correcta función celular como son los ácidos grasos de las estructuras fosfolipídicas, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (1-4). El conocimiento de este mecanismo de acción permitió entender mejor tanto la función defensiva de estas células como la sintomatología del cuadro inflamatorio al mismo tiempo que explica su estimulación por diversos alérgenos y promotores tumorales (31).

4.2.2. Fuentes exógenas

Existen fuentes exógenas de radicales libres procedentes de la dieta, tabaco, ozono y otras contaminaciones ambientales (Tabla I-2). Una de las principales fuentes de ROS es la biotransformación de fármacos o xenobióticos que se incorporan a nuestro organismo e inducen distintas proteínas implicadas en su biotransformación. Este es el caso, por ejemplo, de los antibióticos antitumorales de estructura quinónica como la adriamicina y antimicina y el tuberculostático rifamicina SV. Muchos de los efectos secundarios de estos fármacos se atribuyen a la formación excesiva de especies reactivas oxigénicas y/o quinónica (31,41).

Por excelencia, las radiaciones ionizantes, de alta energía y de neutrones representan la fuente más importante y conocida de ROS que, a su vez, constituyen las situaciones más extremas, agresivas y nocivas para la salud.

Mediante la ionización de las moléculas acuosas del organismo, se generan de forma rápida cantidades importantes de radicales superóxido $O_2^{\cdot-}$ e hidroxilo $\cdot OH$ desencadenantes de sus efectos deletéreos (34).

La radiación solar y la fotosensibilización es otro aspecto a tener en cuenta a la hora de valorar la incidencia de las especies reactivas y su protección. La Luz UV que procede de la radiación solar se ha visto implicada en la formación de ROS y, como se sabe, se le atribuye el aumento de la incidencia de cáncer de piel que se viene observando durante los últimos años como resultado de la exposición desmesurada a la radiación solar.

Otras fuentes exógenas de ROS las encontramos en distintos tipos de contaminaciones ambientales entre las que destaca por su frecuente generación y proximidad de exposición el humo del tabaco y menos frecuente pero importante también el shock térmico (41,45).

Tabla I- 2. Fuentes y procesos productores de especies reactivas.

Endógenas - Metabolismo oxidativo	Exógenas - Agentes físicos y químicos
Aumento de la respiración mitocondrial	Radiaciones ionizantes y de neutrones
Reacciones enzimáticas oxidativas	Radiación solar y fotosensibilización
Inflamación, activación de macrófagos y liberación de citoquinas proinflamatorias	Biotransformación de drogas y xenobióticos
Reacciones de autooxidación	Humo de tabaco
	Contaminación ambiental y pesticidas Shock térmico

4.3. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS ESPECIES REACTIVAS

La presencia en condiciones normales de concentraciones subtóxicas de los ROS sugiere y apunta hacia una posible utilidad fisiológica de estos. De hecho, existen no uno sino varios ejemplos sobre ello. Este es el caso del mecanismo de acción de las células fagocíticas en la defensa biocida, donde se activan bajo estímulos precisos y estrictamente controlados diversas enzimas implicadas en la formación de ROS como son NADPH-oxidasa-citocromo b558, subfracciones p47phox, p67phox, p40phox y rac2, para la producción

de radicales $O_2^{\cdot-}$ además de la xantina oxidasa encargada de suministrar H_2O_2 . Se deduce que el resultado final es la formación del radical $\cdot OH$ último responsable de la destrucción del agente infeccioso. También es muy conocido el papel de los ROS como reguladores de la expresión de factores transcripcionales como NF- κB , AP1, FOS/JUN y p53, proteínas implicadas en la ejecución del proceso apoptótico y/o reparación del ADN así como de la respuesta inflamatoria como se describe en el apartado siguiente.

Finalmente citaremos otra forma peculiar de utilizar especies reactivas como el H_2O_2 como defensa y supervivencia, de lo que da cuenta el «bombardier beetle» que utiliza al peróxido para producir una reacción de vaporización exotérmica capaz de alcanzar los $100^\circ C$ (31,46).

4.3.1. *Expresión génica y hormesis*

Una de las primeras aportaciones sobre el papel regulador de las especies reactivas se debe al investigador Paul Cerutti quien al poco de proclamarse la definición de “estrés oxidativo” por Helmut Sies, publicó en la revista Science el poder de los agentes oxidantes como promotores tumorales a través de la capacidad que éstos tenían como activadores de oncogenes e inhibidores de genes supresores de tumores (47). Con esta evidencia se demostraba la participación de los ROS y los productos de peroxidación de moléculas en el proceso de la carcinogénesis. En su trabajo de revisión de 1985 señala además la importancia de las enzimas antioxidantes y otros antioxidantes de bajo peso molecular como agentes anticancerígenos al actuar como sustratos antipromotores tumorales (47,48)

No obstante, en el sentido estricto de lo que se conoce como expresión génica, hay que señalar los trabajos pioneros de Irvin Fridowich, descubridor de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) quien en sus primeras investigaciones tras su descubrimiento comprobó el efecto del oxígeno molecular como inductor de la SOD en distintas líneas celulares. Aunque no mencionaba en su artículo a los ROS, se deducía de su texto y así se comprobó poco después, que esta inducción se debía en gran parte a las moléculas parcialmente reducidas de este gas (49).

Así se constató por Guisela Storz en 1986 en lo que representa uno de los trabajos pioneros sobre el papel regulador de las especies oxigénicas.

Esta investigadora observó que el tratamiento de *Salmonella typhimurium* y células de *Escherichia coli* con dosis bajas de peróxido de hidrógeno daba como resultado la inducción de treinta proteínas y resistencia a la muerte mediante dosis más altas de peróxido de hidrógeno. La expresión de nueve de las proteínas inducibles por peróxido de hidrógeno, que incluyen catalasa, glutatión reductasa y una nueva hidroperóxido reductasa de alquilo, estaba controlada por el regulador positivo OxyR. OxyR es homólogo a la familia LysR-NodD de proteínas reguladoras bacterianas y se une a los promotores de genes regulados por OxyR. La forma oxidada pero no reducida de la proteína OxyR activa la transcripción de genes regulados por OxyR in vitro, lo que sugería que la oxidación de la proteína OxyR producía un cambio conformacional mediante el cual OxyR detecta y transduce una señal de estrés oxidativo a la ARN polimerasa (50,51).

En 1991, el grupo de Peter Baeuerle hace un hallazgo muy importante en ese campo de la investigación sobre el papel regulador

de los ROS. Basándose en la importancia de generar respuestas de defensa adaptativa a la toxicidad de los radicales libres, propone que las células eucarióticas han desarrollado también mecanismos selectivos de formación e ROS como consecuencia de distintos estímulos inducidos por diferentes agentes. En su trabajo demuestran el efecto activador del factor transcripcional NF- κ B por el peróxido de hidrógeno y otros ROS. Su mecanismo consiste en la separación de la subunidad I κ B de complejo p65/p50, lo que permite que éste último atraviese la membrana nuclear y alcance al ADN para iniciar la transcripción de genes diana. En este mismo trabajo se demuestra el efecto inhibitorio de la transcripción por agentes antioxidantes (52,53).

Dos años más tarde el grupo del Dr. Sáez y colaboradores demuestra el papel del agente peroxídico tert-butil-hidroperóxido (Tbooh) en la inducción del complejo de histocompatibilidad MHC clase I en células de fibrosarcoma murino, un efecto que se acompaña de la inducción del factor transcripcional NF- κ B (54).

A esta publicación le siguió otra aportación en la que el grupo demostraba en estas mismas células el efecto inductor del Tbooh sobre la expresión del ARNm de c-fos y c-jun, componentes moleculares del factor transcripcional AP1. Este efecto se relacionaba con el reducido índice de apoptosis en esta línea tumoral debido a los altos niveles del antioxidante glutatión reducido (GSH) (55).

En los últimos años se ha hecho cada vez más evidente que los radicales libres desempeñan un papel en una variedad de sistemas reguladores normales, cuya desregulación puede desempeñar un papel importante en la inflamación. Como ejemplo de estos mecanismos se apuntaba a los roles como segundos mensajeros de: óxido nítrico (NO) en la regulación del tono vascular, O₂⁻ en la proliferación de fibroblastos y H₂O₂ en la activación de factores de

transcripción tales como NF- κ B. Entre otros mecanismos de control, cuya función fisiológica se alteraba durante la inflamación, se incluía: la modificación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad (LDLox), la inactivación oxidativa del inhibidor de la alfa-1-proteasa, el daño/reparación del ADN y la síntesis de proteína de choque térmico. En los sitios de inflamación, el aumento de la actividad de los radicales libres se asocia con la activación de la NADPH oxidasa de los neutrófilos y/o el desacoplamiento de una variedad de sistemas redox, incluida la xantina deshidrogenasa de las células endoteliales (56).

En su trabajo de revisión, Sen y Packer destacan el papel de las concentraciones moderadas de ROS ejercen como mensajeros en la transducción de señales moleculares. Este efecto resulta además del equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, es decir, en los cambios redox intracelulares que inducen distintos factores y situaciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas. En este sentido se señala como factores principales cuya regulación responde a los cambios redox al factor transcripcional NF κ B y AP1 implicados en numeroso grupo de procesos inflamatorios y degenerativos como la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la arterioesclerosis, las complicaciones de la diabetes y el cáncer. Muchos eventos básicos de la regulación de las células, como la fosforilación de proteínas y la unión de factores de transcripción a sitios de consenso en el ADN, están impulsados por la homeostasis oxidante-antioxidante fisiológica, especialmente por el equilibrio tiol-disulfuro. Los sistemas endógenos de glutatión y tioredoxina, y el par de lipoato-dihidrolipoato exógeno pueden, por lo tanto, considerarse como reguladores efectivos de la expresión génica sensible a redox (57).

Las especies de oxígeno reactivo pueden tener funciones adicionales y participar en respuestas biológicas clave, incluida la

migración celular, la mitosis y la apoptosis. La proteína pequeña de unión a guanósín trifosfato (GTP), Rac, como una proteína reguladora controla la producción de superóxido y contribuye a los mecanismos de señalización molecular (58).

Rac y GTPasas, a su vez, son reguladas por especies reactivas y su activación/inhibición, que depende de la concentración intracelular de GSH, se ha relacionado con el efecto apoptótico de agentes antitumorales como la aplidina (59).

Efectivamente, la muerte y la vida celular programada también están sujetas a una regulación doble redox y al diálogo cruzado de especies reactivas y factores transcripcionales. Las señales de muerte inducen apoptosis a través de la activación de caspasas en las células. El estrés oxidativo induce la activación de las caspasas, mientras que la oxidación de las caspasas da como resultado su inactivación. Además, algunas señales de muerte celular inducen la producción de ROS en las células, y las ROS a su vez estimulan la maquinaria de muerte celular. Toda esta evidencia muestra que el destino de la célula está determinado por el diálogo cruzado entre las vías de señalización celular y el estado redox celular a través de un mecanismo de regulación complejo (60).

El papel de los antioxidantes y sobre todo el equilibrio pro-oxidante/antioxidante como el que proporcionan los sistemas del glutatión y la tiorredoxina, como reguladores de las rutas de señalización molecular también se ha demostrado ser un mecanismo clave en la regulación de diferentes factores transcripcionales (57,61,62).

La generación de modificaciones de ADN en las células es, en la mayoría de los casos, accidental y se asocia con consecuencias perjudiciales, como un aumento de las tasas de mutación y un riesgo elevado de transformación maligna. En consecuencia, las enzimas de reparación implicadas en la eliminación de las modificaciones tienen principalmente una función protectora. Entre las excepciones bien establecidas de esta regla se encuentran la 5-metilcitosina y el uracilo, que se generan enzimáticamente en el ADN en condiciones controladas y cumplen funciones reguladoras importantes en el ADN como marcas epigenéticas y en la diversificación de anticuerpos, respectivamente. Más recientemente, se ha obtenido evidencia considerable de que también la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG), una modificación de ADN promutagénica frecuentemente generada por especies de oxígeno reactivas endógenas o exógenas (ROS), tiene papeles distintos en la regulación de transcripción y transducción de señal. Por lo tanto, la activación de la transcripción por el receptor de estrógeno, NF- κ B, MYC y otros factores de transcripción se demostró que depende de la presencia de 8-oxoG en las regiones promotoras y su reconocimiento por la reparación del ADN glicosilasa OGG1 (8-oxoguanina-DNA glicosilasa). La histona desmetilasa específica de lisina (LSD1), que produce H₂O₂ como subproducto, se identificó como un generador local de 8-oxoG en algunos de estos casos. Además, se demostró que un complejo de OGG1 con la base del sustrato libre escindido actúa como un factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) para GTPasas pequeñas tales como Ras, Rac y Rho, estimulando así la transducción de señal (63,64).

Conviene resaltar que, a pesar de la vulnerabilidad de la guanina a la oxidación, los genes de vertebrados están principalmente integrados en regiones genómicas ricas en guanina (G) y citosina (C),

y más del 72% de los promotores de genes humanos pertenecen a una clase con un alto contenido de GC. En el promotor, 8-oxoG puede servir como una marca epigenética, y cuando se combina con la enzima reparadora oxidativamente inactivada 8-oxoguanina DNA glicosilasa 1, puede proporcionar una plataforma para la coordinación de los pasos iniciales de reparación del ADN y el ensamblaje de la maquinaria transcripcional para lanzar la expresión rápida y preferencial de genes regulados por cambios redox. Las desviaciones/variaciones de esta artística coordinación pueden ser los vínculos etiológicos entre la oxidación de guanina y diversas patologías y enfermedades celulares durante los procesos de envejecimiento (65).

5. LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES

5.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.

Los sistemas antioxidantes enzimáticos o enzimas antioxidantes son proteínas involucradas en la transformación catalítica de especies reactivas de oxígeno y sus subproductos en moléculas estables no tóxicas, representan la defensa más importante mecanismo contra el daño celular inducido por ROS.

La anti-oxidación es el proceso por el cual las oxidaciones de las moléculas se retrasan en el tiempo, se reducen en la velocidad, o simplemente son inhibidas. Un antioxidante es cualquier sustancia que

cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con los de un sustrato oxidable retrasan o evitan significativamente la oxidación de ese sustrato. En las reacciones de antioxidación, están involucrados diferentes mecanismos y moléculas orgánicas con el fin de neutralizar los ROS y otras reactividades de radicales libres. Debe establecerse un equilibrio preciso entre las concentraciones de ROS y los antioxidantes dentro de las células y tejidos para garantizar un estado redox adecuado que garantice el control requerido de metabolismo y homeostasis orgánica.

Las enzimas antioxidantes representan un grupo de proteínas que son responsables de la transformación de ROS en una estructura molecular más estable y menos reactiva. Su desarrollo en proto-células tempranas fue un paso crítico para la evolución de los organismos bajo la presión de una atmósfera progresivamente oxigenada que se fue generado como resultado de la fotosíntesis. Las enzimas antioxidantes conservadas filogenéticamente constituyen la primera línea de defensa contra ROS, está ampliamente distribuida en todos los organismos vivos y presentan diferentes isoformas celulares y específicas de tejido, localizadas en diferentes compartimentos celulares (Tabla I-3).

Tabla I- 3. Enzimas antioxidantes. Características reaccionales y distribución

Tomada de Sáez GT, Están-Capell N. Antioxidant Enzymes. Encyclopedia of Cancer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Nombre de la enzima	Número EC	Estructura molecular	MW kDa	Reacción catalizada	Distribución
Superóxido dismutasa	1.15.1.1			$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Citosol
Cu/ZnSOD		Homodímero	32.5		Citosol
Mn/SOD		Homotetrámero	88		Mitocondria
EC-SOD		Glicoproteína glicomérica	135		Fluido extracelular
Catalasa	1.11.1.6	Homotetramérico Heme	240	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Peroxisomas/citosol
GSH peroxidasa	1.11.1.9	Homotetrámero		$2H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$	
				$ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$	
GPx1-Se			22.1		Ubicuo/higado/células rojas de la sangre
GPx2			21.9		Tracto gastrointestinal/citosol
GPx3			25.5		Secreciones/plasma
GPx4			22.2		Ligada a la membrana
					Citosol/mitocondria
Peroxirredoxina	1.11.1.15	Homodímero (grupo no prostético)		$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	
				$ROOH + 2CysSH \rightarrow CysS - SCys + ROH + H_2O$	
Prx1-2Cys			22		Citosol/núcleo
Prx2-2Cys			21.8		Citosol
Prx3-2Cys			27.8		Mitocondria
Prx4-2Cys			30.5		Peroxisoma/retículo endoplásmico aparato de Golgi/lisosomas/extracelular

Nombre de la enzima	Número EC	Estructura molecular	MW kDa	Reacción catalizada	Distribución
x5-2Cys (atípica)			22.1		Peroxisoma/mitocondria
Ppx6-2Cys			25		Citosol/lisosoma
Tiorredoxina	1.6.7.2	Polipeptido		$\text{Trx} - (\text{SH})_2 + \text{X} - \text{S}_2 \rightarrow \text{Trx} - \text{S}_2 + \text{X}(\text{SH})_2$	
Trx-1			11.7		Citosol
Trx-2			18.3		Mitocondria
Tiorredoxina	1.8.1.9	Homodímero		$\text{Tx} - \text{S}_2 + \text{NADPH} \rightarrow \text{Trx} - (\text{SH})_2 + \text{NADP} +$	Membrana plasmática/extracelular
TrxR1			70.9		Citosol/Mitocondria
TrxR2			56.5		Mitocondria
TrxR3			70.7		Mitocondria/Núcleo/Microsoma/ Reticulo endoplásmico

Las enzimas antioxidantes catalizan principalmente tres mecanismos de reacción diferentes: dismutación, reacción peroxidasa y reducciones de tioles.

5.1.1. Superóxido Dismutasa

Las reacciones de dismutación se logran mediante superóxido dismutasas (SOD) (EC 1.15.1.1) y el catalizador.

La reacción consiste en la transformación del ion superóxido, altamente reactivo, en peróxido de hidrógeno, donde no hay electrones desapareados pero que aún es una molécula muy reactiva. Tres isoformas diferentes de esta enzima han sido identificados en células humanas (66).

5.1.1.1. Superóxido Dismutasa Cobre/Zinc

La enzima superóxido dismutasa (SOD), antiguamente hemocupreína y eritrocupreína, tiene el mayor número de recambio (tasa de reacción con su sustrato) de ninguna enzima conocida ($\sim 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). La superóxido dismutasa de zinc y cobre (CuZnSOD) se localiza principalmente dentro del citosol celular. Está presente como un homodímero con un peso molecular de 32,5 kDa y contiene cobre y zinc en sus sitios activos. Los iones de transición de metal juegan un papel importante en esta enzima ya que el cobre participa en el catalizador la actividad y el zinc son esenciales para su estabilización molecular. Aunque CuZnSOD parece no ser esencial para el desarrollo normal y la supervivencia de los animales, juega un papel importante

en la protección del pulmón y otras células de tejido contra la hiperoxia, daño por isquemia / reperfusión y cáncer. Se ha demostrado que niveles elevados de CuZnSOD en ratones proporcionan resistencia al daño inducido por alérgenos a las células del músculo liso traqueal. Bajos niveles de las enzimas se han observado en diferentes enfermedades cardiovasculares. La hiperoxia induce mientras que la hipoxia reduce la expresión de ARNm de esta enzima. SOD está presente en todos los metabolizadores de oxígeno celular, pero que carecen de la mayoría de los anaerobios obligados, probablemente porque su función principal es proporcionar defensa contra los efectos potencialmente dañinos del radical superóxido generado como resultado de metabolismo aerobio. Fridovich y colaboradores (34) han proporcionado pruebas sustanciales que apoyan la importancia de SOD para la supervivencia en todas las células que metabolizan oxígeno. Las mutaciones en la primera CuZnSOD pueden causar problemas familiares, esclerosis lateral amiotrófica e inducir algunos procesos tumorales, como el carcinoma hepatocelular. Su sobreexpresión se ha relacionado con trastornos neuronales en el síndrome de Down.

5.1.1.2. La Manganese Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) es una proteína homotetrámera que actúa con manganeso en su sitio activo.

Se considera una de las enzimas antioxidantes intracelulares más importantes que es responsable de la dismutación de radicales superóxido formados durante el sistema de transporte de electrones en el interior las mitocondrias. Su peso molecular es de 88 kDa.

MnSOD ha demostrado ser esencial para la supervivencia de los animales, ya que los ratones knockout del gen MnSOD mueren dentro de las 2-3 semanas posteriores al nacimiento siendo las causas más frecuentes de su muerte, la acidosis metabólica, la neurodegeneración y las alteraciones cardiomiocíticas. Diferentes factores de transcripción están involucrados en su expresión que puede ser inducida por un amplio grupo de estímulos incluyendo cambios en el estado redox, altas tensiones de oxígeno, citocinas inflamatorias, fármacos citotóxicos, H₂O₂, peroxinitrito y contaminantes ambientales como fibras de asbesto, humo de cigarrillo y ozono.

La MnSOD es abundante en neumocitos tipo II, epitelio bronquial y macrófagos alveolares de diferentes especies animales. Niveles mejorados de enzimas antioxidantes, así como la exposición a la hiperoxia subletal, hace que los animales se vuelvan tolerantes a la dosis tóxica de O₂. En modelos animales, la inducción de MnSOD, la privación en ratones knock-out se acompaña de acidosis metabólica, neurodegeneración y muerte prenatal por miocardiopatía dilatada. Cambios tanto en la expresión como en la actividad de esta enzima mitocondrial tienen profundas implicaciones en el proceso de regulación del crecimiento y transformación celular.

5.1.1.3. Superóxido dismutasa extracelular

La superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD) es una glicoproteína tetramérica con un peso molecular de 135 kDa. EC-SOD contiene también Cu y Zn en su sitio activo y confiere protección antioxidante al espacio extracelular debido a su alta expresión en los vasos sanguíneos, corazón, pulmón y placenta. También está

presente en plasma, linfa y fluidos sinoviales. La enzima se establece en la matriz extracelular a través de un dominio de unión a heparina en su secuencia de aminoácidos carboxi terminal. EC-SOD juega un papel importante en la modulación de los niveles de óxido nítrico mediante la eliminación de radicales superóxido extracelulares. Los niveles reducidos de EC-SOD contribuyen a una serie de situaciones patológicas.

5.1.2. Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima homotetramérica hemo con un peso molecular de 240 kDa. Su mecanismo de defensa consiste en la descomposición del H₂O₂ en agua y oxígeno. La catalasa también tiene un efecto en la desintoxicación de fenoles, ácido fórmico, metanol y etanol. Se localiza principalmente en peroxisomas y en cierta medida también está presente en la fracción citosólica. El aminotiazol inhibe la catalasa in vivo al interferir la unión de una histidina al grupo prostético de hemo. En las células de mamíferos, la catalasa también puede lograr reacción de peroxidación. La acatalasemia es una condición congénita rara con deficiencia de catalasa en eritrocitos y otros tejidos. La catalasa juega un papel importante en las adquisiciones de tolerancia al estrés oxidativo durante la respuesta adaptativa de las células a altas tensiones de oxígeno.

5.1.3. Glutathion peroxidasa

Las glutathion peroxidasas (GPxs) (EC 1.11.1.19) son una superfamilia de enzimas que catalizan la reducción de hidroperóxidos (-ROOH) a grupos alcohólicos y agua utilizando glutathion reducido (GSH) como cosustrato. En la reacción, GSH se oxida a GSSG (glutathion oxidado). Las enzimas GPx se dividen en dos grupos dependiendo de la presencia de selenio en sus sitios activos. Aquellos que contienen selenio (dependiente de selenio) GPx también puede descomponer H_2O_2 en agua y oxígeno.

El glutathion oxidado (GSSG) puede ser reducido de nuevo a GSH por la enzima GSH reductasa (GR), usando NADPH como sustrato reductor (Figura I-8).

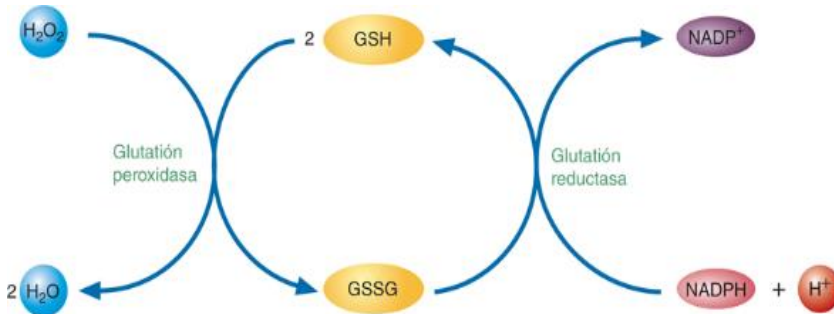


Figura I- 8. Esquema de la secuencia reaccional del sistema de glutathion peroxidasa-reductasa.

La capacidad de reciclar GSH hace que el ciclo de GSH evite el agotamiento de los tioles celulares y juegue un papel fundamental como mecanismo antioxidante para las células aeróbicas. Hay diferentes formas celulares genéticamente distintas de GPXs en células de mamíferos. La familia GPx está compuesta de al menos ocho isoenzimas (GPx1-GPx8). GPx1 es la isoenzima más ubicua y abundante, en la fracción intracelular que contiene cuatro subunidades de 22 KDa, cada una con una selenocisteína. GPx2 es la enzima de la vía gastrointestinal. GPx3 circula en sangre y se produce y secreta desde el riñón. GPx5 y 6 son proteínas específicamente producidas en el epidídimo y en el epitelio olfatorio, respectivamente. GPx4, 7 y 8 son los primeros en evolución, con secuencias de aminoácidos conservadas compartidas por invertebrados y protozoos. GPx4 es una forma unida a la membrana, importante para la espermatogénesis. GPXs han sido implicados en diferentes enfermedades cardiometabólicas, y su actividad se reduce en las células mononucleares circulantes de sujetos hipertensos. El bajo nivel de actividad de la glutatión peroxidasa 1 de glóbulos rojos se asocia independientemente con mayor riesgo de eventos cardiovasculares.

La coordinación y las actividades sincronizadas de las enzimas SOD, catalasa y GPx completan y aseguran la estrategia antioxidante cuya principal función es evitar la producción del radical hidroxilo altamente reactivo y peroxinitrito (ONOO-) por lo tanto, previniendo el daño celular y la reducción del intermedio vasoactivo, el óxido nítrico (NO) (Figura I-9).

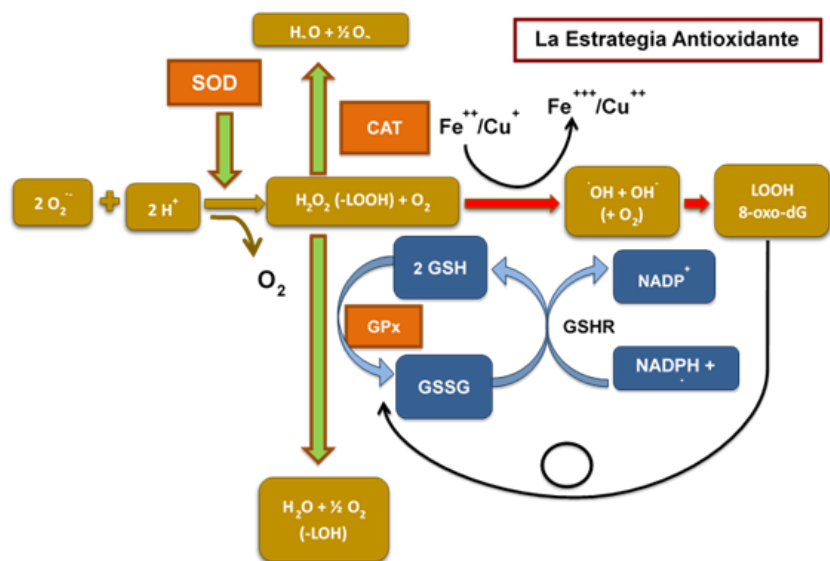


Figura I- 9. La estrategia antioxidante.

Tomada de Sáez GT, Están-Capell N. Antioxidant Enzymes. Encyclopedia of Cancer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

La función sincronizada de las actividades enzimáticas SOD, catalasa y GPx evita la interacción de O_2 con H_2O_2 o un ion de metal de transición (Cu^+ / Fe^{2+}) a través de las reacciones tipo Haber-Weiss o Fenton, respectivamente, que conducen a la formación de especies de oxígeno altamente reactivas ($\cdot OH$). Además, O_2 puede reaccionar con NO para producir el sustrato citotóxico peroxinitrilo ($ONOO^{\cdot}$). Esta estrategia antioxidante previene las células contra una generación excesiva de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, secundaria al estrés oxidativo, mientras se mantienen las concentraciones fisiológicas y la acción vasodilatadora del NO.

5.1.4. El eje Tiol-Selenio peroxidasa

El estado redox de tiol celular es mantenido por tres sistemas principales, el sistema de glutatión, el peroxirredoxinas (Prx) (EC 1.11.1.15) y el sistema de tiorredoxina, incluida la tiorredoxina (Trx) (EC 1.8.7.2) y tiorredoxin reductasa (TrxR) (EC1.8.1.9) que actúan secuencialmente en la transferencia de electrones entregado por NADPH o NADH. Desempeñan un papel importante en la modulación redox de diferentes proteínas y moléculas no proteicas y están implicadas en la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis.

5.1.4.1. Peroxidoxinas

Esta familia de enzimas con actividad peroxidasa (Prxs) reduce el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a través de cambios redox de grupos específicos de cisteína-SH. Estas enzimas comparten el mismo catalizador básico, mecanismo en el que una cisteína redox-activa (la cisteína peroxidasa) se oxida a un ácido sulfénico por el sustrato de peróxido que se transforma en el alcohol-agua correspondiente. Se componen de dos subunidades idénticas sin grupos prostéticos. Prxs contiene una o dos cisteínas funcionales activas en su sitio activo que permite su clasificación y nominación (Tabla I-3). Prxs1-4 son típicos 2-grupos cisteína -SH que reducen el peróxido, mientras que la enzima se oxida para formar un enlace disulfuro intermolecular. Se encuentran en diferentes compartimentos celulares, incluido el citosol (Prxs1, 2, 3, 5, 6), peroxisomas (Prxs4 y 5), lisosomas (Prxs4 y 6), retículo endoplásmico, aparato de Golgi extracelular (Prxs4) y las mitocondrias (Prxs3 y 4). Prx3 actúa

sinérgicamente con proteínas quinasas tales como MAP3K13 para regular el factor de transcripción NF- κ B activado en el citosol.

5.1.4.2. Tiorredoxinas

Las tiorredoxinas (Trx) son polipéptidos con una masa molecular de aproximadamente 12 kDa que se encuentran en eucariotas y procariontes y que están ampliamente distribuidos en las células de los mamíferos. El sistema de tiorredoxina juega un papel crítico en regulación de muchas funciones celulares tales como proliferación y diferenciación celular. Las tiorredoxinas actúan como donadores de electrones para una serie de enzimas, como ribonucleótido reductasa, metionina sulfóxido reductasa y peroxirredoxinas. En estado reducido, las tiorredoxinas contienen dos grupos sulfhidrilo (-SH) que sufren oxidación y forman un puente disulfuro mixto (-S-S-). Trx interactúa con las proteínas diana para formar un puente disulfuro mixto mientras se oxida (Figura I-10). En humanos, las isoformas principales son Trx1 en el citosol y Trx2 en las mitocondrias.

La radiación induce la translocación de Trx1 del citoplasma al núcleo. Trx1 participa en la S-nitrosilación reversible de residuos de cisteína en proteínas diana y por lo tanto, contribuye a la respuesta al óxido nítrico intracelular.

La tiorredoxina reductasa (TrxR) es una proteína homodímera. Se han identificado tres TrxR diferentes en humanos (TrxR 1-3), que están localizados en diferentes compartimentos celulares. Ellos son responsables de la reducción de Trx oxidado usando selenocisteína como grupo redox activo y FADH o NADPH como el cofactores

enzimáticos. TrxR es capaz de reducir los puentes disulfuro presentes en diferentes moléculas, como S-nitrosoglutation y ácido lipoico (67).

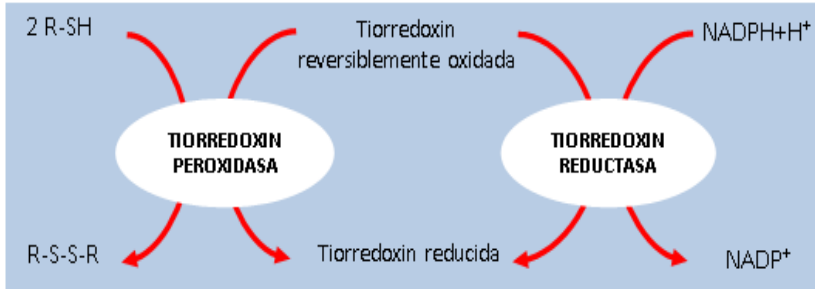


Figura I- 10. Esquema de la secuencia reaccional del sistema de las tiorredoxinas

De la actuación sincronizada de las principales enzimas antioxidantes (SOD, Catalasa y GPx) se consigue mantener la “estrategia antioxidante” que, como se señala en la Figura I-9, consiste y tiene como finalidad prevenir contra la formación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) o mantener en el estado estacionario concentraciones intracelulares de esta especie reactiva compatible con la viabilidad homeostática (67).

5.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

5.2.1. Vitamina C

Está considerada como una de las vitaminas con mayor poder antioxidante. Es el antioxidante soluble exógeno más abundante que se encuentra en plasma y fluidos intersticiales. Protege de la peroxidación lipídica en el plasma (68).

Es efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. Estas especies reactivas de oxígeno son reducidas a agua, mientras que las formas oxidadas del ascorbato son relativamente estables y poco reactivas.

En el interior de las células, la vitamina C refuerza la acción de la vitamina E y del GSH (Glutati6n reducido), regenerando sus formas activas, despu6s de que hayan reaccionado contra las especies reactivas de ox6geno (69,70).

5.2.2. Vitamina E

Llamada tambi6n tocoferol, esta vitamina liposoluble es esencial para el organismo como antioxidante que ayuda a proteger los 6cidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, frente a la peroxidaci6n lip6dica, manteniendo la estabilidad de dicha membrana (71).

La Vitamina E secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo. Este último puede ser reducido por el ascorbato y el glutatión oxidado a la respectiva quinona. Evita la destrucción anormal de glóbulos rojos así como los trastornos oculares. Está constituida por ocho isoformas diferentes conocidas como tocoferoles y tocotrienoles, siendo el alfa-tocoferol la más activa y abundante (71).

5.2.3. Carotenoides

Se trata de compuestos colorantes naturales con pronunciada actividad antioxidante. La propiedad química que les da este carácter antioxidante se basa en un extendido sistema de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides actúan sobre el oxígeno singlete 1O_2 y los radicales peroxilos (LOO^*)(72,73).

La energía de excitación del carotenoide se disipa a través de interacciones vibracionales con el solvente, para recobrar su estado anterior. De esta forma la estructura del carotenoide no se altera y queda disponible para otro ciclo de activación. También se ha descrito su papel en el secuestro de radicales peroxilos por interacción química (74).

Al igual que la vitamina E, los carotenoides pertenecen a un conjunto de antioxidantes lipofílicos presentes en lipoproteínas como la LDL o HDL. Los carotenoides están presentes en una gran variedad de frutas y verduras. Los procesos de absorción y transporte de los carotenoides son bastante complejos. Influyen muchos factores como

la coingestión con fibra o grasas o el cocinado de los alimentos entre otros (75). El suplemento en la dieta de cantidades moderadas de β -carotenos en individuos sanos parece una intervención dietética aceptada y saludable.

5.2.4. Ubiquinonas

La Ubiquinona o Coenzima Q y es producida por prácticamente todos los organismos con metabolismo respiratorio es una de las estructuras moleculares con mayor poder antioxidante que se conocen. Es una benzoquinona liposoluble que está presente en la mayoría de las células eucarióticas, principalmente en las mitocondrias y ampliamente distribuida por las membranas celulares llevando a cabo diversas funciones relacionadas con su capacidad redox , entre las que cabe destacar su papel como transportador de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial donde transporta electrones desde el complejo I (NADH-reductasa) o el complejo II (succinato deshidrogenasa) hasta el complejo III (coenzima Q - citocromo c reductasa)(76).

También actúa como aceptor de electrones de la “acetil-coenzima A deshidrogenasa” implicada en la beta-oxidación de ácidos grasos. Se ha demostrado su participación en la actividad de enzimas desacoplantes y en la apertura del poro mitocondrial y, por tanto, la regulación de la apoptosis. En otras membranas muestra una función antioxidante, bien de forma directa contra la formación de lipoperóxidos o de forma indirecta a través del reciclado de otros antioxidantes

lipídicos como la vitamina E, o hidrosolubles como la vitamina C o ácido ascórbico.

Los diversos tipos de coenzimas Q se diferencian entre sí por el número de isoprenos de su cadena lateral. En la naturaleza se encuentran organismos con 6 unidades de isopreno (*Saccharomyces cerevisiae*), 8 (*Escherichia coli*) o 9 (*Caenorhabditis elegans*), o una combinación de 9 y 10 (*Mus musculus*). La forma de CoQ más común en humanos es la CoQ10, aunque también se pueden encontrar pequeñas trazas de Q9. La “Q” se refiere al grupo químico quinona, y el 10 al número de subunidades isoprenoides que tiene (77).

5.2.5. Flavonoides.

Son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se pueden encontrar principalmente en forma de O-glicósidos en muchas frutas, vegetales y bebidas como el té, el vino y la cerveza. Son eficaces antioxidantes capaces de reaccionar con radicales como los radicales peroxilos, el radical hidroxilo y el O_2^- , formando el radical fenoxi. En este grupo se incluyen distintos subgrupos como los flavanoles (catequinas, epicatequinas), flavonoles (quercetina, miricetina, caemferol), flavanonas (naringenina, taxifolina), flavonas (apigenina, hesperetina), isoflavonas (genisteína), o antocianidinas (cianidina, malvidina).

Son muchas las propiedades que se les atribuye a los flavonoides a la hora de interaccionar con radicales libres. Estas incluyen la presencia de una estructura 3',4'-hidroxi en el anillo B, la

presencia de un doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo en el anillo C, y la presencia de un grupo 5-hidroxilo en el anillo A con un grupo 3-hidroxilo y una función 4-oxo en el anillo C. (Figura I-11).

Varios estudios, tanto in vivo como in vitro, demuestran las propiedades antioxidantes de estos compuestos, sin embargo, su biodisponibilidad es bastante pobre.

Como en el caso de los carotenoides, no se conoce muy bien cuál es la distribución en los tejidos de estos compuestos y su absorción en humanos (78).

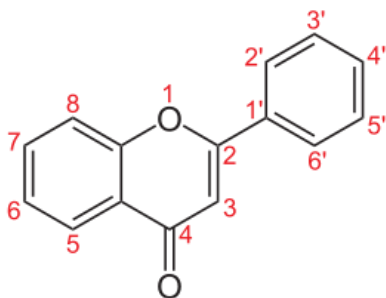


Figura I- 11. Estructura base de un flavonoide

5.2.6. Estilbenos.

Esta familia de polifenoles naturales incluye a los derivados hidroxi- y metoxi- del estilbeno simple, así como sus formas glicósido y polímeros. Se encuentran en muchas plantas superiores. Entre los más destacados podemos encontrar el resveratrol, uno de los polifenoles del vino donde sus concentraciones pueden variar entre 0,003 y 3,0 μM en vino tinto. El resveratrol es un polifenol natural presente en muchas plantas, frutas y frutos secos. Su síntesis está regulada por la presencia de factores de estrés como la contaminación por hongos y la radiación ultravioleta (79).

El pteroesstilbeno (Figura I-12) es un estilbenoide químicamente relacionado con el resveratrol que se encuentra en los arándanos y uvas. Pertenece al grupo de las fitoalexinas, sustancias producidas por las plantas para combatir las infecciones. Durante los últimos años, a su poder como antioxidantes se suma también un importante efecto anticancerígeno (80,81).

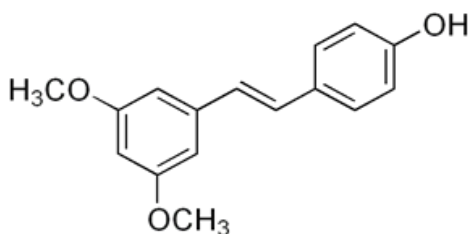


Figura I- 12. Estructura del Pteroesstilbeno

5.2.7. Estrógenos

Las acciones de los estrógenos incluyen diferentes mecanismos tales como efectos genómicos asociados a receptores de estrógenos (ER), efectos no genómicos que involucran sistemas de segundos mensajeros y vías de proteínas kinasas y efectos antioxidantes. Debido a su estructura fenólica y su papel protector contra la peroxidación de los fosfolípidos de membrana, se ha llegado a considerar a los estrógenos como antioxidantes naturales (82,83).

En los seres humanos, el estrógeno más potente es el 17 β -estradiol (Figura I-13), seguido por la estrona y el estriol. Los tres presentan una estructura esteroidea de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos (84).

Su papel como antioxidante y protector cardiovascular a nivel cerebral ha sido recientemente demostrado (85).

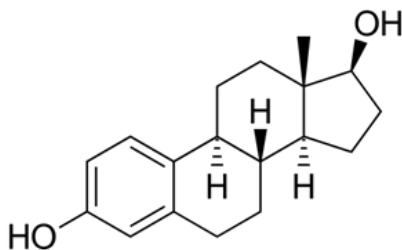


Figura I- 13. Estructura básica del 17 β -estradiol

5.2.8. Glutación, GSH

El Glutación ó γ -Glutamyl-Cisteinil-Glicina es el tiol no proteico más abundante y ampliamente distribuido en la naturaleza desde plantas y microorganismos hasta las células de mamíferos. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutati3n tenga una diversidad biol3gica muy amplia y de gran inter3s en la regulaci3n metab3lica.

Se puede encontrar en dos formas seg3n su estado de 3xido-reducci3n: como GSH o glutati3n reducido, o como GSSG o glutati3n oxidado (que est3 compuesto por dos mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las ciste3nas). El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metab3licas: una de ellas es la de proteger a la c3lula frente al ataque oxidativo; ya sea ROS, per3xidos o las radiaciones ionizantes.

El GSH es el mayor determinante del potencial redox intracelular. Tanto la concentraci3n de GSH como la relaci3n molar GSH/GSSG contribuyen a mantener el balance redox dentro de la c3lula. Como ya se ha comentado, el equilibrio redox regula diversos procesos metab3licos intracelulares que incluyen la actividad enzim3tica, el transporte celular, transducci3n de seÑales y la expresi3n g3nica mediada por la transcripci3n de factores entre los que se destacan el activador de prote3na (AP-1), el factor nuclear Kappa-B (NF- κ B) y el p53'.

A pesar de que su capacidad antioxidante se debe y relaciona con su propiedad como cosustrato de la GPx, este trip3ptido tambi3n act3a como antioxidante directo o estabilizador de especies reactivas como el radical \bullet OH. Este efecto, que se atribuye a la presencia en la

cisteína de un grupo -SH libre, es de extraordinaria importancia ya que representa un mecanismo rápido y efectivo de eliminación de ROS, tal y como se ha comprobado en la protección contra la toxicidad inducida por diversos agentes xenobióticos (86–88).

La GPx utilizando al GSH como coenzima reduce H_2O_2 y LOOH a estructuras estables e inocuas como oxígeno, agua o grupos alcohólicos, al tiempo que como producto de oxidación genera glutatión oxidado (GSSG). El GSSG formado puede ser reducido de nuevo a dos moléculas de GSH por acción de la enzima GSH reductasa usando NADPH, que a su vez depende de la función de la ruta de las pentosas fosfato. Así queda constituido un sistema de reacciones acopladas en un ciclo de óxido-reducción. Los peróxidos orgánicos (LOOH) pueden ser reducidos por dos enzimas, la glutatión peroxidasa o la enzima glutatión S-transferasa (GST_S). En condiciones de estrés oxidativo severo, la habilidad de la célula para reducir GSSG a GSH se encuentra superada, tendiendo entonces a la acumulación de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, el GSSG es transportado fuera de la célula o bien forma disulfuros mixtos con las proteínas para mantener el equilibrio redox (89,90) (Figura I-14).

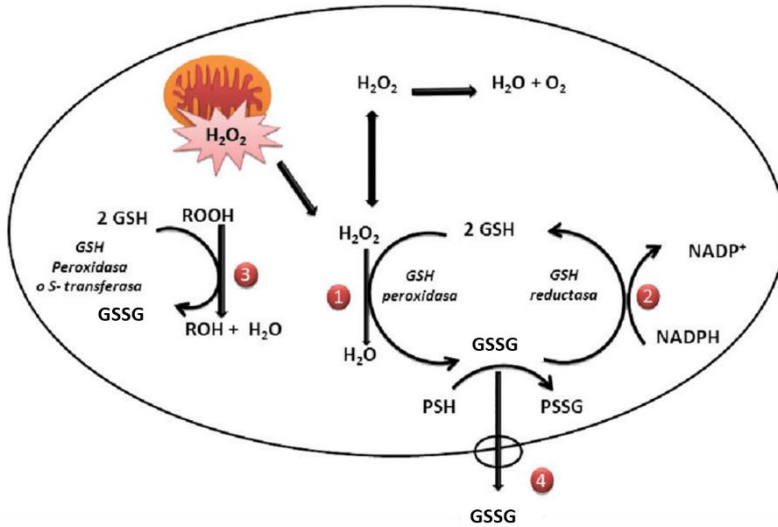


Figura I- 14. Función antioxidante de GSH.

- 1) El peróxido de hidrógeno formado por el metabolismo aeróbico es metabolizado por la enzima "GSH peroxidasa" formando GSSG.
- 2) El GSSG formado en la reacción anterior es reducido por la enzima "GSH reductasa" utilizando NADPH como cofactor.
- 3) Los peróxidos orgánicos (ROOH) formados pueden ser reducidos por GSH peroxidasa.
- 4) El GSSG formado durante el estrés oxidativo que no puede ser reducido a GSH es exportado de la célula para mantener el equilibrio redox (90).

6. ESTRÉS OXIDATIVO. INTERACCIONES MOLECULARES Y PRODUCTOS DE OXIDACIÓN MOLECULAR

Cuando la batería de sistemas antioxidantes de que disponen las células, no son suficientemente efectivas para el control adecuado de las concentraciones fisiológicas de los ROS, éstas entran y se ven sometidas a una situación de compromiso tanto estructural como metabólico conocido como “Estrés Oxidativo” (EO) tal y como fue referido primero por Ernst Beutler en los años 70 (91) y posteriormente definido por Helmut Sies en la década de los 80 y revisado recientemente por este mismo autor (36,92,93).

Por lo tanto, el EO, refleja una situación de desequilibrio entre los procesos de oxidación espontánea inducida por un aumento en la producción de ROS y la efectividad de los sistemas antioxidantes. En estas condiciones, una vez superada la barrera antioxidante, las especies reactivas difunden a través de los distintos compartimentos celulares e interaccionan libremente con un número muy variado de biomoléculas orgánicas a las que modifican oxidativamente primero para inducir la pérdida de su función biológica después. Esta modificación oxidativa es el resultado del secuestro electrónico al que se ven sometidas por las especies paramagnéticas en un intento de aparear su electrón desapareado. En este sentido, es importante señalar que este tipo de oxidación no tiene nada que ver con el proceso normal de oxidaciones metabólicas que constituyen y forman parte del catabolismo en el metabolismo intermediario. En otras palabras y para mostrar un ejemplo de lo dicho, la oxidación de los ácidos grasos se puede conseguir a través de dos procesos muy diferentes entre sí tanto en lo que respecta a su funcionabilidad y mecanismo bioquímico como en lo que se refiere a su finalidad metabólica y productos metabólicos.

Si una cadena de ácido graso como el palmítico (C16:0) se oxida metabólicamente como sustrato de la β -oxidación, este proceso se lleva a cabo mediante un sistema coordinado y regulado catalizado por un sistema o complejo multienzimático en el que participan distintas proteínas enzimáticas y cuyo resultado es, además del acortamiento de la cadena hidrocarbonada la producción de 108 moléculas de ATP.

Si por el contrario el ácido graso palmitoleico (C16:1:9) antes de saturar el doble enlace en posición 9, es atacado por un radical $\cdot\text{OH}$, el proceso se conoce como lipoperoxidación que es el resultado de distintos secuestros de electrones y protones, la formación de peróxidos ($\text{LOO}\cdot$) e hidroperóxidos (LOOH) entre otros productos de oxidación, y finalmente la alteración de su configuración espacial con grave repercusión para la estructura macromolecular en la que se localice.

De igual forma se pueden ver alteradas distintas moléculas que mantienen la arquitectura celular y sus distintas funciones homeostáticas, de las que vamos a destacar las más importantes como son las estructuras lipídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos.

6.1. DAÑO OXIDATIVO A LOS LÍPIDOS

Efectivamente, los ácidos grasos, especialmente, los desaturados, son estructuras predilectas para su oxidación (peroxidación) por los ROS. Este proceso transcurre a través de distintas fases o etapas reaccionales que han sido descritas y clasificadas en reacciones de iniciación, propagación y terminación, si

bien el alcance de las mismas y sus distintos efectos citotóxicos son impredecibles (Figura I-15). Se han realizado numerosos estudios para medir la peroxidación de lípidos, ya que hay una alta concentración de hidrógenos alílico en los compuestos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de los fosfolípidos, que son realmente sensibles al ataque de radicales libres. Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y diferentes residuos químicos como el malonildialdehído (MDA). El MDA tiene la capacidad de reaccionar con las proteínas y los lípidos dando lugar a las bases conjugadas de Schiff, productos fluorescentes insolubles acumulados en los lisosomas que dan lugar a un compuesto coloreado llamado lipofucsina o pigmento senil (31). Este tipo de macromoléculas pueden oxidarse hasta producir sustancias citotóxicas(10).

El ensayo actual alternativo para medir la peroxidación de lípidos es determinar un grupo de compuestos de tipo prostaglandina (PG) que proviene del ataque de lípidos de membrana de ROS; son los F2-isoprostanos esterificados. Los isoprostanos (8-iso-F2 α PG) son compuestos biológicamente activos cuyo nivel en la orina es un predictor independiente de muerte en adultos mayores. Las ventajas de esta determinación son: a) este analito puede medirse con precisión, incluso a nivel picomolar; b) son bastante estables; c) no exhiben variaciones diurnas; d) puede detectarse en casi todos los tejidos biológicos; e) sus niveles están modulados por el estado antioxidante del cuerpo, pero no por la composición lipídica de la dieta (31).

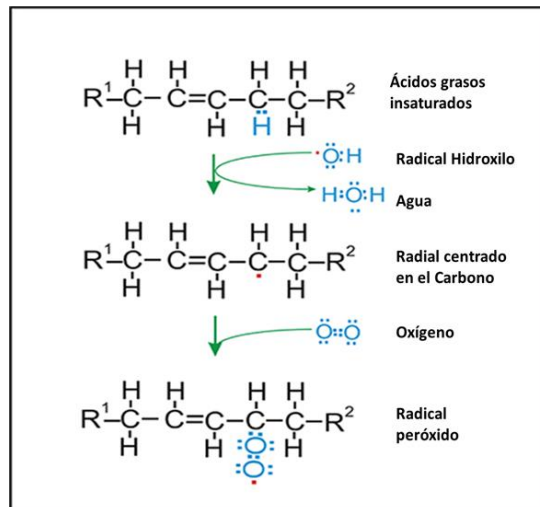
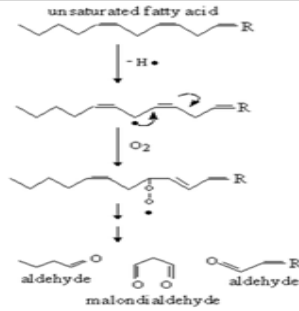
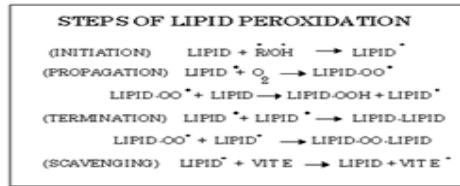




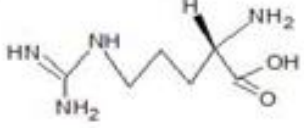
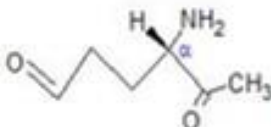
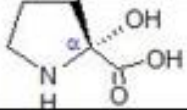
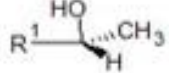
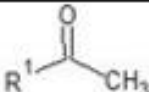
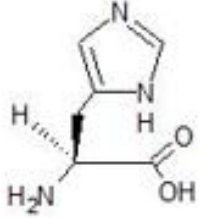
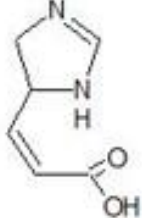

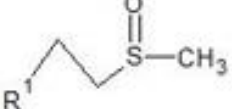
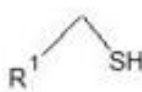
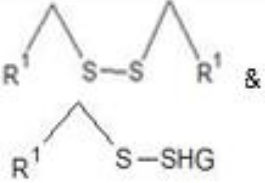
Figura I- 15. Fases de la peroxidación lipídica, intermediarios y productos activados.

6.2. DAÑO OXIDATIVO A LAS PROTEINAS

Casi todos los aminoácidos en las proteínas son un objetivo potencial para la oxidación de ROS, las proteínas dañadas por ROS producen residuos de aminoácidos oxidados. La mayoría de las modificaciones oxidativas producen proteínas con grupos carbonilo (10), sin embargo, se pueden encontrar otras modificaciones oxidativas (Tabla I-4). En la tabla se muestra la oxidación de la mayoría de los aminoácidos típicos. La oxidación de metionina conduce al sulfóxido de metionina, mientras que la oxidación de cisteína se encuentra con una variedad de productos oxidados con cisteína, incluidos los disulfuros (46). La mayoría de las modificaciones proteicas son irreversibles y llevan consigo la degradación de la macromolécula para ser reemplazada por otra proteína lo que altera el mecanismo de recambio proteico (46).

Además del recambio proteico, la oxidación de proteínas puede tener otras muchas consecuencias a nivel metabólico y fisiológico, como la alteración de receptores de membrana, la inactivación de factores transcripcionales o la distorsión de la ruta de señalización en las que estas intervienen cuando afectan a proteinquinasas o factores de crecimiento y diferenciación celular.

Tabla I- 4. Estructuras oxidadas de aminoácidos

	Aminoácido	Estructura oxidada (ROS)
Lisina		
Arginina		
Prolina		
Treonina		
Histidina		
Metionina		
Cisteina		

6.3. LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A pesar de las ventajas evolutivas que permitieron al ácido desoxirribonucleico (ADN) convertirse en la molécula especializada en el almacenamiento de la información genética, ésta no está exenta de perturbaciones en su estructura y por lo tanto de su función. La molécula del ADN es más estable que la de ácido ribonucleico (ARN) ya que, al carecer de un grupo hidroxilo en el carbono 2' de la desoxirribosa, le confiere mayor estabilidad y menor susceptibilidad para su hidrólisis. Por otra parte, su estructura de doble hélice, le otorga la fiabilidad en la replicación, así como la de reparación de su mensaje, asegurando por la otra cadena conservante de la información intacta que actúa como molde, a estas ventajas debemos añadir una protección adicional que se desprende de la localización nuclear de este polímero y de su empaquetamiento de forma organizada gracias a un tipo de proteínas específicas conocidas como histonas (94,95).

La modificación oxidativa de ácidos nucleicos es uno de los aspectos más relevantes dentro de las interacciones moleculares de los ROS y las consecuencias biopatológicas del EO. Efectivamente, la oxidación del ADN tiene implicaciones profundas sobre los mecanismos de señalización a través de distintos factores de transcripción génica que controlan la división celular además de sus efectos mutagénicos. Si bien las cuatro bases nucleotídicas en el ADN son susceptibles de ser oxidadas por los ROS, es la guanina la que con mayor frecuencia sufre esta modificación. La oxidación del

carbono en posición C8 de la guanina da lugar a la base modificada y mutagénica 8-oxo-7,8-dihidro-2'deoxiguanosina (8-oxo-dG). Esta modificación induce la transversión de base de GC a TA al inducir a errores por parte de la ADN polimerasa durante la replicación de las cadenas nucleotídicas (96), aumentando la inestabilidad genética y consecuente activación/inhibición de oncogenes y genes supresores de tumores respectivamente (47,48). El grado de EO se ha comprobado estar relacionada con, la inestabilidad genética y el acúmulo de mutaciones genéticas en diversos estudios y modelos experimentales como en el tumor colorrectal humano (97), así como en otro grupo de tumores tanto hematológicos (98–101), como ginecológicos (102), endocrino-metabólicos (103,104) y digestivos (105), donde los niveles elevados de la base modificada y mutagénica 8-oxo-dG, es un factor claramente determinante de su patogenicidad cuando no es debidamente reparada (31,95,106,107).

El interés científico y biomédico por el estudio de esta base mutagénica llevó a la constitución de un consorcio a nivel internacional para el estudio y validación de los métodos idóneos de cuantificación de la 8-oxo-dG y el establecimiento de sus niveles de normalidad en distintos líquidos biológicos humanos (108,109).

También es importante señalar que la frecuencia de impactos lesivos que recibe nuestro material genético está cifrado en 10^5 - 10^6 por célula y por día. Esta cifra aun representando una porción muy reducida del todo el genoma humano, no carece de importancia especialmente porque cuando la oxidación o mutación derivada de ésta, afecta a un oncogén o gen supresor las consecuencias para el

control de la división y crecimiento celular pueden ser graves. Por otra parte, dependiendo de la intensidad de este ataque oxidativo las alteraciones pueden ir desde la mutación puntual hasta la ruptura cromosómica. El conjunto de las modificaciones y consecuencias que a nivel molecular pueden ocurrir en una situación de EO se resumen en la siguiente figura (Figura I-16).

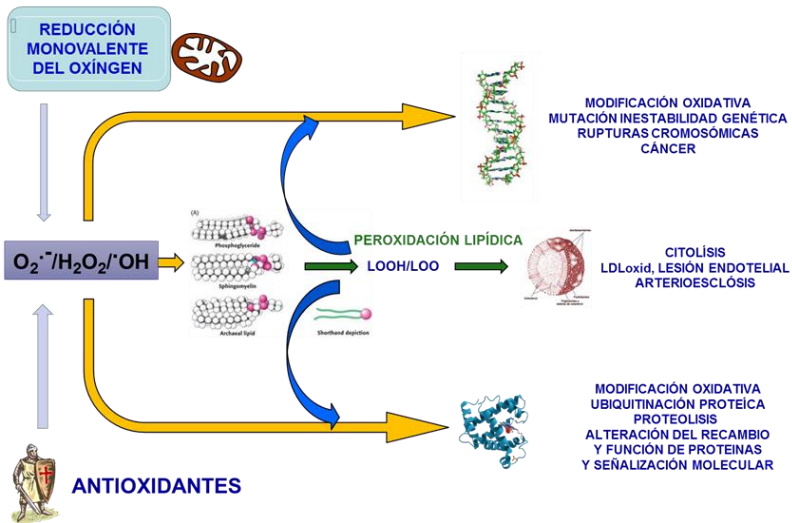


Figura I- 16. Interacciones moleculares de los radicales libres y sus efectos.

7. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS ENFERMEDADES LIGADAS AL ENVEJECIMIENTO.

En la actualidad, se sabe y así se ha podido confirmar a través de múltiples estudios tanto experimentales de observación como epidemiológicos, que el estrés oxidativo subyace e interviene en la evolución de las complicaciones patogénicas de todas y cada uno de los procesos degenerativos propios de la edad avanzada. En parte, este denominador común se debe al proceso inflamatorio que caracteriza a la mayor parte de estas enfermedades entre las que destaca, por su incidencia y prevalencia, las enfermedades cardiovasculares y cardiometabólicas, los procesos neuromusculares y deterioro articular, las alteraciones neurológicas y el cáncer. En todos ellos, sin excepción se han comprobado disfunciones de los sistemas antioxidantes y/o un aumento de los productos de oxidación como consecuencia de un EO que se acentúa inevitablemente con el paso de los años (Figura I-17).

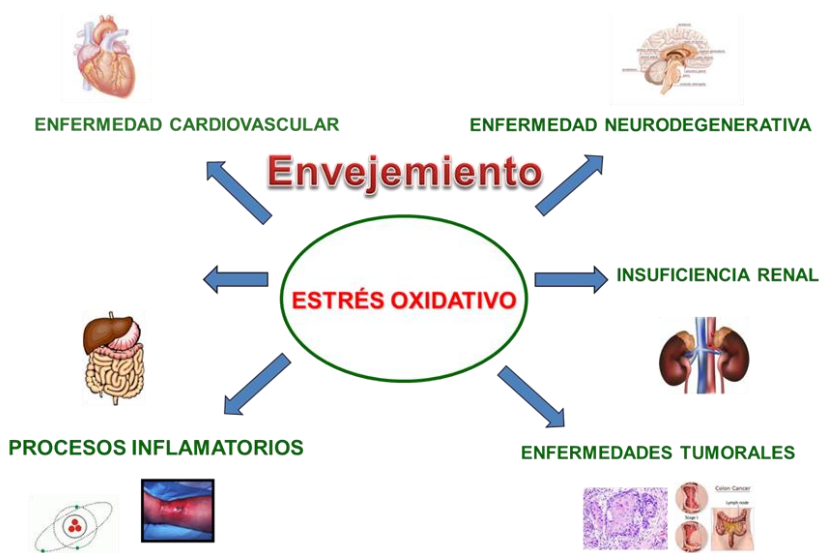


Figura I- 17. Implicaciones fisiopatológicas del estrés oxidativo

De esta manera, queda por ver si el grado de estrés es de la misma intensidad en todos los individuos dentro de una misma franja de edad y que consecuencias o beneficios puede tener para aquellos seres más longevos (110,111).

Este aspecto, de gran y reciente interés, se tratará más adelante. Como ya se ha comentado, no hay que olvidar que las especies reactivas en general y los ROS en particular, en condiciones fisiológicas o controladas desempeñan funciones de regulación homeostática muy importantes para las células.

7.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La evidencia experimental a favor de la participación de los ROS y el EO en las enfermedades cardiovasculares es muy amplia y se conoce desde hace más de dos décadas. En este sentido uno de los procesos más estudiados han sido la arterioesclerosis y la hipertensión arterial. Tanto a través de la inactivación del agente vasodilatador óxido nítrico (NO) por radicales O_2 como por la oxidación de las lipoproteínas LDL, el estrés oxidativo influye en el desarrollo y complicación de las enfermedades cardiovasculares. Efectivamente, el estrés oxidativo está presente en situaciones fisiopatológicas que afectan al sistema cardiocirculatorio tales como el consumo de tabaco, la hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión arterial (45,112).

Distintos modelos experimentales de hipertensión demuestran la existencia de fenómenos oxidativos. La hipertensión espontánea (113), la de origen renovascular (114), la inducida con acetato de desoxicorticosterona (115), o la asociada a la obesidad (116) son algunos ejemplos de la relación existente entre el estrés oxidativo y la disfunción vascular.

El hallazgo de menores actividades antioxidantes y de un aumento de los productos de peroxidación lipídica en la hipertensión apunta hacia una sobreproducción de especies reactivas en estos pacientes (114,117–119).

Estas alteraciones se han demostrado tanto en las células endoteliales como en las células sanguíneas circulantes (120–126).

Un aumento en la producción de radicales de oxígeno e hidroperóxidos en sangre es la causa de la modificación oxidativa de

LDL que son fagocitadas por el sistema retículo endotelial con mayor avidéz que las LDL intactas (123).

Se ha observado que las células sanguíneas de las personas hipertensas presentan concentraciones significativamente más elevadas de 8-oxo-dG tanto en el ADN nuclear como mitocondrial, lo que da cuenta de la intensidad del proceso oxidativo (124). La reducción de las cifras tensionales en estos pacientes normaliza también las concentraciones de los marcadores de estrés oxidativo, siendo este efecto independiente de la estrategia terapéutica utilizada y proporcional al tiempo de tratamiento (125). Cabe destacar, la correlación significativa observada entre el marcador de oxidación (GSSG/GSH) y el grado de lesión orgánica, dada por concentraciones de microalbuminuria, en los pacientes hipertensos (127).

En otro estudio multicéntrico llevado a cabo por el grupo de trabajo AtheroGene, se ha demostrado el papel de la GPx1 como factor independiente de riesgo cardiovascular. La actividad de esta enzima está reducida en los pacientes con antecedentes de angina estable o inestable y el mayor grado de reducción enzimática se corresponde con una mayor probabilidad de complicaciones con aumento de la morbilidad y mortalidad de los pacientes afectados (128).

Se han propuesto otros marcadores de peroxidación y/o lipoproteínas peroxidadas como determinantes de la evolución clínica cardiovascular (129–131).

Por otra parte, la regulación al alza de las enzimas productoras de ROS como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y mieloperoxidasa, junto con la regulación a la baja de las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, se produce durante el envejecimiento. Este desequilibrio puede predisponer a la trombosis potenciando la activación plaquetaria y de la coagulación y provocando una disfunción endotelial. Recientemente, los productos derivados del intestino, como el N-óxido de trimetilamina (TMAO) y el lipopolisacárido, están emergiendo como nuevos factores de riesgo ateroscleróticos y se ha demostrado que la composición de la microbiota intestinal cambia con el envejecimiento y puede coincidir con el aumento del riesgo cardiovascular en los ancianos (132).

Recientemente se han planteado otros aspectos de interés a tener en cuenta en relación con los mecanismos moleculares que vinculan al estrés oxidativo con las enfermedades cardiovasculares. Algunos factores transcripcionales y vías de señalización molecular como P66Sch-SIRT1 que actúan como moduladores del EO tienen un efecto protector contra la enfermedad cardiovascular (133).

También se ha comprobado el papel del citoesqueleto de actina en la función de las células vasculares, como un elemento que cumple funciones mecánicas, organizativas y de señalización. Muchas de las proteínas del citoesqueleto son sensibles a las especies reactivas del oxígeno y la regulación redox se ha convertido en un modulador fundamental del citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas. Los oxidantes alteran las proteínas del citoesqueleto de

actina y estas alteraciones afectan la migración celular, la proliferación y la contracción de las células vasculares, lo que tiene su repercusión en la evolución de las enfermedades del aparato cardiovascular (134).

Como ya se ha mencionado, además de ejercer efectos adversos a nivel de las células vasculares, las especies reactivas de oxígeno ejercen funciones como moléculas de señalización en prácticamente la totalidad de las células del sistema cardiovascular que incluyen a las células endoteliales, musculares lisas, fibroblastos y adipocitos perivasculares (135–137).

En relación con todo lo expuesto, también resulta interesante y representativo de la importancia del EO en la evolución patogénica cardiovascular el hecho de que la intervención dietética con dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva o frutos secos, ambos ricos en antioxidantes, haya resultado muy efectiva en la prevención de eventos cardiovasculares comparado con otras medidas de actuación clásicas como la reducción del contenido graso de la dieta (138).

Este hecho, junto con los descritos anteriormente, vincula todavía más el papel de las modificaciones oxidativas con la patogenicidad de las enfermedades cardiovasculares.

7.2. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Si bien la totalidad de las células aeróbicas son susceptibles de sufrir los efectos del EO, el cerebro de los mamíferos es todavía más vulnerable a la acción nociva de los ROS. Una de las razones es su alto consumo de oxígeno. En los humanos el cerebro representa una fracción reducida del peso corporal, sin embargo, su consumo de oxígeno es aproximadamente el 20% del total. El contenido de oxígeno por unidad de masa tisular es, por lo tanto, muy alta.

El cerebro adulto contiene entre 10^{11} a 10^{12} células nerviosas (neuronas), mantenidas y protegidas por un número muy superior de otras células conocidas como glía. Estas últimas desempeñan funciones de gran importancia como soporte a las funciones de las neuronas y a la fisiología en el sistema nervioso. En términos generales se asume que las neuronas están más expuestas que la glía al EO y que este fenómeno también afecta a las células de la barrera hematoencefálica.

Como se deduce del alto consumo de oxígeno del cerebro, su metabolismo energético es muy activo. La mayor parte del oxígeno que llega a las células neuronales se utiliza para su reducción tetravalente y síntesis de moléculas de ATP necesarias para mantener el gradiente iónico (concentración elevada de K^+ , baja de Na^+ y muy reducida de Ca^{++}). La bomba de Na^+/K^+ -ATPasa, es la encargada de captar y bombear posteriormente los iones Na^+ para el correcto mantenimiento de la transmisión nerviosa.

Las causas y mecanismos que hacen del cerebro un tejido especialmente susceptible a la impronta de las especies reactivas son numerosos y variados, tanto desde el punto de vista bioquímico, molecular como fisiológico. El estrés oxidativo (EO) es, como se ha señalado, uno de los factores predisponentes en las alteraciones neurobiológicas. Existen estudios que relacionan la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, la esclerosis múltiple, etc con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) asociadas con disfunción mitocondrial. La peroxidación lipídica puede causar la alteración de la membrana celular hasta llegar a su destrucción; los marcadores precoces y tardíos de la peroxidación lipídica incluyen los aductos de hexanoil —lisina (HEL), acroleína— lisina (ACR) y 4-8 hidroxinonenal (4-HNE).

El daño oxidativo del ADN y ARN produce 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxo-dG) y 8-hidroxiguanina (8-oxo-dGo), respectivamente, los cuales son considerados como marcadores de elección en la valoración EO y su poder mutagénico es muy elevado.

El daño oxidativo de estas biomoléculas puede contribuir a la pérdida de función o a la exacerbación del daño. El cerebro, como hemos apuntado, es particularmente susceptible al daño oxidativo por su elevada velocidad de consumo de oxígeno, por su alta demanda de energía, gran abundancia de ácidos grasos poliinsaturados y lípidos y su relativa capacidad antioxidante respecto a otros órganos.

Generalmente, el 2% del oxígeno consumido por las células durante la fosforilación oxidativa se convierte en ROS sin embargo, este debe ser mayor en los sujetos con deficiente fosforilación oxidativa como es el caso de la enfermedad de Alzheimer sugiriendo que el daño oxidativo puede ser un hecho precoz en la patogenia de esta enfermedad (139).

La estrecha relación existente entre el EO y el desarrollo y/o evolución de las enfermedades neurodegenerativas ha dado lugar, como en otros procesos fisiopatológicos asociados, a plantear el potencial uso y utilidad de los antioxidantes como factores preventivos y eficaces en el retraso de los síntomas neurodegenerativos. Efectivamente, siendo el EO una característica patológica común a una multitud de enfermedades neurológicas, los antioxidantes se han considerado como agentes terapéuticos potenciales atractivos para contrarrestar el daño neuronal mediado por ROS. Sin embargo, a pesar de alentar los datos in vitro y preclínicos in vivo, la eficacia clínica de las estrategias de tratamiento antioxidante es marginal y la mayoría de los ensayos clínicos que utilizan antioxidantes como agentes terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas han arrojado resultados algo decepcionantes. Esto podría deberse en parte a la necesidad de ajustar las concentraciones y los parámetros de tiempo entre los estudios preclínicos y los entornos clínicos. Además, es necesario investigar nuevos métodos de administración eficaces, particularmente teniendo en cuenta que un agente terapéutico exitoso para enfermedades neurológicas debe cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE). En ese sentido, el uso de compuestos que cruzan la BHE y potencian la maquinaria de defensa antioxidante endógena activando, por ejemplo, la vía Nrf2 o bien compuestos

capaces de modular la producción de ROS, como los inhibidores de la enzima NOX, se presentan como una estrategia más prometedora para combatir el estrés oxidativo en el sistema nervioso central (SNC). Carvalho AN et al en su reciente trabajo de revisión hacen una breve descripción de los principales protagonistas oxidativos y su participación en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la esclerosis múltiple, analizando críticamente el potencial de los antioxidantes como agentes terapéuticos para los trastornos del sistema nervioso central como nuevas estrategias terapéuticas emergentes (140).

7.3. TRASTORNOS NEUROMUSCULARES

El músculo esquelético es un sitio importante de actividad metabólica y es el tejido más abundante en el cuerpo humano. La atrofia muscular relacionada con la edad (sarcopenia) y la debilidad, que se caracterizan por la pérdida progresiva de la masa y la función del músculo magro, son un importante contribuyente a la morbilidad y tienen un profundo efecto en la calidad de vida de las personas mayores. Con una población de adultos mayores en continuo crecimiento (se estima que dos mil millones de personas mayores de 60 años para 2050), la demanda de atención médica y social debido a déficits funcionales, asociados con el envejecimiento neuromuscular, aumentará inevitablemente. A pesar de la importancia de este problema "epidémico", los principales mecanismos bioquímicos y moleculares subyacentes a los déficits relacionados con la edad en la integridad y función neuromuscular no han sido completamente determinados. El músculo esquelético genera especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) de una variedad de fuentes subcelulares, y se ha sugerido que el daño oxidativo asociado a la edad es un factor importante que contribuye al inicio y la progresión de la atrofia muscular inherente al envejecimiento. Los RONS puede modular una variedad de procesos de transducción de señales intracelulares, y la interrupción de estos eventos en el tiempo debido al control redox alterado se ha propuesto como un mecanismo subyacente del envejecimiento. El papel de los oxidantes en el envejecimiento ha sido ampliamente examinado en diferentes organismos modelo que han sido sometidos a manipulaciones genéticas con hallazgos inconsistentes. Los estudios de roedores transgénicos y knockout han

proporcionado información sobre la función de los sistemas reguladores de RONS en el envejecimiento neuromuscular (141).

La pérdida de masa y función del músculo esquelético relacionada con la edad contribuye de manera clave a la fragilidad física en individuos mayores y nuestra comprensión actual de las áreas clave en las que ROS contribuye a los déficits relacionados con la edad en el músculo parece indicar que las señales redox defectuosas ejercen un papel clave en el mantenimiento integridad neuromuscular. Los ROS estimulan las adaptaciones a la actividad contráctil en el músculo que incluyen, entre otras, la regulación positiva de las respuestas de estrés a corto plazo, un aumento en la biogénesis mitocondrial y un aumento en algunos procesos catabólicos. Estas adaptaciones ocurren a través de la estimulación de procesos regulados por cambios en el equilibrio redox que conducen a la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B, AP-1 y HSF1 que median los cambios en la expresión génica. Estos tipos de adaptación reguladora se atenúan durante el envejecimiento y parece estar relacionado con un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno a nivel mitocondrial relacionado con la edad. Existe una comunicación recíproca mediada por redox entre las neuronas motoras y el músculo donde los ROS liberados por las fibras musculares durante el ejercicio contribuyen a mantener la integridad de los axones. Los cambios degenerativos en la estructura neuromuscular que ocurren con el envejecimiento parece ser el mecanismo por el cual la mitocondrial es de las fibras musculares que generan mayor cantidad de ROS (142).

7.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER

Hoy en día, el cáncer puede considerarse una enfermedad relacionada con la edad, ya que la incidencia de la mayoría de los cánceres aumenta con la edad, aumentando más rápidamente a partir de la mitad de la vida. Aunque los adultos con longevidad prolongada son menos propensos a desarrollar cáncer, en la actualidad se está observando que el envejecimiento y el cáncer comparten vínculos moleculares comunes, por lo que estos mecanismos pueden ser adecuados tanto para tratar trastornos múltiples como para prolongar el envejecimiento saludable.

La edad es un poderoso factor de riesgo para el cáncer y se plantean diversos mecanismos para explicar el aumento exponencial en la mayoría de los neoplasmas en los ancianos, basándose en distintas investigaciones que demuestran que la progresión tumoral es más rápida en ratones mayores y personas mayores que en ratones más jóvenes y personas más jóvenes. Tres procesos que alteran la tasa de envejecimiento, como la especiación, la restricción calórica y la reproducción selectiva, tienen efectos paralelos sobre la incidencia del cáncer. Esto sugiere que los dos procesos, cáncer y envejecimiento, están íntimamente conectados. El conocimiento de los mecanismos por los cuales el proceso de envejecimiento controla la tasa de desarrollo de tumores merece ser un área de investigación prioritaria en la oncología experimental y clínica (143).

No cabe duda de que, entre las múltiples hipótesis emitidas, el papel de los radicales libres ocupa un lugar predominante y aceptado de forma más unánime (47,48).

Esta asunción se basa en distintos hechos experimentales que a lo largo de los años han demostrado el papel del EO en el proceso de la carcinogénesis donde se sabe que los ROS actúan tanto como iniciadores como promotores del proceso tumoral a través de la activación de distintos oncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumores (144–146).

El grupo de Bruce Ames, en la Universidad de Berkeley en California fue el primero en establecer la frecuencia de impactos lesivos que sufre material genético de distintas células animales concluyendo, entonces, que se trataba de un nivel muy alto de lesiones oxidativas y que éstas ocurrían durante el metabolismo normal de estas células. En cada célula de rata, el nivel en el estado estacionario de este daño se estima en aproximadamente 10^6 aductos oxidativos, llegándose a formar aproximadamente 10^5 nuevos aductos diariamente. Este daño endógeno del ADN parece ser un importante contribuyente al envejecimiento y a las enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento, como el cáncer. La tasa de daño oxidativo en especies de mamíferos con una tasa metabólica alta, de expectativa de vida corta y una tasa específica de cáncer por edad elevada como es el caso de las ratas es mucho mayor que esa misma tasa en humanos, mamíferos de larga vida con una tasa metabólica más baja y una menor tasa específica de cáncer. Los estudios epidemiológicos y de investigación básica sobre los mecanismos de la carcinogénesis apuntan a la mitogénesis como un importante contribuyente al cáncer. Las células en división, en comparación con las células que no se dividen, tienen un riesgo enormemente aumentado de mutaciones, en parte debido a la conversión de aductos de ADN en mutaciones. La mitogénesis también aumenta la probabilidad de amplificación génica y pérdida de 5-metilcitosina. Las

intervenciones dietéticas que disminuyen la mitogénesis, como la restricción calórica, se ha visto efectiva como mecanismo para disminución de la incidencia del cáncer (147).

Como es bien conocido, el cáncer en humanos y animales es un proceso de enfermedad de múltiples pasos o etapas de transformación celular. En este proceso, una sola célula puede desarrollarse desde un tejido normal hasta convertirse en una entidad maligna que eventualmente puede llegar a destruir el organismo. La compleja serie de cambios celulares y moleculares que ocurren a través del desarrollo de cánceres puede estar mediada por una diversidad de estímulos endógenos y ambientales. Se sabe desde hace mucho tiempo que las especies de oxígeno activo y otros radicales libres son mutagénicos (47,143,148) además, estos agentes han surgido más recientemente como mediadores de otros cambios fenotípicos y genotípicos que conducen desde la mutación hasta la neoplasia.

El potencial mutagénico de los ROS reside en los apareamientos incorrectos de bases nucleotídicas que puede acontecer como consecuencia de la reparación incorrecta de sus lesiones oxidativas. Como ya se ha comentado, las cuatro bases nucleotídicas que componen las cadenas de ADN mediante enlaces fosfodiéster y enfrentadas entre sí por puentes de hidrógeno, pueden ser modificadas por radiaciones ionizantes o por diferentes especies reactivas. Sin embargo, los estudios experimentales que se han llevado a cabo coinciden en la mayor susceptibilidad y por lo tanto frecuencia de lesiones oxidativas que afectan y se encuentran habitualmente en la guanina. De ahí, su importancia como marcador de estrés oxidativo y de la carcinogénesis. Dentro de las especies reactivas de oxígeno la que más fácilmente difunde a través de las

membranas celulares es el peróxido de hidrógeno si bien su poder oxidante, al no poseer electrones desapareados, se debe más bien a la formación de la especie radicalaria $\bullet\text{OH}$ que se forma, a través de la reacción de Fenton, en la proximidad de las cadenas de ácidos nucleicos hasta donde llega el H_2O_2 y donde se encuentra con un medio con disponibilidad de metales de transición.

El resultado es la oxidación del carbono 8 del anillo de la guanina para formar 8-oxo-dG. Esta base, en condiciones normales, es rápidamente reparada por las proteínas específicas glicosilasas, en los humanos conocida la 8-oxoguanina-DNA glicosilasa (hOGG1) (149).

Se trata de un mecanismo complejo de actuación en el que intervienen múltiples factores transcripcionales y señalizaciones moleculares bajo el control de la proteína supresora de tumores p53 (150).

La hOGG1 rompe el enlace glucosídico entre la guanina oxidada y la estructura de 2-desoxirribosa que se separa de la cadena nucleotídica dejando un lugar abásico en dicha estructura para su reposición por otra molécula de guanina no oxidada. La 8-oxo-dG separada del ADN pasa al torrente circulatorio y, sin más modificación metabólica se elimina concentrada por la orina (Figura I-18).

Este mecanismo es de extraordinaria importancia ya que la reparación correcta de 8-oxo-dG evita la incorporación y apareamiento incorrecto de bases nucleotídicas durante la replicación del ADN (96).

Distintos investigadores, pudieron dilucidar el mecanismo de este apareamiento erróneo debido a cambios conformacionales de la cadena de ADN inducidos por la presencia de 8-oxo-dG utilizando técnicas de resonancia nuclear magnética (151,152).

Como ya se ha comentado, y debido al metabolismo oxidativo característico de la células neoplásicas, se ha podido comprobar que los tumores presentan niveles muy elevados de 8-oxo-dG en comparación con las células normales (97–102,105), y ésta se elimina con efectividad alcanzando altas concentraciones urinarias, lo que se ha utilizado para proponer a este metabolito como un marcador tumoral (105), del riesgo de padecer cáncer y como predictor de la evolución clínica de distintos procesos neoplásicos que afectan a distintos tejidos y sistemas orgánicos (153–161).

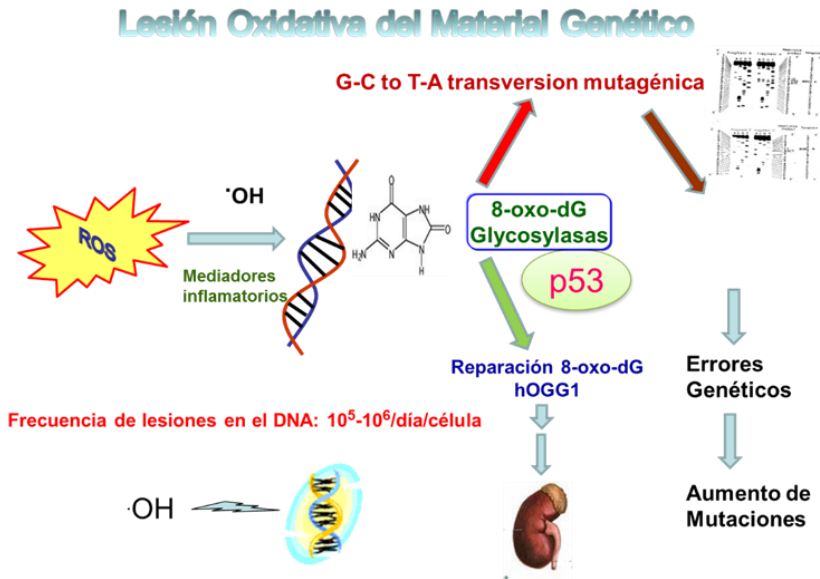


Figura I- 18. Oxidación, reparación y eliminación de 8-oxo-dG

8. PRODUCTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DEL ENVEJECIMIENTO

Durante toda la vida, un ser humano se enfrenta al EO de forma continuada y progresiva. Para medir cómo evoluciona este EO durante el proceso de envejecimiento y cómo cambia el metabolismo celular, se han propuesto varias sustancias que se han pronunciado como biomarcadores y que incluyen productos de peroxidación lipídica (LPO), productos de oxidación de proteínas, enzimas de acción antioxidante, minerales, vitaminas, glutatión, flavonoides, bilirrubina y ácido úrico entre otros. Sin embargo, ninguno de ellos podría ser considerado como único e idóneo y que fuera aceptado como tal por toda la comunidad científica para determinar la esperanza de vida de la persona individual, su edad biológica o el estado de salud relacionado con la edad. Además, hay muchos datos contradictorios sobre los cambios de cada biomarcador individual durante el proceso de envejecimiento. Hay tantas influencias diferentes que actúan sobre la concentración o actividad de las distintas moléculas o enzimas individuales que no es posible medir solo un marcador clínico para determinar el estado de salud de un individuo o predecir la esperanza de vida de la persona correspondiente. Por lo tanto, siempre se debe usar un conjunto o patrón de biomarcadores clínicos para determinar el estado de oxidación de un individuo. Se ha propuesto que este conjunto de biomarcadores debe incluir al menos un marcador de LPO, de oxidación de la proteína y del estado antioxidativo total, e idealmente también uno para los daños en el ADN (162).

Hacer una revisión exhaustiva y completa de todos estos metabolitos y productos de oxidación como candidatos para valorar el

estado biológico y su valor como marcadores del envejecimiento sería una labor más allá del objetivo de esa introducción, por lo que nos centraremos en aquellos que han mostrado ser los más relevantes. No obstante, un estudio integral del EO a nivel sistémico, incluyendo los diferentes marcadores moleculares de oxidación y niveles de enzimas antioxidantes en distintas etapas del envejecimiento no se ha llevado a cabo.

8.1. OXIDACIÓN Y MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La modificación oxidativa de proteínas es, sin duda, uno de los aspectos más estudiados y caracterizados dentro del estudio del EO, que más se ajusta a esta pretensión de servir como marcador biológico del envejecimiento. Existen múltiples ejemplos y datos, experimentales y clínicos, que así lo confirman. Unos de estos ejemplos es la propia glicosilación de proteínas como la hemoglobina y otras que se han visto implicadas en trastornos metabólicos y degenerativos, como la diabetes mellitus o las cataratas.

Los disulfuros mixtos de proteína y tioles en el cristalino se han implicado en el mecanismo formación de puentes de disulfuro entre proteínas y otros entrecruzamientos que conducen a su agregación. El examen de los disulfuros mixtos en diferentes etapas durante el desarrollo de una catarata ha servido para proporcionar información relevante sobre el mecanismo de cataratogénesis, y el papel del EO en este mecanismo. Así ha sido constatado mediante la exposición de cristalinos a concentraciones de H₂O₂ como modelo experimental de caratogénesis de la rata, donde se encontró una relación inversa entre la pérdida de GSH y la formación de proteína-GSH sin efecto sobre el

nivel de proteína-cisteína. Se comprobó que a medida que el animal envejece, disminuye la concentración de GSH y aumenta la de disulfuros mixtos proteicos. Las lentes de las ratas más viejas no mostraron más susceptibilidad a la formación de disulfuro mixto inducida por H_2O_2 (163).

No obstante, tal y como se viene afirmando cada vez más, existen algunos aspectos a tener en cuenta sobre el papel de estas modificaciones que afectan a las proteínas. En numerosos casos, estas modificaciones dan como resultado la pérdida irreversible de la función. Los pro-oxidantes, sin embargo, también son capaces de catalizar modificaciones completamente reversibles de la proteína. Cada vez es más evidente que estas reacciones participan en la regulación dependiente de redox del metabolismo celular y la respuesta al estrés. La elucidación de los mecanismos por los cuales se controlan los procesos oxidativos reversibles, los componentes involucrados y las consecuencias metabólicas y cómo se alteran con la edad proporcionarán una nueva percepción del proceso de envejecimiento (164).

Existen muchos productos y formas moleculares como consecuencia de la oxidación de proteínas y sus interacciones y éstas tienen diversas consecuencias sobre los cambios metabólicos e implicaciones clínicas con aquellos procesos patológicos que surgen con el envejecimiento. Varios sistemas que generan radicales libres catalizan la modificación oxidativa de proteínas en dos especies: peróxidos proteicos, que pueden consumir importantes antioxidantes; y restos reductores unidos a proteínas, que pueden reducir los metales de transición, y pueden potenciar su actividad en reacciones que implican radicales libres. La oxidación de proteínas también contribuye a la acumulación de enzimas dañadas y a la acumulación de proteínas

anormales y dañadas, que aumenta durante el envejecimiento y en diversos estados patológicos, como la aterosclerosis, el cáncer (165).

Uno de los productos más frecuentes y estudiados son las modificaciones de algunos aminoácidos y formación de grupos carbonilos que también se han visto elevados en distintos procesos neurodegenerativos propios del envejecimiento. Se ha propuesto que la acumulación de proteína oxidada desempeña un papel crítico en el envejecimiento del cerebro. El contenido de proteína carbonilo en las mitocondrias sinápticas mostró una correlación positivamente significativa con la edad ($r = 0.95$, $P = 0.01$). Además, los autores observaron una relación lineal inversa entre el contenido de proteína carbonilo y la relación del complejo IV / complejo I (que se utilizó como un índice de desequilibrio entre los complejos respiratorios mitocondriales) en las mitocondrias sinápticas en los cinco grupos de edad ($r = -0.99$, $P < 0.001$). Los resultados encontrados sugieren que la acumulación de proteínas oxidadas relacionada con la edad en las mitocondrias sinápticas puede ser el resultado de un aumento en la generación de ROS debido a un desajuste de la fosforilación oxidativa mitocondrial (166).

Otros productos y consecuencias de modificación en las proteínas, además de los grupos carbonilos proteicos, como la pérdida de grupos tiolicos, ditirosina y nitrotirosina, y formación de isoaspartato también se pueden usar como biomarcadores para la evaluación del estrés oxidativo durante el envejecimiento y / o la enfermedad (167).

La modificación de proteínas por especies reactivas tiene además consecuencias importantes para el metabolismo de éstas y su función biológica. Muchos de los residuos modificados sirven como señalizadores moleculares y tienen diversas respuestas celulares.

Entre estas destaca la activación del proteasoma y proteólisis que alteran el recambio proteico, y por lo tanto la concentración y actividad de las proteínas afectadas. La evidencia actual permite relacionar los efectos oxidativos de los ROS con las alteraciones funcionales en el sistema lisosomal y el proteasoma, dos vías principales por las cuales las proteínas se degradan dentro de las células (168).

La oxidación de proteínas enzimáticas sirve como marca o señal para su degradación por proteasas alcalinas citosólicas neutras. La oxidación de proteínas contribuye a la acumulación de enzimas dañadas, que aumenta de tamaño durante el envejecimiento y en diversos estados patológicos. El aumento relacionado con la edad en las cantidades de proteína oxidada puede reflejar la acumulación dependiente de la edad del daño irreparable del ADN que, de forma aleatoria, afecta las concentraciones o actividades de numerosos factores que rigen las tasas de oxidación de proteínas y la degradación de proteínas oxidadas (169).

Durante el envejecimiento, varias enzimas se acumulan como formas catalíticamente inactivas o menos activas. Los cambios relacionados con la edad en la actividad catalítica se deben en parte a reacciones de la proteína con especies de oxígeno "activo" como ozono, oxígeno singlete o con radicales libres de oxígeno como se producen durante la exposición a radiación ionizante o a la oxidación catalizada por iones metálicos. Los niveles de proteínas oxidadas en fibroblastos humanos cultivados de individuos de diversas edades y en extractos de hígado y cerebro de ratas de diferentes edades aumentan progresivamente con la edad, y en ratas viejas pueden representar 30-50% de la proteína celular total. El aumento relacionado con la edad de la proteína oxidada en el hígado y el tejido cerebral de la rata se

acompaña de una pérdida de las actividades enzimáticas como glutamina sintetasa (GS) y glucosa-6-P deshidrogenasa (G-6-PDH) y de proteasa neutra que es responsable de la degradación de la proteína oxidada (desnaturalizada). De particular importancia son los resultados de los experimentos que muestran que se producen cambios similares relacionados con la edad en el cerebro del jerbo y que estos cambios se acompañan de una pérdida de la memoria a corto plazo medida por la técnica del laberinto del brazo radial. El tratamiento crónico (inyecciones intraperitoneales) de animales viejos con el reactivo quelante de espín de radical libre, N-terc-butil-alfa-fenilnitrona (PBN) dio como resultado la normalización de diversos parámetros bioquímicos a los característicos de los animales jóvenes; casualmente, el índice de memoria a corto plazo se restauró a los valores de los animales jóvenes. Estos resultados sugieren que exista un vínculo entre la acumulación dependiente de la edad de las enzimas oxidadas y la pérdida de la función fisiológica (170).

Se ha comprobado un aumento de proteínas oxidadas en muchos modelos experimentales de envejecimiento, medido por el nivel de carbonilos proteicos intracelulares o ditirosina, o por la acumulación de pigmentos que contienen proteínas tales como lipofuscina y cuerpos ceroides. En individuos más jóvenes, las proteínas celulares solubles moderadamente oxidadas parecen ser reconocidas selectivamente y rápidamente degradadas por el proteosoma. Este aumento de proteínas oxidadas relacionado con la edad se ha atribuido a una actividad decreciente del proteosoma. Sin embargo, algunas investigaciones en esta misma línea, tratando de demostrar un declive edad dependiente en el contenido y/o la actividad del proteosoma han generado resultados contradictorios. La evidencia más reciente indica que la actividad del proteosoma, de hecho,

disminuye durante el envejecimiento a medida que el complejo enzimático se inhibe progresivamente por los agregados de proteínas oxidadas y reticuladas. Estos hallazgos han servido para proponer que el envejecimiento celular implica un aumento en la producción de oxidantes (mitocondriales) y una disminución progresiva en la actividad del proteosoma. La inactivación progresiva del proteosoma es tal que las proteínas oxidadas comienzan a acumularse rápidamente y contribuyen a la disfunción y senescencia celular (171–173).

8.2. PEROXIDACION DE LÍPIDOS

Como se vio en el apartado de interacciones moleculares de los ROS y los productos de oxidación que caracteriza al EO, la oxidación de lípidos por especies reactivas (peroxidación) es un mecanismo muy conocido y caracterizado desde el punto de vista tanto bioquímico como molecular cuyas implicaciones biológicas y fisiopatológicas están también muy definidas. La peroxidación de los lípidos tiene como diana molecular las estructuras diénicas o triénicas de los ácidos grasos desaturados de los fosfolípidos. Este mecanismo de oxidación espontánea genera un número variado de estructuras lipídicas como peróxidos e hidroperóxidos, algunas de las cuales pueden llegar a ser muy tóxicas e incluso mutagénicas. Los peróxidos son moléculas muy inestables que siguen distintas reacciones dando lugar a aldehídos y cetonas. Estos productos de sabor amargo son precisamente los que le confieren la palatabilidad tan característica en el enranciamiento de frutos secos y otros alimentos grasos.

Uno de los productos de peroxidación más caracterizado y relacionado con el envejecimiento es la lipofuscina.

También conocido como *pigmento de desgaste*, es un producto metabólico de color pardo-amarillento con fluorescencia propia, compuesto por polímero de lípidos y fosfolípidos, derivados de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados de las membranas subcelulares. Su importancia radica en que es un signo de vejez celular originado por la acción de los radicales libres. Es normal y no patológico observar estos pigmentos en preparaciones histológicas de tejido cardíaco (en el cono sarcoplásmico de la fibra muscular), en el hígado y tejido neuronal (en el soma de las neuronas), ya que estas células carecen de capacidad para regenerarse debido a su alto grado de especialización. En pacientes de edad avanzada la lipofuscina torna las vísceras de color pardo y disminuye su volumen, un proceso degenerativo que se conoce como atrofia parda (174).

Hace años se comprobó que la peroxidación lipídica de orgánulos subcelulares da lugar a productos fluorescentes que tienen espectros de fluorescencia y excitación similares a los de los pigmentos de lipofuscina (175).

Efectivamente el EO es un factor causal tanto en la lipofuscínogénesis y además estrechamente relacionado con el envejecimiento. Los estudios sobre los efectos de los pro-oxidantes y antioxidantes en la acumulación de lipofuscina en miocitos cardíacos de ratas cultivadas y células gliales humanas indicaron que los pro-oxidantes se aceleran mientras que los antioxidantes retardan la tasa de acumulación de lipofuscina. Los estudios in vivo en mamíferos en hibernación y en insectos demostraron que existe una relación significativa entre la tasa de lipofuscina, la esperanza de vida de esos animales y su actividad metabólica. Se comprobó que el aumento en la tasa metabólica se correlaciona con un aumento de la tasa de peroxidación de lípidos, medida por el contenido de n-pentano

exhalado in vivo. En general, parece que hay suficiente evidencia disponible para inferir razonablemente que la lipofuscina puede usarse como un marcador del estrés oxidativo y el envejecimiento (176).

Algunos estudios, utilizando la valoración de malondialdehído (MDA) han observado una correlación directa entre el aumento de su concentración y la edad de los animales o células en las que este metabolito fue estudiado, llegándose a proponer como un posible marcador de envejecimiento y procesos asociados (177).

La relación entre la concentración de MDA y la edad de los animales parece estar relacionada también y depender de los niveles tisulares del antioxidante GSH (178).

Como ya hemos comentado, la variabilidad de los distintos productos de peroxidación lipídica es muy amplia. Entre ellos el hidróxido de nonenal es uno de los metabolitos derivados más importantes. El 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), uno de los mayores aldehídos α , β -insaturados producidos durante la peroxidación lipídica, es un potente mensajero en las vías mediadoras de señalización molecular. La peroxidación lipídica y la producción de HNE parecen aumentar con el envejecimiento. Aunque la relación de causa y efecto sigue siendo discutible, el envejecimiento se asocia con cambios significativos en diversos eventos de señalización, caracterizados por respuestas aumentadas o disminuidas de vías de señalización específicas. En una reciente revisión se ha expuesto y discutido como el HNE puede contribuir a las alteraciones relacionadas con el envejecimiento de las vías de señalización (179).

La peroxidación de la bicapa lipídica es una de las principales fuentes de lesión de las neuronas provocando una mayor rigidez de la

membrana, la disminución de la actividad de las enzimas unidas a la membrana, el deterioro de los receptores de membrana, la permeabilidad de la membrana alterada y la eventual muerte celular. La toxicidad de HNE se debe principalmente a las alteraciones de las funciones celulares por la formación de aductos covalentes de HNE con proteínas que se ha visto elevado en tejidos cerebrales y fluidos corporales de pacientes con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y sujetos con esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. Aunque solo se identificaron unas pocas proteínas como dianas comunes de la modificación HNE, en todos estos trastornos, se produce una gran superposición de estas proteínas con respecto a la alteración de vías comunes, como el metabolismo de la glucosa o la función mitocondrial que contribuyen al deterioro cognitivo. A pesar de los diferentes mecanismos etiológicos y patológicos que conducen a la aparición de diferentes enfermedades neurodegenerativas, la formación de aductos de HNE-proteína podría representar mecanismo común compartido, de lesión cerebral, de la clínica específica y el declive cognitivo del rendimiento observado en cada caso (180).

En la interacción entre los productos de peroxidación y proteínas destaca por su relevancia clínica las lipoproteínas de baja densidad cuya configuración oxidada (LDLox) se ha convertido en un marcador de envejecimiento del aparato cardiovascular (123,181), a través del proceso de arterioesclerosis, dando con ello una visión más avanzada de la hipótesis pionera y originalmente propuesta por el joven investigador Nikolai N. Anitschkow y su estudiante S. Chalатов publicada en 1913 (182,183).

8.3. OXIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Por su importancia como marcador de EO e implicaciones fisiopatológicas, los productos de oxidación de los ácidos nucleicos ocupan un papel destacado como posibles marcadores biológicos del envejecimiento. Y entre ellos, la 8-oxo-dG se destaca como metabolito prominente. Es una hipótesis bien establecida que la acumulación de daños en el ADN nuclear y mitocondrial con el tiempo causa una disminución gradual en la función celular. Estas lesiones oxidativas del material genético se han relacionado con los procesos degenerativos asociados a las edades avanzadas, incluyendo disfunciones de tejidos y órganos, carcinogénesis, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades cardiovasculares y el propio proceso de envejecimiento (25,77–81); sin embargo, el mecanismo a nivel bioquímico y molecular no se conoce con exactitud (184).

Una de las primeras investigaciones en las que se demostraba la tasa de lesiones genéticas en relación con la edad y/o longevidad de animales se llevaron a cabo por Hart RW en 1978 al señalar a la diferente expresión de los sistemas de reparación como factor determinante (185).

En 1984, su grupo, comparando dos estirpes de ratones con longevidades llegaron a la conclusión de que la lesión del ADN no se acumulaba en el cerebro de estas especies, que esta lesión era más pronunciada en el hígado que en otros tejidos y que la velocidad de lesiones acumuladas en el ADN en el tejido hepático y renal dependiente de la edad era mayor en el ratón con menor longevidad (M. músculus) (186).

Unos años después el grupo de Bruce Ames, examinó y correlacionó los niveles de 8-oxo-dG con la edad en varios tejidos de la rata comprobando que los niveles de este metabolito aumentaban progresivamente a medida que el animal iba envejeciendo (187).

La oxidación del ADN y su importancia homeostática se ha estudiado de forma individual en distintos tejidos y con diferentes formas para su cuantificación. Si el daño genético se acumula más rápido de lo que los sistemas celulares pueden repararlo, una célula eventualmente se volverá defectuosa para mantener la homeostasis. Esta situación es particularmente grave para las células que no se dividen después de haberse diferenciado a sus formas terminales, como por ejemplo es el caso de las células del músculo cardíaco. Haciendo uso de la técnica de marcaje con fósforo 32 (³²P) para medir el nivel relativo de nucleótidos modificados en el ADN miocárdico de ratón en función de la edad se comprobó que este nucleótido modificado aumenta aproximadamente 9 veces en el ADN del corazón entre 2 meses y 39 meses. Estos resultados sugieren que el nivel de estado estable de este tipo de daño genómico es muy elevado en tejido de corazón de ratón senescente (188).

Estudios posteriores apuntaban hacia el ADN mitocondrial como diana de los ROS dependiente de la edad y su relación con las enfermedades neurodegenerativas asociadas. Se examinó el daño oxidativo tanto en el ADN nuclear (ADNn) como en el ADN mitocondrial (ADNmt) en el tejido cerebral cuantificando el nucleósido oxidado, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (OH8dG), en el ADN aislado de 3 regiones de la corteza cerebral y el cerebelo de 10 humanos normales de entre 42 y 97 años. La cantidad de OH8dG, aumentaba progresivamente con el envejecimiento normal tanto en ADNn como en ADNmt; sin embargo, la tasa de aumento con la edad fue mucho mayor en el

ADNmt. Hubo un aumento significativo de 10 veces en la cantidad de OH8dG en el ADNmt en comparación con ADNn en todo el grupo de muestras, y un aumento 15 veces mayor en pacientes mayores de 70 años. Estos resultados muestran por primera vez que hay una acumulación progresiva relacionada con la edad en el daño oxidativo del ADN en el cerebro humano, y que el ADN mitocondrial se ve afectado de forma preferencial(189).

El papel de la oxidación del ADN mitocondrial durante el envejecimiento y su relación con la génesis de enfermedades que lo caracterizan se puso de manifiesto por varios autores apoyando la teoría del estrés oxidativo mitocondrial de Jaime Miquel (19).

Las enzimas respiratorias que contienen las subunidades proteicas defectuosas codificadas por ADNmt exhiben una función de transporte de electrones alterada y de ese modo aumentan la pérdida de electrones y la producción de ROS, que a su vez elevan el estrés oxidativo y el daño oxidativo a las mitocondrias. Este círculo vicioso opera en diversas células de tejido a diferentes velocidades y conduce a la acumulación diferencial de ADNmt mutantes y modificados oxidativamente. Esto puede explicar la diferencia en el deterioro funcional y el deterioro estructural de diferentes órganos y tejidos en el envejecimiento humano (190).

Las concentraciones de 8-oxo-7,8-dihidrodeoxiguanosina (8-oxo-dG) y 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG), derivadas de ADN y ARN, respectivamente, se vieron que aumentaban con la edad en los leucocitos de mono Macaca Mulatta. La medición de las formas libres de guanosina oxidada reveló aumentos similares dependientes de la edad de 8-oxo-dG y 8-oxoG tanto en plasma como en orina, siendo la concentración de 8-oxoG mayor que la de 8-oxo-dG. El contenido de

8-oxoG de la orina se ha propuesto como un biomarcador útil para evaluar el envejecimiento (191).

La relación entre el daño oxidativo de los ácidos nucleicos y el envejecimiento fue investigada por este mismo grupo de autores. Analizando los ácidos nucleicos derivados de diversas muestras de tejido de ratas Sprague-Dawley (SD) de edad natural se observó un aumento dependiente de la edad en el daño oxidativo del ADN y el ARN en los diversos órganos examinados, incluidos el cerebro, el hígado, los riñones y los testículos. Se observaron aumentos similares en los contenidos de 8-oxo-dG y 8-oxo-G en el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo. Cuando los metabolitos de guanosina oxidada se cuantificaron en la orina, se observó un aumento similar dependiente de la edad tanto para 8-oxo-dG como para 8-oxo-G. Sin embargo, a diferencia de los resultados de muestras de ácido nucleico derivadas de los tejidos, la cantidad de 8-oxo-G fue significativamente mayor en comparación con la de 8-oxo-dG, probablemente reflejando el hecho de que la degradación del ARN ocurre con más frecuencia que la degradación del ADN. Como en el estudio anterior, los autores proponen que la cantidad de 8-oxo-G urinario podría considerarse un biomarcador para la medición sensible del estrés oxidativo y el envejecimiento (192–194).

La acumulación de 8-oxoG en el ADN no es continua. Por ejemplo, al final de la mediana edad, se ha observado un aumento no significativo seguido de un aumento abrupto en edades posteriores en la mayoría de los tejidos. Se cree que el aumento en los niveles de 8-oxoG es el resultado de los niveles supra-fisiológicos de ROS y/o la disminución de la actividad de OGG1 durante los procesos normales de envejecimiento. La disminución en la reparación de 8-oxoG podría deberse a combinaciones de eventos, como una disfunción asociada

a la edad, la incapacidad para incorporar la enzima OGG1 en compartimentos nucleares y mitocondriales y/o modificaciones postraduccionales subóptimas. El EO asociado con el proceso de envejecimiento o el ejercicio físico se vio relacionado con la alteración de la adecuada señalización de la 8-oxo-dG como molécula diana en paralelo con la modificación post-transcripcional y disminución de la escisión de la base modificada por la enzima reparadora. Este efecto no se observaba en tejidos jóvenes.

Se encontraron resultados similares en un modelo de inflamación inducida con lipopolisacárido (LPS) en ratones. Específicamente, mientras que LPS indujo un rápido aumento en el nivel nuclear y la actividad de OGG1 en animales jóvenes, en grupos de edad más avanzada se observó un retraso en la respuesta de horas. Curiosamente, se observó un fenómeno similar para APE1 que se demostró como regulador de la actividad de OGG1. También conviene que la mayor susceptibilidad de la guanina a ser oxidada por $\bullet\text{OH}$ y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) debido a su potencial de oxidación (-1.29 mV frente al electrodo de hidrógeno de níquel) unido a la abundancia de esta base en las estructuras del ADN y ARN, se ha propuesto como un mecanismo de defensa contra el envejecimiento de algunas especies y líneas celulares como consecuencia de un efecto de hormesis que sería beneficioso para aumentar su longevidad (184).

8.4. ANTIOXIDANTES EN EL ENVEJECIMIENTO

Como era de esperar la actividad y expresión de enzimas antioxidantes también han sido objeto de profundas investigaciones en el ámbito del desarrollo y envejecimiento, si bien los resultados obtenidos difieren dependiendo del tipo de estudio y aproximación experimental utilizada.

La inducción de enzimas antioxidantes se observa desde las edades más tempranas del desarrollo e incluso se ha señalado como mecanismo de prevención frente a la oxidación y mantenimiento del ADN hepático (195).

La actividad de la superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa se vio disminuida con la edad en hígado y riñón de ratas Wistar hembras, pero superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa se mantuvo constante en cerebro (196).

A pesar de la gran complejidad de los procesos de envejecimiento, pueden existir procesos relativamente menos complejos, como los genes determinantes de la longevidad (LDG), que rigen la tasa de envejecimiento. Al probar la hipótesis de que los antioxidantes pueden representar LDG, se encontró una correlación positiva en la concentración de antioxidantes específicos con la vida de los mamíferos. Estos antioxidantes incluyen superóxido dismutasa, carotenoides, alfa-tocoferol y ácido úrico. También se encontró que la resistencia de los tejidos a la autooxidación espontánea y la cantidad de daño oxidativo al ADN se correlaciona inversamente con la esperanza de vida de los mamíferos. Estos resultados sugieren un papel de los ROS en el envejecimiento y que el estado antioxidante de un individuo podría ser importante para determinar la frecuencia de

enfermedades dependientes de la edad y la duración del mantenimiento general de la salud (187,197).

En tejido homogenado de hígado y fracciones sobrenadantes post-mitocondriales de ratas de 4, 14, 24 y 29 meses se observaron cambios asociados a la edad en las actividades de catalasa y glutatión reductasa que podrían describirse como diferencias determinadas por el sexo que desaparecieron en la vejez. Las actividades citosólicas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa mostraron variaciones dependientes del sexo en la actividad, pero no se vieron afectadas por el envejecimiento. Los resultados indican que los cambios asociados con la edad en los mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática del hígado de rata dependen del sexo (198).

En otro estudio posterior realizado con muestras de músculo esquelético de humanos se comprobó que la actividad total de SOD disminuye significativamente con la edad en el grupo de 66-75 años, aunque la actividad de MnSOD aumenta significativamente en el grupo de 76-85 años. La actividad de las dos enzimas desintoxicantes de H₂O₂ (GPx y CAT) no cambió con la edad (199).

Otros autores comprobaron que el envejecimiento no se correlaciona con una disminución de las enzimas antioxidantes, excepto con la GPx y sugieren que el aumento del EO en el envejecimiento no puede atribuirse por completo a una disminución en las actividades del sistema de defensa antioxidante y, probablemente, varios factores pueden contribuir a este proceso (200).

Las actividades enzimáticas mitocondriales, óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS), NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa, se comportaron como marcadores del envejecimiento cerebral en ratones. La disminución de las actividades enzimáticas se

relacionó directamente con el contenido de productos de oxidación y la pérdida de la función neurológica de los ratones viejos. La suplementación con vitamina E a los ratones de este estudio consiguió aumentar la vida útil de estos animales y fueron efectivas para disminuir el nivel de marcadores de estrés oxidativo y retardar las disminuciones en las actividades enzimáticas mitocondriales y la función neurológica asociada con el envejecimiento. De esta manera, se ha propuesto que las actividades de mtNOS, NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa pueden usarse como indicadores de la efectividad de los tratamientos antienvjecimiento (201).

Da Cruz AC et al. plantearon un estudio cuya finalidad era buscar una posible correlación entre el daño oxidativo, las actividades enzimáticas antioxidantes y el potencial antioxidante del plasma con parámetros clínicos en personas mayores de 80 años. Los datos clínicos se recolectaron en base a la Escala de evaluación de enfermedades acumuladas (n = 132) y se tomaron muestras de sangre para determinar el estrés bioquímico y oxidativo. Los resultados mostraron que los pacientes diabéticos presentaron niveles más altos de proteínas carboniladas en comparación con los no diabéticos, y que los niveles de peroxidación (MDA) se correlacionaron con los niveles séricos de triglicéridos y LDL. Por el contrario, encontraron una capacidad antioxidante total plasmática menor que correlacionaba con la presencia de diabetes e hipertensión arterial, mientras que los sujetos sanos de edad avanzada presentaron una mayor capacidad antioxidante total en plasma. Los autores concluyeron que el potencial antioxidante del plasma es un mejor predictor del envejecimiento exitoso en los ancianos que los parámetros de daño oxidativo o las propias actividades enzimáticas antioxidantes (8).

En controles sanos, se comprobó una disminución relacionada con la edad en la producción de óxido nítrico y las actividades de SOD-1 y GPx-1. La presencia de hipertensión en el grupo de pacientes se acompañaba de disminuciones adicionales significativas de estas enzimas (202).

En base a lo expuesto, no cabe duda de que son múltiples las aproximaciones y posibilidades para elevar a los distintos metabolitos y productos del EO a la categoría de marcador de envejecimiento. No obstante, también son numerosas las limitaciones que existen para ser considerados y validados correctamente y asegurar su relevancia en la clínica. Tampoco está definida la autoría y utilidad de estos marcadores, productos de oxidación y/o moléculas antioxidantes, como analitos individuales o más bien en su conjunto, cuantos y cuales (162).

La literatura es muy heterogénea. A menudo es difícil sacar conclusiones generales sobre la importancia de los biomarcadores de estrés oxidativo, ya que solo en una proporción limitada de enfermedades se ha utilizado un rango de biomarcadores diferentes, y se han utilizado diferentes biomarcadores para estudiar diferentes enfermedades. Además, los biomarcadores a menudo se miden utilizando métodos no específicos, mientras que las metodologías específicas a menudo son demasiado sofisticadas o laboriosas para el uso clínico de rutina. Varios marcadores de estrés oxidativo aún representan una oportunidad viable de biomarcador para uso clínico. Sin embargo, los hallazgos positivos con los biomarcadores actualmente utilizados aún deben validarse en muestras de mayor tamaño y compararse con los estándares clínicos actuales para establecerlos como diagnósticos clínicos. Es importante darse cuenta de que el estrés oxidativo es un fenómeno que en ocasiones resulta

difícil de caracterizar, y un biomarcador no es necesariamente mejor que otros. La gran diversidad del estrés oxidativo entre enfermedades y otras condiciones especiales debe tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el biomarcador más apropiado (203).

9. ACTIVIDAD FÍSICA Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Este es otro aspecto donde existe cierta controversia entre los resultados obtenidos y las conclusiones a las que llegan los distintos grupos de investigación. En principio, el ejercicio físico induce la formación de ROS con una intensidad que parece depender del tipo de actividad y las características de los sujetos que lo practican. Sin embargo, su práctica parece ser beneficiosa en muchos aspectos e incluso se ha sugerido que aumenta la longevidad de algunas especies y líneas celulares.

El ejercicio físico permite el desarrollo y la implementación de la función vital. Se han planteado varias hipótesis de cómo la actividad física puede mejorar la progresión del envejecimiento. De hecho, se ha comunicado que la duración de la vida se incrementará en dos años cuando se practica el ejercicio físico (204,205).

Sin embargo, la contradicción es obvia, en base al concepto de que el ejercicio físico aumenta el estrés oxidativo como otras proteínas de fase reactiva aguda y marcadores de inflamación. Se ha alegado que el ejercicio promueve tanto la producción de radicales libres como la peroxidación lipídica. Incluso el ejercicio físico regular, que se ha demostrado que aumenta la vida media, también se considera un factor estresante (206).

Esta aparente incongruencia de afirmaciones puede provenir del hecho de que existen diferentes tipos de ejercicio físico, cada uno de los cuales produce una acción distinta en muchas macromoléculas del organismo. Las diferencias encontradas dependen de si el ejercicio es aeróbico o anaeróbico, si se realizan de forma crónica o aguda, o si éste se realiza con mayor o menor intensidad. Por ejemplo, el ejercicio aeróbico regular parece ser un protector contra varias enfermedades crónicas relacionadas con la edad (207) sin embargo, sigue siendo un tema en discusión ya que hay evidencias que muestran que el ejercicio, especialmente el ejercicio exhaustivo, se asocia con daño muscular e inflamación, y la sobreproducción de radicales libres (208).

Sin embargo, se ha demostrado que el entrenamiento regular, realizado de manera aeróbica de baja intensidad puede mejorar la calidad de vida y el rendimiento funcional para disminuir la morbilidad y la mortalidad entre las personas mayores (206,209).

Los ancianos que son físicamente activos se benefician de la adaptación inducida por el ejercicio en los sistemas de defensa antioxidante celular. La mecánica muscular mejorada, la fuerza y la resistencia los hacen menos vulnerables a las lesiones agudas y la inflamación crónica. Sin embargo, en la actualidad muchas preguntas críticas permanecen con respecto a la relación del envejecimiento y el ejercicio. Por ejemplo, ¿cómo altera el envejecimiento los mecanismos intracelulares e intercelulares inducidos por el ejercicio que generan ROS? ¿Puede el ejercicio agudo y crónico modular la expresión génica disminuida de enzimas metabólicas y antioxidantes observadas en la vejez? ¿El ejercicio previene la pérdida de masa muscular dependiente de la edad (sarcopenia)? ¿Qué tipo de suplementos antioxidantes, si existen, necesitan las personas mayores que son físicamente activas?

Las respuestas a estas preguntas requieren una investigación altamente específica tanto en animales como en humanos (210).

El músculo esquelético, el órgano principal para la locomoción, sufre un deterioro de tamaño, estructura y función asociado a la edad. Las investigaciones recientes sugieren que el estrés oxidativo es un factor etiológico importante para la sarcopenia. El nivel de estrés oxidativo asociado al envejecimiento muscular está influenciado por dos procesos biológicos fundamentales: la mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los cambios asociados con la edad en la defensa antioxidante. Parece que a pesar del aumento de la producción de ROS, el músculo envejecido tiene una expresión génica disminuida de enzimas antioxidantes posiblemente debido a una capacidad disminuida para la señalización celular. Un beneficio importante del ejercicio no exhaustivo es inducir un estrés oxidativo leve que estimula la expresión de ciertas enzimas antioxidantes. Esto está mediado por la activación de las vías de señalización sensibles a los cambios redox. Por ejemplo, la expresión génica de la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn) en el músculo se potencia después de un episodio agudo de ejercicio precedido por un nivel elevado de unión a NF-kappaB y AP-1. Un aumento en la síntesis proteica “de novo” de una enzima antioxidante generalmente requiere episodios repetidos de ejercicio. El envejecimiento no elimina, pero parece atenuar las adaptaciones de entrenamiento de las enzimas antioxidantes. Con ello se ha sugerido que, para el músculo senescente, el entrenamiento debe ser asistido con suplementos de antioxidantes exógenos para conseguir un nivel óptimo de defensa (211).

La suplementación con antioxidantes, sin embargo, requiere ciertas reconsideraciones y no siempre es aceptada por todos los autores. Como es sabido y unánimemente aceptado ROS cumple

importantes funciones fisiológicas; por lo tanto, la eliminación inapropiada de ROS puede causar estrés reductivo paradójico y por lo tanto induce o promueve enfermedades. Cualquier recomendación sobre la suplementación con antioxidantes debe basarse en una evidencia clínica sólida y en resultados relevantes para el paciente (212).

La atrofia del músculo esquelético es la consecuencia de la degradación de las proteínas que excede la síntesis de proteínas. Esto se debe a una multitud de razones que incluyen la descarga de músculo durante la microgravedad, el reposo en cama después de la cirugía, la inmovilización de una extremidad después de una lesión y el desuso general de la musculatura. El desarrollo de terapias previas a la atrofia del músculo esquelético para disminuir la degradación proteica es escaso. La disfunción mitocondrial se asocia con la atrofia del músculo esquelético y contribuye a la inducción de la degradación proteica y la apoptosis celular a través del aumento de los niveles de ROS observado con la pérdida de la función de los orgánulos. Los ROS se unen e interaccionan con el ADN mitocondrial, lo que conduce a su degradación y funcionalidad decreciente. El factor de transcripción mitocondrial A se unirá y recubrirá el ADNmt, protegiéndolo de ROS y su degradación a la vez que preserva la función mitocondrial. El ejercicio estimula las vías de señalización celular que convergen y aumentan PGC-1 α , un conocido activador de la transcripción de TFAM y la biogénesis mitocondrial. Se ha propuesto que los tratamientos de ejercicio y el aumento de TFAM antes de los ajustes atróficos (descarga o desuso muscular) podrían aliviar la atrofia del músculo esquelético a través de la mejora de las adaptaciones y funciones mitocondriales. Es decir, la combinación de ejercicio y TFAM puede

conducir a un efecto sinérgico en la función mitocondrial dirigida a prevenir la atrofia del músculo esquelético (213).

En esta línea de actuación se han realizado diversos trabajos en los que se comprueba la respuesta de distintos factores transcripcionales como mecanismo de adaptación durante el ejercicio físico y el EO (133).

Se ha comprobado los efectos del ejercicio agudo y el ejercicio regular sobre la actividad del factor 2 relacionado con el eritroide 2 (Nrf2 así como de la señalización dependiente de Nrf2. Nrf2 (codificado en humanos por el gen NFE2L2) que es el principal regulador de las defensas antioxidantes. Este factor de transcripción regula la expresión de más de 200 genes citoprotectores. La creciente evidencia indica que la señalización de Nrf2 juega un papel clave en cómo el estrés oxidativo media los efectos beneficiosos del ejercicio. Los aumentos episódicos en el estrés oxidativo inducido a través de episodios de ejercicio agudo estimulan la activación de Nrf2 y cuando se aplica repetidamente, como con el ejercicio regular, conduce a la regulación positiva de las defensas antioxidantes endógenas y una mayor capacidad global para contrarrestar los efectos dañinos del estrés oxidativo. La evidencia de activación de Nrf2 en respuesta al ejercicio en una variedad de tejidos puede ser un mecanismo importante que explica cómo la actividad física ejerce sus conocidos efectos sistémicos que no se limitan al músculo esquelético y al miocardio (214).

Otros ejemplos de adaptación inducidos por el ejercicio físico y su repercusión sobre la función muscular en personas adultas mayores han permitido conocer mejor su repercusión e implicaciones sobre el material genético. Se ha comprobado un aumento significativo

del nivel de expresión intrahelical 8-oxoG y 8-oxoguanina-DNA glicosilasa (OGG1) en el músculo esquelético humano envejecido en comparación con la de los individuos jóvenes. En respuesta al ejercicio, el nivel de 8-oxoG se elevó de manera duradera en sujetos jóvenes y viejos sedentarios, pero regresó rápidamente a niveles previos al ejercicio en el ADN de individuos físicamente activos independientemente de la edad. Los niveles de 8-oxoG en el ADN se correlacionaron inversamente con la cantidad de OGG1 acetilada (Ac-OGG1), pero no con la OGG1 total, la endonucleasa apurinica/apirimidinica 1 (APE1) o Ac-APE1. El nivel real de Ac-OGG1 se relacionó con el estrés oxidativo inducido por el ejercicio, como lo demuestran los cambios en los niveles de peróxido lipídico y expresión de Cu, Zn-SOD, Mn-SOD y SIRT3, así como el equilibrio entre acetiltransferasa p300/CBP y deacetilasa SIRT1, pero no con la expresión de SIRT6. En conjunto, estos datos sugieren que la forma acetilada de OGG1, y no de OGG1 en sí misma, se correlaciona inversamente con el nivel de 8-oxoG en el ADN del músculo esquelético humano, y el nivel Ac-OGG1 depende de respuestas celulares adaptativas a la actividad física, pero es independiente de la edad (215).

En esta Tesis Doctoral presentamos evidencia experimental sobre el efecto beneficioso del ejercicio físico controlado, empleando resistencias (entrenamiento de la fuerza) a diferentes niveles de intensidad, sobre la mejora de la función física y el EO. Este estudio investigó los efectos de un programa de entrenamiento de resistencia progresivo (RTP) de 16 semanas con bandas elásticas en dos diferentes intensidades sobre el estado redox sistémico, la oxidación del ADN y la función física en mujeres mayores sanas comprobándose que el ejercicio físico de intensidad moderada y no la de alta intensidad

puede ser una mejor estrategia para reducir el daño del ADN en personas mayores sanas mientras que también aumenta su independencia (216).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El envejecimiento se caracteriza y está asociado a un aumento de las oxidaciones moleculares por el estrés oxidativo, que resulta del desequilibrio entre los procesos que generan especies reactivas de oxígeno y la actividad de los sistemas antioxidantes. El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con la fisiopatología y complicaciones patogénicas de gran parte de los procesos degenerativos del envejecimiento. Sin embargo, no se han establecido hasta el momento los niveles de los productos de oxidación ni de antioxidantes a nivel sistémico en sujetos sanos a lo largo de sus distintas etapas desde la madurez hasta las edades más avanzadas. Esta información es de gran importancia para, a partir de los valores de normalidad, poder conocer la edad biológica de las personas y, ante sus modificaciones, poder predecir la aparición de alteraciones.

El estrés oxidativo se ha relacionado con aquellas situaciones que cursan con un aumento del consumo de oxígeno. En este sentido el ejercicio físico, altamente recomendado para prevenir distintas enfermedades cardiovasculares, metabólicas, osteoarticulares e incluso tumorales, se ha relacionado con la formación de especies reactivas de oxígeno y por lo tanto con el estrés oxidativo, siendo este un aspecto de controversia a la hora de recomendar la práctica de actividad física tanto en personas jóvenes como en los adultos mayores. En base a la información con la que contamos en la actualidad, todo parece indicar que el grado de estrés oxidativo y sus efectos deletéreos durante el ejercicio físico depende del tipo de ejercicio realizado, de la edad y del grado de entrenamiento de la persona que lo practica.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS EXPERIMENTALES PLANTEADOS

1. OBJETIVOS GENERALES

1. Valoración de los niveles sistémicos de estrés oxidativo (EO) en personas adultas sanas de edades comprendidas entre los 18 y los 90 años.

2. Cuantificar los efectos del entrenamiento físico controlado sobre el rendimiento de los sujetos y los niveles de EO en mujeres adultas mayores.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar los niveles de enzimas antioxidantes, Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutación Peroxidasa (GPx) en células mononucleares circulantes (CMNc) en la población objeto de estudio.

2. Cuantificar las concentraciones de Glutación Reducido (GSH), Glutación Oxidado (GSSG) y la Relación Porcentual de estos metabolitos (GSSG/GSH%) en la población objeto de estudio.

3. Cuantificar los productos de oxidación molecular Malondialdehído (MDA), F2-Isoprostanos (F2-IP) y Proteínas Carboniladas (PC) en CMNc y orina en la población objeto de estudio.

4. Valorar el grado de lesión del material genético a través de la valoración de los niveles de 8-oxo-7.8-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) en el ADN genómico de CMNc y la concentración de este metabolitos en suero y orina de la población objeto de estudio.

5. Estudio de las correlaciones de los metabolitos de EO entre ellos y con la edad de los individuos estudiados.

6. Cuantificar el efecto del Entrenamiento Regular Controlado de Alta y Mediana Intensidad sobre los parámetros de rendimiento físico en una población de mujeres adultas mayores de edad comprendida entre 60 y 75 años.

7. Cuantificar el efecto del Entrenamiento Regular Controlado de Alta y Mediana Intensidad sobre las concentraciones de GSH, GSSG y GSSG/GSH% y niveles de 8-oxodG en la orina en mujeres adultas mayores de edad entre 60 y 75

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación y protocolos empleados para su realización se llevó a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia y del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Todos los pacientes incluidos en este estudio recibieron información detallada de su planteamiento y objetivo experimental y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Para abordar los objetivos experimentales planteados se ha subdividido a la población en dos grupos de sujetos voluntarios. El primer grupo corresponde al **estudio de la valoración de los cambios de parámetros oxidativos en distintas edades** y se compone de un total de 120 individuos, hombres y mujeres con edades comprendidas entre 18 y 90 años a los que se revisó clínicamente primero y tras encuesta clínica, registro de tensión y variables antropométricas se decidió su inclusión en el estudio. Los sujetos incluidos en el estudio se subdividieron en tres grupos según la edad de los individuos: Grupo A: 18 a 40 años, Grupo B: 41 a 60 años y Grupo C: 61 a 90 años.

El segundo grupo corresponde al **estudio de entrenamiento controlado sobre parámetros de función física y de estrés oxidativo** para lo que se seleccionó un grupo de mujeres mayores sanas, con edades comprendidas entre 60 y 75 años, a las que se les entrenó mediante ejercicio de fuerza con resistencia variable desarrollado a diferentes intensidades y bajo el control de profesores especializados y siguiendo las especificaciones que se describen en el apartado correspondiente.

Las determinaciones de los metabolitos de EO (antioxidantes y productos de oxidación) correspondientes tanto al grupo de distintas edades como al de intervención física se realizaron por procedimientos estandarizados en el Laboratorio de Estrés Oxidativo de la Unidad de Patología Oxidativa en la Facultad de Medicina de Valencia.

Las pruebas para valorar la función física tras el programa de entrenamiento de la fuerza con resistencia progresiva (PERP) mediante la utilización de bandas elásticas se llevaron a cabo en dos Centros Municipales de Actividad Física para personas mayores de Valencia bajo supervisión de personal experimentado en investigación deportiva, enfermeras y fisioterapeutas para satisfacer el cumplimiento de los objetivos experimentales.

1. VALORACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO SISTÉMICO EN SUJETOS DE DISTINTAS EDADES

Para afrontar este objetivo -se escogió el primer grupo de población correspondiente a un total de 120 individuos, hombres y mujeres con edades comprendidas entre 18 y 90 años subdivididos según las siguientes franjas de edad y número de casos estudio entre paréntesis: 18 a 40 años (n: 25); entre 41 y 60 años (n: 54) y entre 61 y 90 (n: 41).

En los criterios de inclusión se consideró, junto con el consentimiento informado: estar en condiciones de someterse a revisión clínica y análisis bioquímico el día de la fecha de la toma de muestras. Estar en ayuno de 12 horas antes de la extracción sanguínea. No presentar hipertensión importante para el grupo de edad considerada, ni enfermedad cardiovascular, hematológicas o neoplásica o proceso inflamatorio al menos tres meses antes de su inclusión en el estudio. No referir toma habitual de antioxidantes y consumo habitual de una dieta equilibrada.

Los criterios de exclusión fueron: la no aceptación del consentimiento informado; la presencia de hipertensión importante según grupo de edad considerado; historia clínica de enfermedad metabólica o degenerativa grave y sujeta a tratamiento crónico; haber experimentado cambios en el peso corporal >10% durante el último año o tener un índice de masa corporal >30Kg/m²; ser fumador de más de 5 cigarrillos/día y consumo de bebidas alcohólicas destiladas con regularidad; estar bajo tratamiento farmacológico con sustancias potencialmente inductoras de cambios en el estado redox.

2. ESTUDIO DEL EJERCICIO FÍSICO CONTROLADO SOBRE LOS PARÁMETROS DE ACTIVIDAD FÍSICA Y DE ESTRÉS OXIDATIVO

El segundo grupo corresponde al estudio de entrenamiento controlado sobre parámetros de función física y de estrés oxidativo. Para el estudio de la actividad física se seleccionó un grupo de mujeres mayores sanas, caucásicas y desentrenadas (de 60 a 75 años de edad) que se ofrecieron voluntariamente para participar en este estudio después de leer la información del estudio que se hizo público en varios Centros Municipales de Actividad Física para Personas mayores de Valencia.

Los criterios de inclusión fueron: (a) edad: > 60 años, (b) estilo de vida sedentario (menos de 1 hora de actividad física o ejercicio en una semana durante los 6 meses previos al estudio); (c) certificado médico de idoneidad o aptitud para practicar actividades de entrenamiento de resistencia; (d) confirmación de no tener intención de abandonar el área durante la intervención; (e) capacidad cognitiva para comprender y seguir las instrucciones; y (e) libre de cualquier suplemento antioxidante durante al menos 6 semanas antes del comienzo de este estudio.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: (a) presencia de enfermedades cardiovasculares; trastornos musculoesqueléticos o neuromusculares que impiden la realización de los ejercicios; (b) cambios en el peso corporal >10% durante el último año; (c) ingesta de prescripción medicamentos que se espera que alteren los resultados del estudio (ayudas ergogénicas o dietéticas); (d) un historial de neoplasia maligna; y (e) participación en entrenamiento de

la fuerza regular (más de una vez a la semana) durante los 6 meses anteriores.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de con número H1395923230221.

Para examinar los efectos de 16 semanas de supervisión, progresiva de entrenamiento de la fuerza con bandas elásticas a diferentes intensidades, se asignaron aleatoriamente a los participantes a los grupos de alta intensidad (ALTO; n = 39), grupo de intensidad moderada (MOD; n = 31), o grupo de control (CG; n = 23) utilizando un azar generado por computadora procedimiento de permutación. El investigador que generó la secuencia de asignación aleatoria también inscribió a los participantes. Los tamaños de muestra difieren porque tanto los hombres como las mujeres fueron originalmente reclutados, y más hombres fueron asignados aleatoriamente a los grupos de control y MOD que el grupo ALTO. Sin embargo, el número total de hombres reclutados fue insuficiente, por lo que finalmente los excluyó de nuestro análisis. El estudio se realizó según las directrices Estándares Consolidados de Publicación de Ensayos (217).

3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO CLÍNICO Y PARÁMETROS BIOQUÍMICO MOLECULARES

Las mediciones ponderales y la presión arterial se recogieron mediante procedimientos estandarizados en los centros reclutadores y por personal especializado: peso (kg), altura (m), IMC (kg / m²) y presión arterial (mmHg).

Las medidas antropométricas (altura y peso) y las pruebas de evaluación de la función física en adultos mayores se realizaron con los tres grupos antes y después del período experimental en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias de la Salud y la Actividad Física de la Universidad de Valencia. Las evaluaciones se realizaron 24-72 h antes y después el período de intervención en 2 días diferentes.

3.1. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS.

Antes de las medidas antropométricas y las pruebas de estado físico, los participantes ayunaron durante 3-4 horas, se abstuvieron de ingerir estimulantes (por ejemplo, cafeína) durante 8 horas, y evitaron practicar ejercicio intenso durante 24 horas, pero se les permitió hidratarse libremente.

La altura (metro) se midió al 0.1 cm más cercano usando un estadiómetro portátil (SECA modelo 217, Seca GmbH & Co. KG, Hamburgo, Alemania). El peso corporal total (kg) y el porcentaje de grasa corporal (%) se midieron con una precisión de 0,1 kg usando un analizador de bioimpedancia eléctrica (Tanita® modelo BC-418 MA, Tokio, Japón). Se les recomendó a los participantes que usen ropas livianas y que eliminen los objetos metálicos que podrían alterar la

corriente eléctrica durante la medición. El índice de masa corporal (kilogramo por metro cuadrado) se calculó dividiendo la masa corporal (en kilogramos) por el cuadrado de la altura del cuerpo (en metros).

Las muestras de orina y sangre se tomaron durante la Sesión 1, y las mediciones antropométricas y las pruebas de estado físico se llevaron a cabo 48 horas después. A todos los participantes se les pidió que mantuvieran sus rutinas y hábitos alimenticios diarios normales, evitaran los suplementos nutricionales que pudieran afectar su composición corporal o su rendimiento y se abstuvieran de comenzar nuevos programas de ejercicio o cualquier otro tipo de ejercicio físico durante el estudio. Todas las pruebas fueron supervisadas por los mismos investigadores y médicos usando los mismos protocolos. Cada participante se familiarizó con todos los procedimientos de prueba física, y proporcionamos información y asesoramiento continuado durante todas las pruebas.

3.2. MEDICIONES DE LA FUNCIÓN FÍSICA.

La función física se evaluó mediante las siguientes pruebas estandarizadas de la batería Rikli y Jones 2013 (218): “30-Second Arm Curl Test” (Arm Curl), flexión de codo con mancuernas durante 30 segundos ; “30-Second Chair Stand Test” (Chair Stand), sentarse y levantarse durante 30 segundos; “Eight-Foot Up and Go Test” (TUG), levantarse, caminar y sentarse; y “Six Minute Walking Test” (6MWT), marcha durante seis minutos. Los protocolos para cada una de estas pruebas se detallan en el trabajo de Flandes et al. (219).

3.2.1. “30-Second Arm Curl Test” (Arm Curl)

Consiste en la flexión de codo con mancuernas durante 30 segundos (Figura M-1) (220).



Figura M- 1. Arm Curl Test.(220)

El propósito de esta prueba es valorar la fuerza de la parte superior del tronco, es decir la fuerza de resistencia de los miembros superiores tan necesaria para desarrollar tareas cotidianas que involucran levantamientos, transportes...

La valoración de esta prueba se realiza contabilizando el número de flexiones y extensiones de codos que pueden ser completadas en 30 segundos movilizand una mancuerna de 2,30 Kg para mujeres y 4 Kg para hombres.

Se considera zona de riesgo el realizar menos de 11 flexiones/extensiones completas.

3.2.2. “30-Second Chair Stand Test”

Se trata de sentarse y levantarse de una silla durante 30 segundos (Figura M-2). El fin de esta prueba es valorar la fuerza de los músculos extensores de las rodillas y caderas, responsables de fallos al andar y de caídas, valora la fuerza de resistencia de miembros inferiores.



Figura M- 2. Chair Stand Test (220)

Se realiza contabilizando el número de incorporaciones completas que se pueden realizar con los brazos cruzados por delante del pecho durante 30 segundos.

Se considera zona de riesgo el realizar menos de 8 incorporaciones completas.

3.2.3. *Eight-Foot Up and Go Test (TUG)*

Consiste en levantarse, caminar y sentarse (Figura M-3). Evalúa el equilibrio dinámico y la agilidad que son factores importantes en tareas que requieren maniobras rápidas tales como bajarse del autobús, o levantarse para atender algo...



Figura M- 3. Eight Foot Up and Go Test (220)

Se lleva a cabo midiendo el número de segundos empleados para levantarse desde una posición de sentado, caminar 2,50 m, regresar y volver a la posición de sentado.

Se considera zona de riesgo tardar más de 9 segundos para hombres y mujeres (220).

3.2.4. Six Minute Walking Test (6MWT)

Consiste en caminar durante seis minutos.

Evalúa la resistencia aeróbica, factor muy importante para caminar, subir escaleras, hacer turismo...

Se valora midiendo los metros que pueden ser realizados en 6 minutos alrededor de una pista.

Se considera zona de riesgo el realizar menos de 320 metros para hombres y mujeres.

3.2.5. Programa para el entrenamiento de la fuerza con bandas elásticas

El programa de intervención supervisada incluyó 2 sesiones semanales de 55 minutos a 1 hora realizadas en días no consecutivos (separados por 48 horas) durante 16 semanas. Según lo recomendado por el Colegio Americano de Medicina del Deporte, cada sesión de ejercicio se dividió en tres componentes: (i) un calentamiento general de 10 minutos; (ii) ejercicios de fuerza durante 35-40 minutos que incluía tres ejercicios para miembros superiores (remo vertical, remo inclinado y curl de codo) y tres ejercicios para las extremidades inferiores (sentadilla con apoyo estrecho, tijera y abducción de cadera en bipedestación); (iii) una rutina de enfriamiento de 10 minutos. Para el desarrollo de la parte principal de la sesión se eligieron ejercicios multiarticulares que estimulaban la participación de los grupos musculares tanto mayores como menores no sólo de las extremidades sino también del tronco (221).

Cada sesión se realizó en un grupo, y cada participante siempre realizó los ejercicios en el mismo orden, alternando entre las extremidades superiores e inferiores (222).

Se usaron bandas elásticas (TheraBand®, Akron, OH, EE. UU.) y sillas como material de trabajo.

Durante todo el periodo de entrenamiento el grupo ALTO realizó seis repeticiones submáximas, con una carga que podría equivaler de manera cercana al 85% del máximo movilizado para una sola repetición (1RM) por ejercicio, mientras que el grupo MOD realizó 15 repeticiones submáximas, con una carga que podría equivaler de manera cercana al 70% de 1RM. El nivel o carácter del esfuerzo percibido al final de cada serie fue determinado con la OMNI-RES Scale que ha sido validada para el empleo de bandas elásticas durante el entrenamiento de la fuerza (223–226). El carácter del esfuerzo al final de cada serie progresó para ambos grupos experimentales de 6-7 sobre 10 (algo duro) en las primeras 4 semanas (periodo de adaptación) a 8-9 sobre 10 (duro) en las 12 semanas restantes. El control de la intensidad mediante este método (que tiene en cuenta el ancho de agarre, el color de la banda y el número de bandas ajustado todo en global a un número diana de repeticiones) ha sido previamente validado en adultos jóvenes (224), adultos de mediana edad (225) y adultos mayores (226). Este método permite que el número empleado de repeticiones durante el entrenamiento de la fuerza se realice con la resistencia/carga adecuada para generar las adaptaciones pretendidas. Debe enfatizarse que aportará un control correcto del ejercicio cuando se quiere emplear para su desarrollo caracteres del esfuerzo submáximos, ya que es conocido que los caracteres o esfuerzos máximos podrían generar repuestas cardiovasculares no deseadas en poblaciones como, por ejemplo, la estudiada en la

presente tesis. Por tanto, el empleo del carácter del esfuerzo al final de cada serie desarrollada garantizará durante la realización de esfuerzos submáximos la seguridad del ejercicio a la vez que ayudará a controlar que la resistencia empleada sea reproducible y de la magnitud suficiente con la que provocar el estrés neuromuscular pretendido. Este método se hace aún más necesario cuando la resistencia empleada en los ejercicios es de difícil cuantificación y monitorización, como así sucede, por ejemplo, al emplear las bandas elásticas como dispositivo para el entrenamiento de la fuerza. Es conocido que un carácter del esfuerzo submáximo durante el entrenamiento de la fuerza producirá las adaptaciones pretendidas a la vez que reducirá las contraindicaciones de la ejecución hasta la fatiga máxima o fallo muscular.

El número de series por ejercicio pasó de tres en las primeras 8 semanas a cuatro en las 8 semanas restantes en ambos grupos, con 120 o 60 s de recuperación activa (balanceo rítmico lento de las extremidades sin el uso de bandas elásticas) entre las series de cada uno de los ejercicios empleados en los grupos ALTO y MOD, respectivamente. Se permitieron, en ambos grupos, 90 s de descanso entre las series de los distintos ejercicios. La velocidad de ejecución de los ejercicios se controló usando un metrónomo que marcaba la cadencia (2 s para la fase de contracción concéntrica y 2 s para la excéntrica).

Los sujetos realizaron dos sesiones de preintervención familiarización para: (a) seleccionar el color, ancho de agarre y número de banda; (b) adaptarse al carácter del esfuerzo percibido; y (c) aprender la técnica correcta de los ejercicios. Como se explicó anteriormente, las cargas movilizadas en cada ejercicio se ajustaron cada semana para mantener las intensidades (resistencia específica)

de entrenamiento adecuadas al adaptar el color y el número de bandas elásticas junto con el ancho de agarre. La asistencia a cada sesión fue diariamente registrada.

Todas las sesiones de entrenamiento se realizaron a la misma hora del día (10-11 a.m.) y se llevaron a cabo en dos Centros de Actividad Física Municipal para Personas Mayores ubicados en Valencia, bajo la supervisión de un científico deportivo, enfermeras y fisioterapeutas calificados y experimentados para garantizar la seguridad y el cumplimiento. El diseño experimental se muestra en la figura M-1.

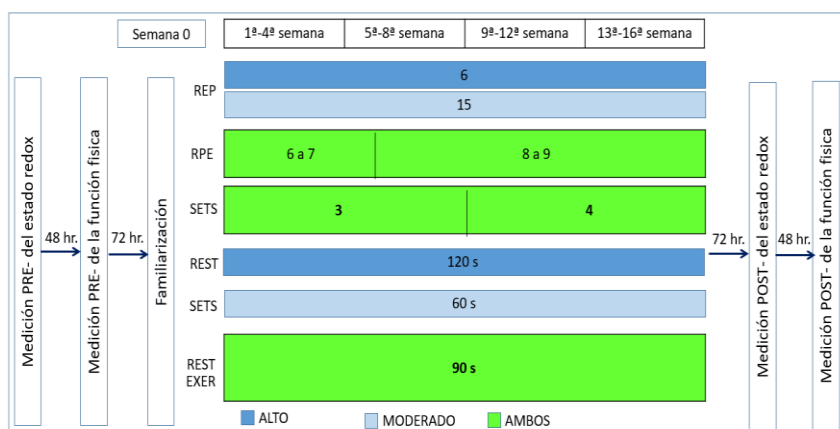


Figura M- 4. Diseño experimental del Programa de Entrenamiento de la Fuerza

ALTO = grupo de alta intensidad (6 repeticiones); MOD = grupo de intensidad moderada (15 repeticiones); REP = repeticiones; RPE= carácter del esfuerzo percibido al final de cada serie (6-7 = algo duro, 8-9 = duro); SETS: nº de series por ejercicio; EXER = ejercicio; REST SETS: recuperación activa entre series de un mismo ejercicio; REST EXER: descanso entre las series de distintos ejercicios

3.3. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICO-CLÍNICOS Y HEMATOLÓGICOS.

3.3.1. Análisis de parámetros bioquímicos.

Las muestras de suero fueron extraídas tras 12 horas de ayuno en tubos secos de 10 mL con separador de gel de silicona y acelerador de la coagulación, tras la retracción del coagulo (15-30 minutos a temperatura ambiente) las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga Rotina 380R Hettich (Tuttlinger, Alemania). El análisis de los parámetros bioquímicos consistió en un estudio bioquímico-clínico completo, que incluía glucosa (GLC), urea (URE), creatinina (CREA), aspartato aminotransferasa (GOT), alanina aminotransferasa (GPT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), sodio (Na), potasio (K+), cloro (Cl), triglicéridos (TG), colesterol total (TC), colesterol HDL, Proteínas totales (PT) que se determinaron mediante procedimientos estándar de espectrofotometría en analizadores automáticos ARCHITECT c16000 del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Este método es el más usado en los laboratorios de Bioquímica Clínica y se basa en la relación que existe entre la absorción de la luz por parte de un compuesto y su concentración; la intensidad de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente la concentración de sustancia absorbente, cuando este haz pasa a través de un medio homogéneo (ley de Beer).

La proteína C reactiva ultrasensible (PCR_U) se determinó por turbidimetría en un analizador automático IMAGE® 800 (Beckman Coulter). La medición se basa en una metodología cinética de alta

sensibilidad de inmunoensayo con partículas en el infrarrojo próximo. Una partícula recubierta con anticuerpo anti-PCR se liga a la PCR de la muestra, formando agregados insolubles que causan turbidez. La velocidad de agregación es directamente proporcional a la concentración de PCR en la muestra.

Para el estudio de los sujetos incluidos en el estudio de la actividad física se realizó un examen analítico amplio basado en la determinación de parámetros bioquímico-clínicos y hematimétricos.

3.3.2. *Análisis de los parámetros hematimétricos*

Las muestras de sangre total fueron extraídas en tubos de EDTA-K3 y de citrato sódico de 5 mL para la realización del hemograma y coagulación, respectivamente.

Se realizó hemograma completo y coagulación básica, con determinación del fibrinógeno.

Las determinaciones hematimétricas fueron realizadas en contadores LH 500 de Beckman-Coulter (Brea, California, EEUU), tecnología basada en el principio Coulter (uso de un campo eléctrico para contar y dimensionar partículas que se encuentran en suspensión en un líquido conductor).

La coagulación se realizó en el plasma remanente de los tubos de citrato sódico tras su centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, en el coagulómetro ACL-TOP de Instrumentation Laboratory Company (IL, Bedford, Massachusetts, USA).

3.4. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS MONONUCLEARES CIRCULANTES (CMNc), EN SUERO Y ORINA.

El análisis de los metabolitos de EO se realizó por procedimientos estandarizados en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Unidad de Patología Oxidativa en la Facultad de Medicina de Valencia.

3.4.1. Aislamiento de CMNc de sangre completa.

Se extrajo un volumen de 10-15 ml de muestras de sangre completa de los pacientes y se recogieron en tubos de EDTA en los momentos indicados en cada estudio. Los tubos extraídos se mantuvieron en un refrigerador a 2 - 4°C hasta que se procesaron para el aislamiento de los linfocitos dentro de las cuatro primeras horas después de la extracción.

El aislamiento se llevó a cabo por centrifugación en gradiente de densidad con Hystophaque (Sigma H-1077) a 1700 rpm durante 30 min (12 ° C). Las CMNc unidas al fondo se resuspendieron suavemente, se transfirieron a nuevos tubos Eppendorf y se almacenaron a - 80°C hasta su uso. Antes del ensayo, las muestras se sonicaron durante 3-5 s (98,131).

3.4.2. Extracción de muestra de suero

Después de 12 horas de ayuno, se extrajeron 10 ml de sangre completa de una vena antecubital en tubos secos de 10 mL con separador de gel de silicona y activador de la coagulación. Tras la

retracción del coágulo (15 a 30 minutos a temperatura ambiente) las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga Rotina 380R Hettich (Tuttlinger, Alemania). El sobrenadante de suero resultante se pipeteó y se alícuotó. Las determinaciones bioquímicas se realizaron el mismo día. El resto de alícuotas se congelaron a -80 ° C hasta su uso para la determinación de parámetros de EO.

3.4.3. *Recolección de orina*

Se recogieron 8-10 ml de orina (primera orina en la mañana) en tubos de polietileno. Las muestras de orina se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min en la centrífuga Rotina 380R Hettich para precipitar y eliminar las impurezas. Se separaron diferentes alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

3.4.4. *Ensayo de actividades antioxidantes y del estado redox en CMNc y de la Actividad Antioxidante Total en Plasma en suero*

Las actividades de SOD, CAT y GPx y los niveles de glutatión se analizaron por el método de espectrofotometría siguiendo los respectivos procedimientos de kits de ensayo de Cayman Chemical (Ann Arbor, USA): SOD (n° 706002), CAT (n° 707002), GPx (n° 703102) así como GSH y GSSG totales (n° 703002).

La actividad de PAO se analizó por el método de ELISA siguiendo el protocolo del kit de ensayo de Cayman Chemical (Ann Arbor, USA) n° 709001.

3.4.5. Análisis de los productos de estrés oxidativo.

3.4.5.1. Cuantificación de proteínas carboniladas

La cuantificación de proteínas carboniladas en muestras biológicas puede ser determinada por derivatización con DNP (dinitrofenilhidrazina) y midiendo colorimétrica o inmunológicamente. El método ELISA permite la medida cuantitativa de carbonilación desde μg de proteínas. Casa comercial CAYMAN Cat n° 10005020. Protein Carbonyl Assay Kit.

3.4.5.2. El ensayo MDA en CMNs por HPLC-UV

En el primer paso de este ensayo los lipoperóxidos se hidrolizan por ebullición en ácido ortofosfórico diluido. Posteriormente, los productos de aducción que reaccionan con ácido MDA-tiobarbitúrico (TBA) [(MDA (TBA)₂] se eluyeron y se cuantificaron espectrofotométricamente.

Para la cuantificación de MDA, se mezclaron 50 μl de muestras de CMNc en un tubo Eppendorf estéril con 75 μl de H_3PO_4 0,44 M, 25 μl de solución de TBA y calentada a 95°C durante 30 min. Después de agregar (en hielo) 150 μl de solución neutralizante (NaOH 1 M), las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min. El MDA se

purificó y se midió a partir de 100 µl del sobrenadante resultante mediante HPLC-UV usando el método de elución isocrática con una solución que contiene 5% de acetonitrilo y 50 mM de tampón de fosfato potásico a pH 5,5. Los ensayos cromatográficos fueron de 3 minutos a un caudal de 1 ml/min (105,131). La cuantificación de los compuestos se determinó a 532 nm. El contenido total de proteína se cuantificó por el método de Lowry (227).

3.4.5.3. Aislamiento, separación y cuantificación de 8-oxo-dG del ADN genómico a partir de CMNc.

El ADN de las CMNc se aisló siguiendo el método descrito por Muñiz P, Valls V, et al (88). En la que se usó alcohol cloroformo isoamílico (24: 1) en lugar de fenol para eliminar las proteínas. El ADN aislado se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó y se disolvió en 200 µl de Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM y NaCl 100 mM (pH 7,0) para la digestión enzimática. Brevemente, se incubaron 5 µg de ADN / µL (contenido total de ADN 200 µg) con 100 unidades de DNasa I en 40 µL de Tris / HCl (10 mM) y 10 µL de MgCl₂ 0.5 M (concentración final: 20 mM) a 37 ° C durante 1 h. El pH de la mezcla de reacción se redujo luego con 15 µl de acetato de sodio 0,5 M (pH 5,1); Se añadieron 10 µl de nucleasa P1 (5 unidades) y 30 µl de ZnSO₄ 10 mM para dar una concentración final de 1 mM, y la mezcla se incubó durante 1 h. Después de ajustar el pH con 100 µL de Tris / HCl 0.4 M (pH 7.8), seguido de la adición de 20 µL de fosfato alcalino (3 unidades), las muestras se incubaron durante 30 minutos. Las enzimas se precipitaron con acetona (5 volúmenes), se eliminaron por centrifugación, y el sobrenadante se evaporó hasta su secado completo.

Los hidrolizados de ADN se disolvieron en agua de calidad HPLC y se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,2 μm antes de aplicar las muestras a una columna de HPLC Waters ODS (4,6 mm x 250 mm) tamaño de partícula de 5 μm). Se usó un modelo de bomba Waters 515 HPLC para separar la 8-oxo-dG. Esta separación se llevó a cabo utilizando una columna Spherisorb ODS2 de 5 μm (4,6 mm x 250 mm) con un caudal de 1 ml / min. El tampón de ejecución para 8-oxo-dG del ADN nuclear y mitocondrial fue de 50 mmol / L de fosfato de potasio (pH 5,1) en acetonitrilo al 5%, y el tiempo de retención fue de 7,5 min. La detección electroquímica de las muestras de orina se realizó utilizando un detector ESA Coulochem II equipado con una celda analítica 5011 de alta sensibilidad (sensibilidad de 1 μA), que tenía electrodos coulométricos (electrodo 1) y amperométricos (electrodo 2) unidos en serie. Para el propósito de este ensayo, los potenciales para los dos electrodos se establecieron en 0.2 V y 0.4 V, respectivamente. Las cantidades de 8-oxo-dG y deoxyguanine (dG) en la digestión de ADN se midieron usando absorbancia electroquímica y UV.detección, respectivamente, en las condiciones de elución descritas anteriormente. Se analizaron muestras estándar de dG y 8-oxo-dG para garantizar su separación correcta y permitir la identificación de las derivadas del ADN celular.

3.4.5.4. Separación y cuantificación de 8-oxo-dG en suero por HPLC-EC

El ensayo de 8-oxo-dG en suero se realizó siguiendo el método de Li et al. (2013) (228) con ligera modificación reportada por Borrego et al. (2013) (105).

Para la separación y cuantificación de 8-oxo-dG, se utilizó una bomba HPLC Waters 515 (modelo n° 5200^a) con columna Spherisorb ODS2 de 5 µm (4,6 mm x 250 mm) y detectores electroquímicos (HPLC-EC). Las muestras de suero se descongelaron inmediatamente antes del uso. Se calentó un volumen de 60 µl a 50°C durante 1 h. Una vez que las muestras se volvieron a atemperar a RT, se añadieron 100 µl de proteinasa-k, y luego se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de eso, se añadieron 200 µl de la solución tampón KH₂PO₄ / K₂HPO₄ (50 mM, pH 5,1) (lo mismo que se utilizó en HPLC, fase móvil) seguido de centrifugación a 13,000 rpm para 5 minutos. Se inyectaron alícuotas de 200 µl del sobrenadante resultante con una jeringa de 0,2-40 µm en el sistema HPLC-EC. Las condiciones de funcionamiento se basan en el método descrito por Espinosa, et al (131), manteniendo un caudal de 1 ml / min con 50 mmol / l de tampón de fosfato de potasio (pH 5.1) en 5% de acetonitrilo, y un tiempo de retención de 7.5 min. La detección electroquímica se logró con un detector ESA Coulochem II (Chelmsford, MA, EE. UU.) equipado con una célula analítica de alta sensibilidad 5011 (sensibilidad de 1 µA). Está equipado con electrodos coulométricos (electrodo 1) y amperométricos (electrodo 2) conectados en serie. Para el propósito de este ensayo, los potenciales establecidos para los dos electrodos fueron 0.2 V y 0.4 V, respectivamente. Para evaluar la optimización y la precisión del ensayo HPLC-EC para el aislamiento y la detección de 8-oxo-dG, se registraron los cromatogramas apropiados de muestras y estándares al comienzo de cada día laboral. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

3.4.5.5. Cuantificación de 8-oxo-dG en orina por HPLC-EC

El método utilizado fue modificado a partir del descrito en Espinosa et al. (2007) (131). Después de descongelar 1 ml de orina, se añadieron 100 µl de solución de Tris-EDTA 3 mol/l (pH 8,6) a vortex mezclado durante 30 s. Se aplicó luego 1 ml del resultante a una columna Bond Elute C18 (OH) SPE (3 ml) que se había preparado con 3 ml de metanol y 3 ml de agua destilada (calidad HPLC). La columna se lava con 3 ml de agua seguidos de 3 ml de acetonitrilo al 2,5% y metanol al 1,5% en 10 mmol/L de tampón borato (pH 7,9). La muestra se eluyó a continuación con 3 ml del mismo tampón y se aplicó a una columna de intercambio catiónico fuerte Bond Elute (3 ml) preparada con 3 ml de metanol y 3 ml de tampón borato (pH 7,9). A continuación, se eluyó la 8-oxodG con 2 ml de tampón de acetonitrilo/metanol en borato y luego se ajustó a pH 6,0 con 1 mol/L de HCl. Alrededor de 4 ml de solución diclorometano/propano-2 (50:50) se añadieron a los 2 ml de eluyente y se mezcló en el vórtex durante 30 s. Las muestras se centrifugaron luego durante 10 min a 3500 rpm, la capa acuosa superior se aspiró y 3 ml de la capa orgánica residual se evaporaron hasta secado completo utilizando una cámara de vacío (Concentrator plus, Eppendorf AG, 2331 Hamburg) a 50°C. Finalmente, las muestras se reconstituyeron en 1 ml de tampón de ejecución de HPLC como anteriormente, pero sin acetonitrilo, y se inyectaron 50µl en la columna de HPLC. Las condiciones de funcionamiento y la detección de electroquímica fueron las mismas que las descritas para las muestras de suero. Los valores de 8-oxo-dG se expresaron como la relación a mmol/mol de creatinina cuantificada con el kit de ensayo colorimétrico de Cayman creatinina (urinario) (n ° 500701) como se describe por Borrego et al. (2013) (105). Los procedimientos de calibración fueron

los descritos por Espinosa et al. (2007) (131). Una solución acuosa de grado HPLC de 8-oxo-dG > 98% (TLC) adquirida de Sigma Aldrich Chemical Com. Saint Louis MO, EE. UU. (Número de referencia H5653) se utilizó como muestra estándar. Cada día de trabajo analizaron, seis muestras diferentes con concentraciones bajas y altas conocidas de 8-oxo-dG por duplicado. El coeficiente de variabilidad calculado intra e interdiario ensayo fue del 5%.

3.4.5.6. Análisis de F2-8-isoprostanos

Los niveles de F2-8-isoprostanos en la orina se cuantificaron siguiendo las especificaciones analíticas del ensayo ELISA de Cayman n ° 516351, y los resultados se expresaron como la relación con la concentración de creatinina (104).

3.5. RESUMEN DE LOS METABOLITOS ANALIZADOS, MUESTRA BIOLÓGICA ESTUDIADA Y MÉTODO ANALÍTICO UTILIZADO

En la siguiente tabla (tabla M-1) se resume las distintas técnicas utilizadas para la valoración de los metabolitos de EO (antioxidantes y productos de oxidación) en las muestras biológicas indicadas de los sujetos incluidos en este estudio.

Tabla M- 1. Metabolitos, muestra biológica y método de análisis para el estudio del estrés oxidativo

MDA: Malondialdehido; 8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosina; GSH: Glutación Reducido; GSSG: Glutación Oxidado; CAT; Catalasa, SOD: Superóxido Dismutasa; GPx: Glutación Peroxidasa; PAO: Capacidad Antioxidante del Plasma; CMNc: Células mononucleares circulantes.

METABOLITOS	MUESTRA BIOLÓGICA	MÉTODO DE ANÁLISIS
MDA	CMNc	HPLC-UV
F2-Isoprostanos	Orina	ELISA Kit Cayman Item nº 516351
8-oxo-dG	Orina/Suero/CMNc	HPLC-EC-UV/ Kit Cayman Item
Prot. Carboniladas	Suero	ELISA Kit Cayman Item nº 10005020
GSSG/GSH	CMNc Suero	HPLC-UV Espectrofotometría Kit Cayman Item nº 703002
CAT SOD GPx	CMNc	Espectrofotometría Kit Cayman Item nº 707002 Espectrofotometría Kit Cayman Item nº 706002 Espectrofotometría Kit Cayman Item nº 703102
PAO	Suero	ELISA Kit Cayman Item nº 709001

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARÁMETROS DE EO EN DISTINTAS EDADES

Para resumir las variables continuas se utilizan la media aritmética y la desviación estándar, si posee una distribución normal, o la mediana y el rango intercuartil si poseen una distribución que no es normal.

Para evaluar la normalidad de las distintas variables se usa el test de Kolmogorov-Smirnov, para muestras de tamaño $n > 50$, y Shapiro-Wilk para muestras de tamaño $n \leq 50$, así como histogramas y gráficos Q-Q de normalidad.

Para comparar variables continuas se utilizan la prueba t de Student para muestras independientes o pareadas, cuando se trata de variables con distribución normal, o la prueba U de Man-Whitney, la prueba de Wilcoxon de rangos asignados o la prueba de Kruskal-Wallis H cuando se trata de variables con distribución que no es normal.

Para determinar la asociación entre variables continuas se utiliza el test de correlación de Pearson.

Los resultados se dan como media \pm desviación estándar y en todas las pruebas estadísticas realizadas se utiliza un nivel de confianza del 95%, equivalente a un nivel de significación de $p < 0.05$.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando software comercial (SPSS, Versión 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EJERCICIO FÍSICO

La distribución de datos se probó con la prueba de Kolmogoro-Smirnov y con un análisis de diagrama de caja. Se utilizó una prueba de Wilcoxon de rango con signo para los datos con una distribución no normal para comparar los resultados dentro de cada grupo de datos pre y post entrenamiento. Para comparar las variables entre los grupos, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba U de Mann-Whitney para las variables distribuidas de forma no normal. Se usó un análisis de varianza de dos vías para medidas repetidas seguido de correcciones de Bonferroni para las comparaciones dentro del grupo y entre las variables con una distribución normal (GSH y TUG). El tamaño del efecto (ES) se calculó como la media post-entrenamiento menos la media preentrenamiento dividida por el conjunto de desviación estándar de los datos previos y posteriores al entrenamiento (229).

Un ES inferior a 0.2 se consideró un efecto trivial, 0.20-.49 un efecto pequeño, 0.50-0.79 un efecto moderado, y mayor a 0.80 un efecto grande (Cohen, 1988)(229). El porcentaje de incremento $\Delta\%$ se calculó con la fórmula estándar: $\text{cambio (\%)} = [(\text{puntaje posttest} - \text{puntaje previo a la prueba}) / \text{puntaje previo a la prueba}] \times 100$. Se aceptó un nivel de confianza del 95% (significación $p < 0,05$) como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando software comercial (SPSS, Versión 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Todos los datos se informan como las medias \pm las desviaciones estándar.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-ANTROPOMÉTRICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

Tabla R- 1. Características clínico-antropométricas de la población estudiada.

Parámetros de la población	Media+/-SD (n120)	Rango de normalidad
Hombre/Mujer	60/60	-
Edad	53,06±16,2	-
Peso(Kg)	73,2±11,6	-
Pr. Art. Sistólica (mmHg)	133,4±9,2	120-130
Pr. Art. Diastólica (mmHg)	82,21±11,27	80-85
IMC (Kg/m ²)	26,70±2,93	18,5-24,9
Glucemia basal (mg/dL)	100,2±11,4	70-105
Urea (mg/dL)	36,4±12,1	19-50
Creatinina (mg/dL)	0,78±0,19	0,7-1,2
GOT (UI/L)	24,3±16,3	5-34
GPT (UI/L)	21,7±10,2	1-55
GGT (UI/L)	23,8±15,8	H: 12-64 M:9-36
FAL (UI/L)	72,7±18,3	40-150
Colesterol total (mg/dL)	214,1±29,6	80-200
Colesterol HDL (mg/dL)	61,5±13,2	45-70
Colesterol LDL (mg/dL)	136,2±33,3	40-150
Triglicéridos (mg/dL)	106,4±39,8	30-150
Proteínas totales (g/dL)	7,3±0,6	6,4-8,3
Sodio (mEq/L)	140,8±2,0	136-145
Potasio (mEq/L)	4,5±0,4	3,5-5
Cloro (mEq/L)	104,9±2,5	100-111

2. VALORACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN DISTINTAS EDADES.

2.1. EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA SANGUÍNEO.

En la tabla R-2 se representan los resultados de las actividades de las principales enzimas antioxidantes, Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutación Peroxidasa y de la capacidad antioxidante total del plasma (PAO) en los tres grupos de sujetos con edades comprendidas entre 18 y 40 años (Grupo A), 41 y 60 años (Grupo B) y 61 y 90 años (Grupo C). Como se puede observar existe una tendencia a la disminución de actividades en las tres enzimas estudiadas y en la capacidad total del plasma si bien la intensidad de estas disminuciones es diferente dependiendo de tipo del parámetro antioxidante analizado.

Tabla R- 2. Actividades antioxidantes de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD), Glutación Peroxidasa (GPx)

Metabolito	18 a 40 años (n= 25) A	41 a 59 años (n= 54) B	60 a 90 años (n= 41) C
SOD (U/mg Prot)	5,08 ± 0,07	4,97 ± 0,65 (-3%)	4,70 ± 0,82 ** (-8%)
GPx (U/g Prot)	55,42 ± 11,76	53,22 ± 11,76 ** (-4%)	51,53 ± 8,81*** +++ (-7%)
CAT (U/g Prot)	270,039 ± 20,99	238,72 ± 28,05 *** (-12%)	205,19 ± 28,70 *** +++ (-24%)
PAO (µmol/l plasma)	269 ± 3,99	250 ± 0,05 *** (-7%)	210 ± 0,09 *** +++ (-22%)

Los resultados se expresan como media +/- SD con el número de experimentos (n) de cada grupo de edad. Entre paréntesis de señala el porcentaje de cambio (+ o -) con respecto al valor del grupo de edad entre 18 y 40 años como valor de referencia (100%). *** p <0,001 y ** p <0,05 comparando los grupos B y C con A. +++ p <0,001 comparando B con C.

La actividad SOD disminuyó en el grupo de adultos de edad entre 41 y 60 años en un 3% no siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, en el grupo de mayor edad, (Grupo C), los valores de la SOD, en las células mononucleares circulantes, representa un 8% menos en comparación con el grupo de sujetos de edades comprendidas entre 18 y 40 años (Grupo A) y alcanza significancia estadística ($p < 0,05$). (Figuras R-1 y R-5).



Figura R- 1. Cambio en la actividad de SOD en adultos de distintas edades.

Los resultados se expresan como medias \pm SD señalados en la tabla R-2. ** $p < 0,05$ comparando el grupos C con A.

La actividad GPx sigue una tendencia parecida con un descenso del 4% y 7% con respecto al valor del grupo A en los sujetos adultos más mayores, grupos B y C respectivamente. En este caso las diferencias estadísticas se observan ya en el grupo de sujetos entre 41 y 60 años (Grupo B) ($p < 0,05$) y ésta aumenta en los sujetos de edad más avanzada (Grupo C) ($p < 0,001$). También existe una diferencia significativa entre el grupo B y C ($p < 0,001$) indicando que la actividad

de esta enzima se reduce todavía más en el grupo de edad comprendida entre 61 y 90 años (Figura R-2).

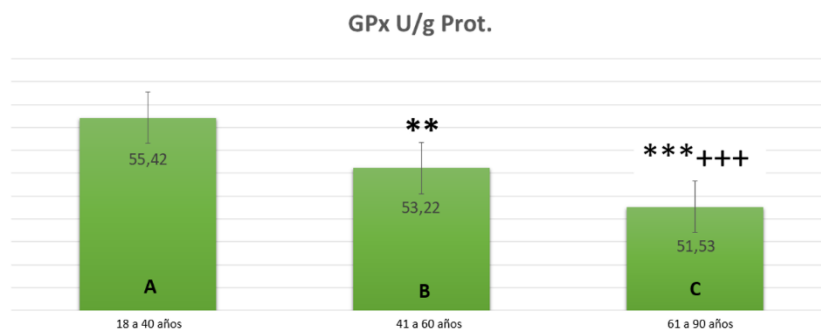


Figura R-2. Cambio en la actividad de GPx en adultos de distintas edades

Los resultados se expresan como medias \pm SD señalados en la tabla R-2. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparando los grupos B y C con A. +++ $p < 0,001$ comparando B con C.

La actividad de la enzima catalasa presenta una disminución más marcada conforme se avanza en edad en comparación con lo observado con las actividades anteriores. Con respecto al grupo de sujetos más jóvenes, esta actividad disminuye un 12% en el grupo B y un 24% en el C con un valor estadístico de $p < 0,001$ pasando de 270 U/g.prot a 238 U/g.prot y 205 U/g.prot respectivamente. También en este caso existe diferencia significativa ($p < 0,001$) al comparar el grupo B con el C (Figura R-3).

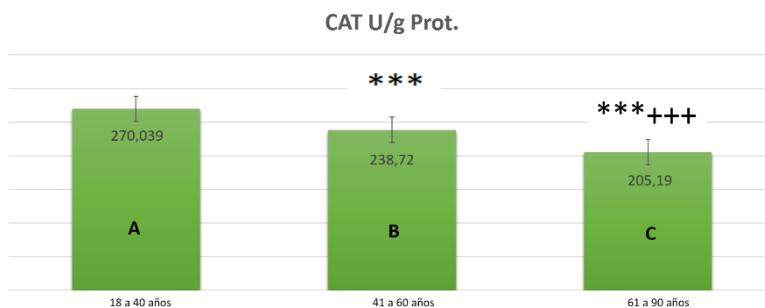


Figura R- 3. Cambio en la actividad de catalasa en adultos de distintas edades

Los resultados se expresan como medias \pm SD señalados en la tabla R-2. *** $p < 0,001$ comparando los grupos B y C con A. +++ $p < 0,001$ comparando B con C

La capacidad antioxidante total del plasma disminuye progresivamente con la edad de los sujetos estudiados, disminuyendo en un 7% en el grupo B y un 22% en el grupo C con respecto a la población de menor edad (Grupo A) ($p < 0,001$). Existe diferencia entre los grupos B y C ($p < 0,001$) comprobándose la tendencia a la disminución de la defensa antioxidante total a medida que se avanza en edad. (Figura R-4).

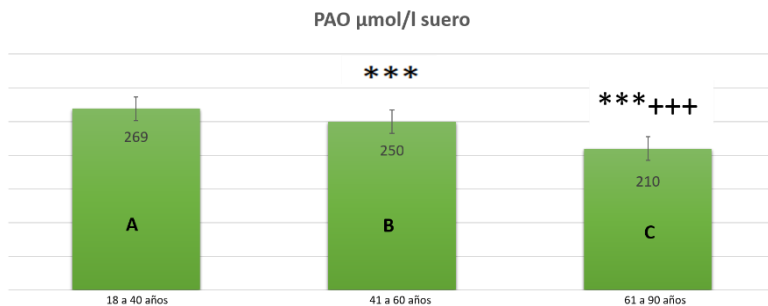


Figura R- 4. Cambio en PAO en adultos de distintas edades

Los resultados se expresan como medias \pm SD y número de experimentos señalados en la tabla R-2. *** p <0,001 comparando los grupos B y C con A. +++ p <0,001 comparando B con C.

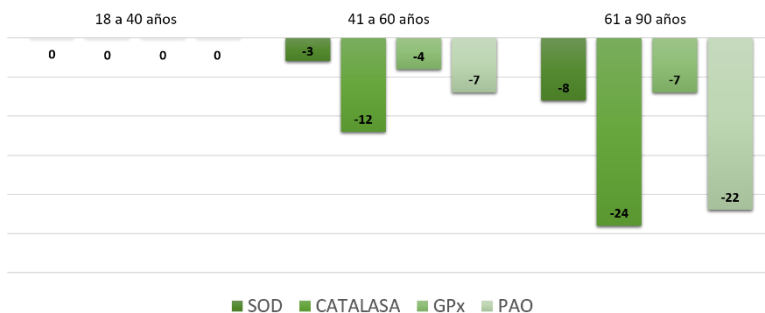


Figura R- 5. Porcentaje de cambio en las actividades enzimáticas en función de la edad de la población estudiada.

Valores porcentuales calculados a partir de la media de actividades representados en la tabla R-2.

2.2. NIVELES DE GLUTATIÓN Y ESTADO REDOX EN CÉLULAS CMNc.

El sistema del glutatión, formado por el **glutatión reducido (GSH)**, la **enzima glutatión peroxidasa (GPx)** y uno de los productos de esta enzima, el **glutatión oxidado (GSSG)**, constituye el mecanismo de defensa antioxidante y regulador redox más importante de las células aerobias, además de representar uno de los marcadores más importantes de EO. Su mantenimiento funcional, por lo tanto, es de gran importancia y necesario para la homeostasis de los seres vivos. En la tabla R-3 se muestran las concentraciones y los cambios que tienen lugar en los metabolitos GSH, GSSG y relación GSSG/GSH% desde la edad madura hasta la edad más avanzada. El antioxidante GSH tiende a disminuir en los grupos de mayor edad (Grupos B y C) con respecto al grupo de menor edad (Grupo A). Con una disminución muy discreta en el primer caso y más marcada y significativa ($p < 0,001$) en el segundo con un porcentaje de disminución del 10%. Esta disminución se corresponde con un aumento progresivo de su producto oxidado GSSG, si bien, en este caso las diferencias no son significativas a pesar del incremento observado del 42%. Sin embargo, el cambio en el equilibrio redox, indicado por la relación GSSG/GSH, si es significativa en el grupo de mayor edad (Grupo C) con un porcentaje de incremento significativo ($p < 0,001$) del 30%. Estos resultados apuntan hacia un estado de oxidación progresivo a medida que se avanza en edad) (Figuras R-6 y R-7).

Tabla R- 3. . Niveles intracelulares de GSH, GSSG y relación GSSG/GSH% en grupos de distintas edades.

Metabolito	18 a 40 años (n= 25) A	41 a 59 años (n= 54) B	60 a 90 años (n= 41) C
GSH (nmol /mg Prot)	23,05 ± 3,291	22,94 ± 3,31 (-1%)	20,74 ± 3,52 *** (-10%)
GSSG (nmol/ mg Prot)	0,175 ± 0,02	0,24 ± 0,08 (+37%)	0,25 ± 0,06 (+42%)
GSSG/GSH %	0,96 ± 0,21	1,08 ± 0,25 (+12%)	1,25 ± 0,33 *** (+30%)

Los resultados se expresan como media +/- SD con el número de experimentos (n) de cada grupo de edad. Entre paréntesis se señala el porcentaje de cambio (+ o -) con respecto al valor del grupo de edad entre 18 y 40 años como valor de referencia (100%). GSH: Glutación reducido; GSSG: Glutación oxidado. *** p <0,001 comparando el grupo C con A.

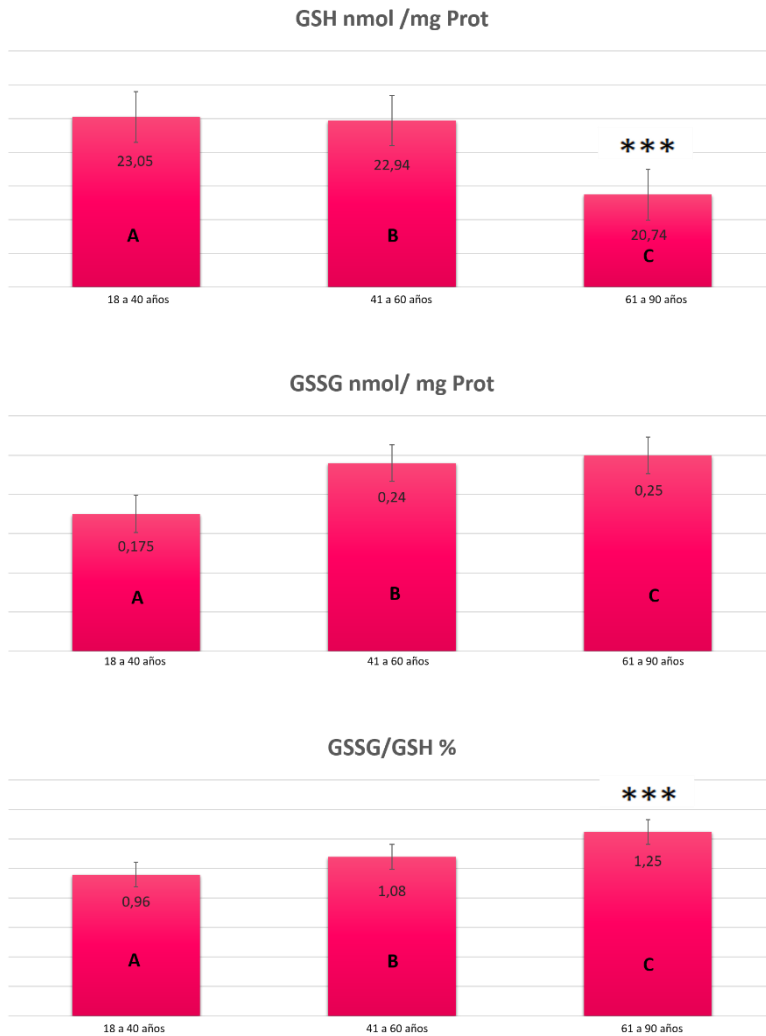


Figura R- 6. Cambios en los niveles de GSH, GSSG y relación GSSG/GSH% en células mononucleares circulantes de personas mayores.

Los resultados se expresan como medias \pm SD y número de experimentos señalados en la tabla R-3. *** $p < 0,001$ comparando el grupos C con A.

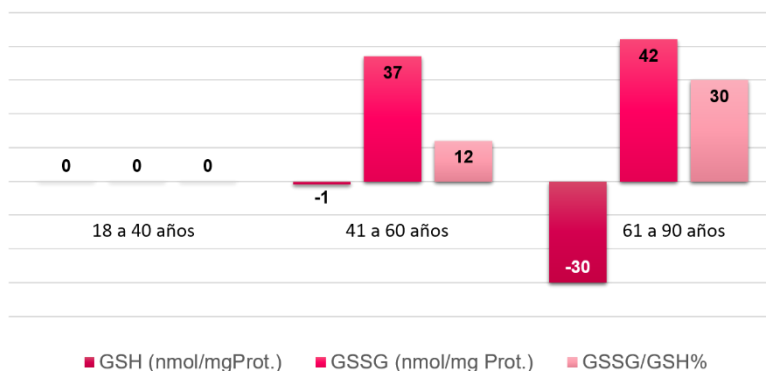


Figura R- 7. Porcentaje de cambio de los niveles de GSH, GSSG y estado redox GSSG/GSH% en la células mononucleares circulantes

Valores porcentuales calculados a partir de la media de actividades representados en la tabla R-3

2.3. CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS. MDA Y F2-ISOPROSTANOS

Correspondiendo con la disminución de las actividades antioxidantes tanto individuales como total del plasma, así como con la reducción de los niveles intracelulares de GSH y el aumento de la relación GSSG/GSH%, se observa, como resultado un aumento de los productos de oxidación de lípidos en las CMNc. **El malondialdehído (MDA)** aumenta a medida que se avanza en edad con valores significativos (**p<0,001) con respecto a la población más joven en el grupo de edades comprendidas entre 61 y 90 años (Figura R-8).

Los **F2-Isoprostanos (F2-IsoP)** representan una familia de productos de peroxidación del ácido araquidónico y está considerado un metabolito específico de la modificación oxidativa de lípidos. Su concentración aumenta un 10% y un 52% en los grupos B y C

(***p<0,001) respectivamente con respecto al grupo A de menor edad (Figura R-9). Estos resultados demuestran la peroxidación lipídica inducida por ROS que se va produciendo a medida que avanzamos en edad (Tabla R-4 y figuras R-8, R-9 y R-11).

Tabla R- 4. Niveles intracelulares y en orina de los productos de peroxidación lipídica MDA y F2-IP en grupos de personas adultas de distintas edades.

Metabolito	18 a 40 años (n= 25)	41 a 59 años (n= 54)	60 a 90 años (n= 41)
	A	B	C
MDA (nmol/ mg Prot)	0,19 ± 0,046	0,22 ± 0,07 (+15%)	0,23 ± 0,01 *** (+21%)
F2-IP (Pg/mmol crea)	39,660 ± 7,14	43,66 ± 4,80 (+10%)	60,55 ± 3,91 *** (+52%)

Los resultados se expresan como media +/- SD con el número de experimentos (n) de cada grupo de edad. Entre paréntesis se señala el porcentaje de cambio (+ o -) con respecto al valor del grupo de edad entre 18 y 40 años como valor de referencia (100%). MDA: Malondialdehído; F2-IP: F2-Isoprostanos. *** p <0,001 comparando el grupo C con A.

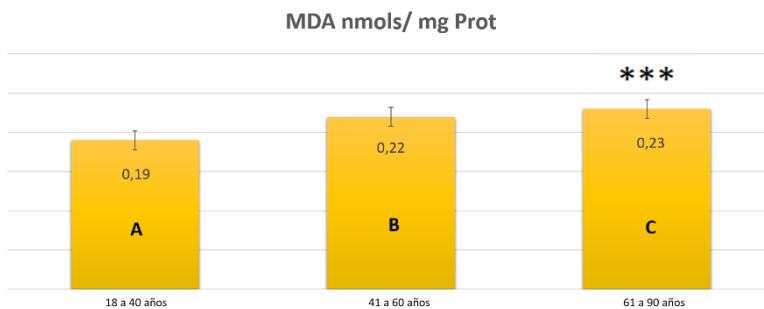


Figura R- 8. Cambios en los niveles de MDA en células mononucleares circulantes de personas adultas con distintas edades.

Los resultados se expresan como medias ± SD y número de experimentos señalados en la tabla R-4. *** p <0,001 comparando el grupo C con A.

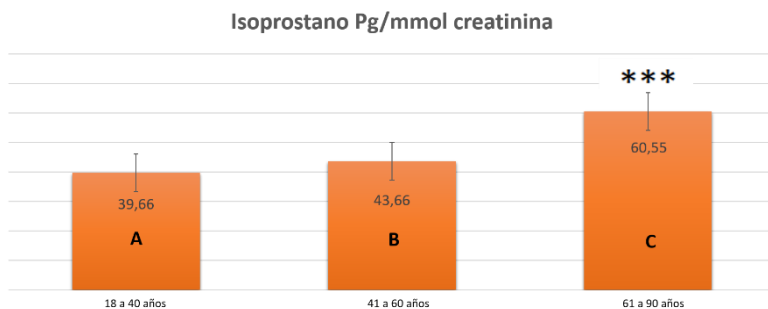


Figura R- 9. Cambios en los niveles de isoprostanos en orina de personas adultas con distintas edades.

Los resultados se expresan como medias \pm SD y número de experimentos señalados en la tabla R-4. *** $p < 0,001$ comparando el grupo C con A.

2.4. NIVELES DE PROTEÍNAS CARBONILADAS.

En lo que respecta a las proteínas, su marcador de oxidación por ROS más específico, los grupos carbonilos o proteínas carboniladas (Prot. Carboniladas) sigue una tendencia parecida al aumentar ligeramente con respecto al grupo de sujetos más jóvenes (Grupo A) hasta hacerse significativo, su aumento, en las personas de mayor edad (Grupo C) (Tabla R-5 y figura R-10 y R-11).

Tabla R- 5. Niveles intracelulares de proteínas carboniladas en grupos de personas adultas de distintas edades.

Metabolito	18 a 40 años (n= 25) A	41 a 59 años (n= 54) B	60 a 90 años (n= 41) C
Prot. Carboniladas (nmol/ mg Prot)	0,19 \pm 0,018	0,20 \pm 0,02 (+5%)	0,21 \pm 0,08 ** (+10%)

Los resultados se expresan como media \pm SD con el número de experimentos (n) de cada grupo de edad. Entre paréntesis de señala el porcentaje de cambio (+ o -) con respecto al valor del grupo de edad entre 18 y 40 años como valor de referencia (100%). ** $p < 0,05$ comparando el grupos C con A.

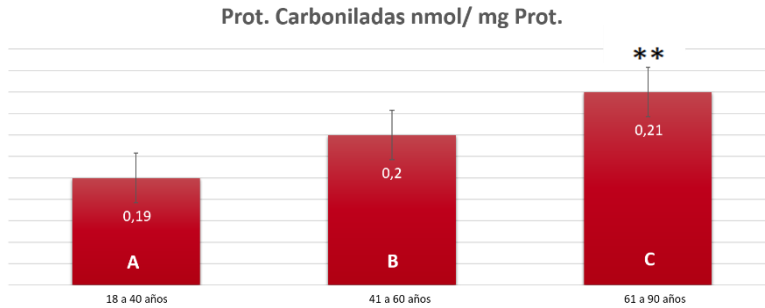


Figura R- 10. Cambios en los niveles de proteínas carboniladas en células mononucleares circulantes y en la orina de adultos de distintas edades.

Los resultados se expresan como medias \pm SD y número de experimentos señalados en la tabla R-5. ** $p < 0,05$ comparando el grupo C con A.

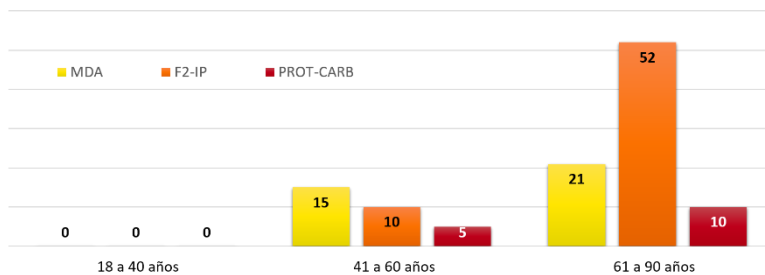


Figura R- 11. Porcentaje de cambio en los niveles de MDA, F2-IP y Proteínas Carboniladas en función de la edad

Valores porcentuales calculados a partir de la media de actividades representados en la tabla R-4 y R-5

2.5. VALORACIÓN DE LA OXIDACIÓN DEL ADN EN CMNC, SUERO Y ORINA EN DISTINTAS EDADES.

Este análisis es especialmente relevante si tenemos en cuenta las implicaciones fisiopatológicas de la oxidación del ADN. Se valoró la cantidad del **producto de oxidación, 8-oxo-dG**, tanto in situ, es decir, la proporción de esta base oxidada en la cadena de ADN nuclear extraído de CMNc, como su producto de reparación liberado en suero y en orina (Tabla R-6). Como se puede observar, la oxidación del ADN genómico en las células circulantes aumenta en los grupos de mayor edad con respecto a los sujetos más jóvenes con incrementos de 6% y 48% en los grupos B y C, con valores significativos en este último (**p<0,001) (Figura R-12).

Tabla R- 6. Niveles intracelulares, orina y suero de 8-oxo-dG en los tres grupos de edades.

Metabolito	18 a 40 años (n= 25) A	41 a 59 años (n= 54) B	60 a 90 años (n= 41) C
8-oxo-dG/ 10⁶ dG	3,54 ± 0,75	3,77 ± 0,70 (+6%)	5,26 ± 0,62 *** (+48%)
8-oxo-dG nmol / mmol creatinina	1,63 ± 0,37	2,38 ± 0,78*** (+46%)	3,27 ± 0,34 ***+++ (+100%)
8-oxo-dG ng/ml suero	0,25 ± 0,0	0,29 ± 0,05 ** (+16%)	0,37 ± 0,044 *** +++ (+48%)

Los resultados se expresan como media +/- SD con el número de experimentos (n) de cada grupo de edad. Entre paréntesis se señala el porcentaje de cambio (+ o -) con respecto al valor del grupo de edad entre 18 y 40 años como valor de referencia (100%). *** p <0,001 y ** p <0,05 comparando los grupos B y C con A. +++ p <0,001 comparando B con C.

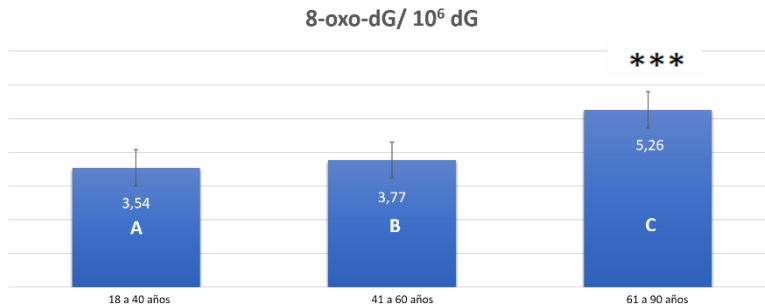


Figura R- 12. . Niveles de la base modificada 8-oxo-dG en células mononucleares de personas adultas

Los resultados se expresan como medias \pm SD y número de experimentos señalados en la tabla R-6. *** $p < 0,001$ comparando el grupo C con A.

La reparación del ADN tiene su expresión en la presencia de este metabolito tanto en suero como en orina donde finalmente se concentra y elimina. Los niveles de 8-oxo-dG en suero aumentan un 16% y un 48% en los grupos de sujetos de mayor edad (Grupo B y C) con respecto al grupo de menor edad (Grupo A) con diferencias significativas ** $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ respectivamente (Figura R-13).

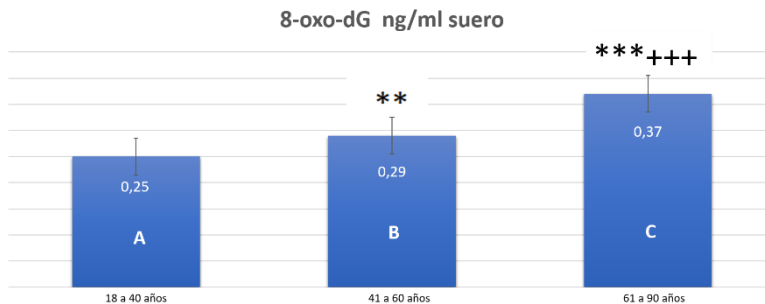


Figura R- 13. . Niveles de la base 8-oxo-dG en suero de personas adultas

Los resultados se expresan como medias \pm SD y número de experimentos señalados en la tabla R-2. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,05$ comparando los grupos B y C con A. +++ $p < 0,001$ comparando B con C.

Los niveles urinarios de 8-oxo-dG siguen el mismo patrón de comportamiento, aunque de una forma más marcada y significativa. Llama la atención los incrementos que se observan del 46% y 100% en los grupos de edades entre los 41 y 60 años y 61 y 90 años respectivamente en ambos casos con una diferencia estadísticamente significativa de $***p < 0,001$. Por otra parte, en el grupo de edad más avanzada (Grupo C) existe también una diferencia significativa ($+++p < 0,001$) con respecto al grupo de edad intermedia (Grupo B) (Figura R-14).

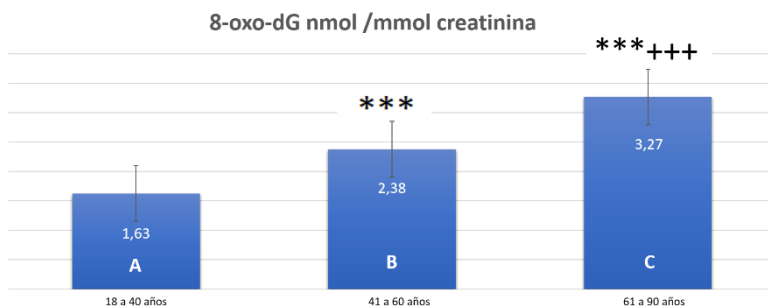


Figura R- 14. Niveles de la base 8-oxo-dG en orina de personas adultas

Los resultados se expresan como medias \pm SD y número de experimentos señalados en la tabla R-2. $*** p < 0,001$ y $**$ comparando los grupos B y C con A. $+++ p < 0,001$ comparando B con C

Este incremento del 100% en las etapas más avanzadas de la vida puede estar en relación con el aumento de la incidencia de enfermedades neoplásicas pero también es indicador de un mecanismo de reparación conservado en las personas mayores que llegan a estas edades sin patologías asociadas (Figura R-15).

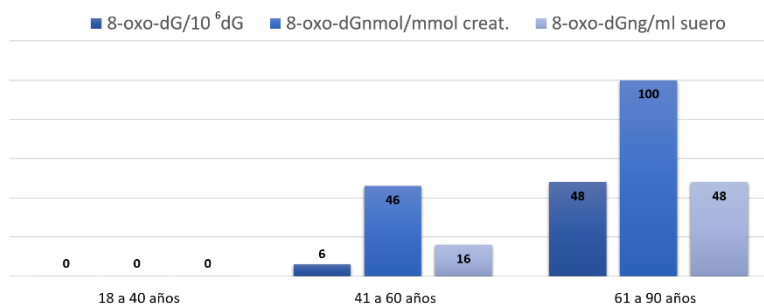


Figura R- 15. . Porcentaje de cambio en los niveles de 8-oxo-dG en células mononucleares circulantes, orina y suero en los grupos de diferente edad.

Valores porcentuales calculados a partir de la media de actividades representados en la tabla R-6.

2.6. ESTUDIO DE CORRELACIONES ESTADÍSTICAS.

En el anexo-1 de esta memoria se representan todas las correlaciones estadísticas realizadas comparando tanto los niveles de metabolitos analizados en distintos medios biológicos como sus cambios con las edades de los sujetos estudiados.

En la tabla R-7 se muestran las correlaciones más significativas.

Tabla R- 7. Resumen de las significancias de la correlación de F2-IsoP y 8-oxo-dG en orina con el resto de parámetros.

Metabolito	8-oxo-dG	F2-IP	GSH	GSSG/GSH%	GPx	Edad	Muestra
F2-IP	**p	--	**p	*p	---	**p	orina
8-oxo dG	--	**p	**p	**p	**p	**p	orina

Los resultados estadísticos se presentan en el Anexo I. F2 IP, pg/mmol creatinina.; 8-oxo-dG, nmol/mmol creatinina, GSH, nmol/mg/prot; GPx, U/g; * p<0,05; ** p<0,01.

Resultados

En las figuras R-16 a R-19 se presentan las correlaciones de los distintos metabolitos de EO comparados entre si y de éstos con el conjunto total de edades estudiadas (18 a 90 años). En la figura R-16 se muestra la correlación estadísticamente significativa que existe entre los niveles en orina de F2-IP y 8-oxo-dG ($p < 0,01$), y de F2-IP en orina con la concentración intracelular de GSH ($P < 0,01$) y la relación GSSG/GSH% ($P < 0,05$).

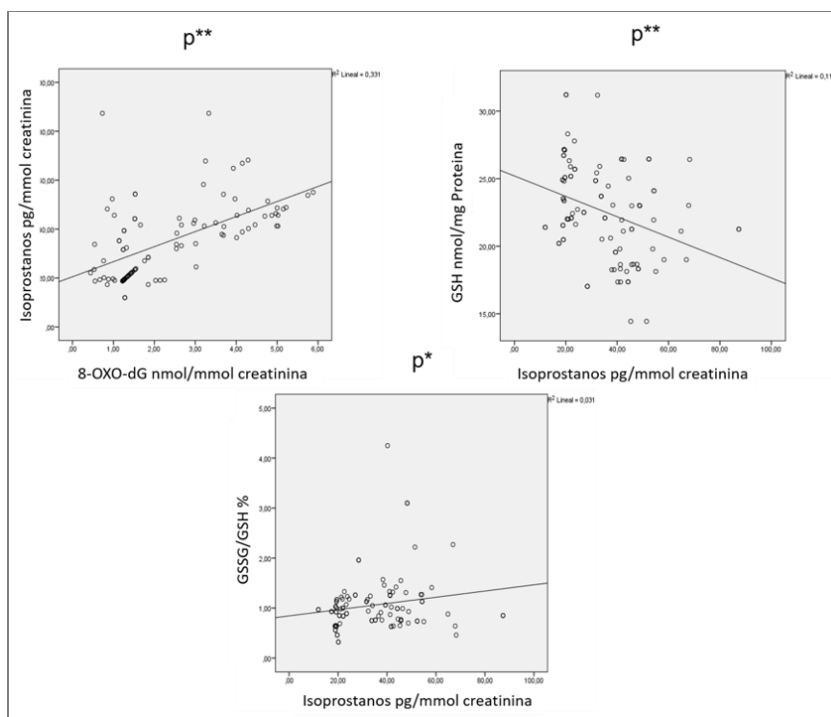


Figura R- 16. Correlación de los niveles de F2-IsoP/creat y los niveles de 8-oxo-dG/creat (A), concentración intracelular de GSH (B) y relación GSSG/GSH% (C); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Por su parte, los niveles de 8-oxo-dG en la orina correlaciona con la concentración intracelular de GSH, relación GSSG/GSH% y la actividad de la enzima GPx con una significancia estadística en todos los casos de $**p < 0,01$ (Figura R-17).

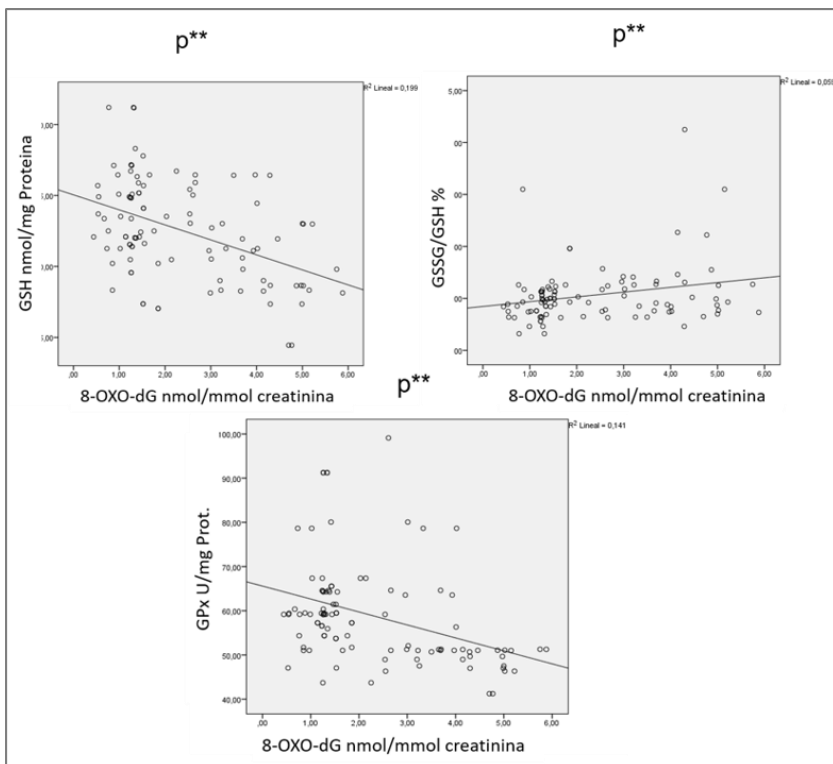


Figura R- 17. Correlación de los niveles de 8-oxo-dG/creat. con las concentraciones intracelulares de GSH (A), GSSG/GSH% (B) y GPx (C); $**p < 0,01$.

En las figuras R-18 y R-19 aparecen las correlaciones de ambos metabolitos F2-IP y 8-oxo-dG con el conjunto total de edades, entre los 18 hasta los 90 años. Ambos metabolitos correlacionan con la edad con una significancia de $*p < 0,05$ (figura R-18).

Sin embargo, también correlacionan con la edad de los individuos el GSH, la relación GSSG/GSH% y la enzima antioxidante GPx pero en este caso con una significancia de $**p < 0,01$ (tabla R-8) (figura R-19).

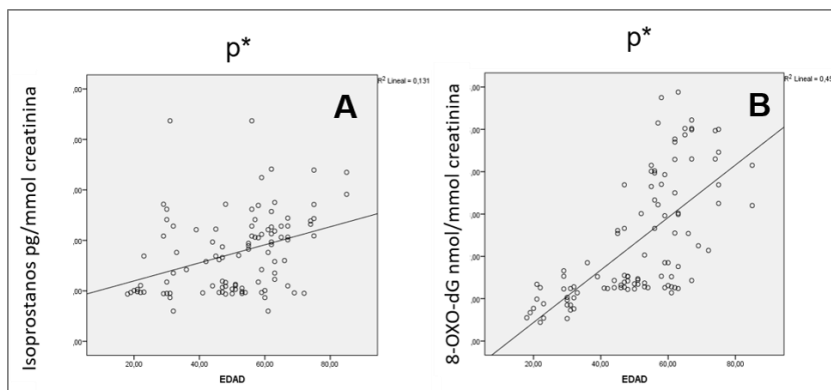


Figura R- 18. Correlación entre los productos de modificación oxidativa F2-IP (A) y 8-oxo-dG (B) con la edad de la población estudiada (18 a 90); $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Tabla R- 8. Correlaciones de los distintos metabolitos con la edad.

Metabolito	8-oxo-dG	F2-IP	GSH	GSSG/GSH%	GPx
Edad	$**p$	$**p$	$**p$	$**p$	$**p$

Los resultados estadísticos se presentan en el Anexo I. F2 IP, pg/mmol creatinina.; 8-oxo-dG, nmol/mmol creatinina, GSH, nmol/mg/prot; GPx, U/g; $**p < 0,01$.

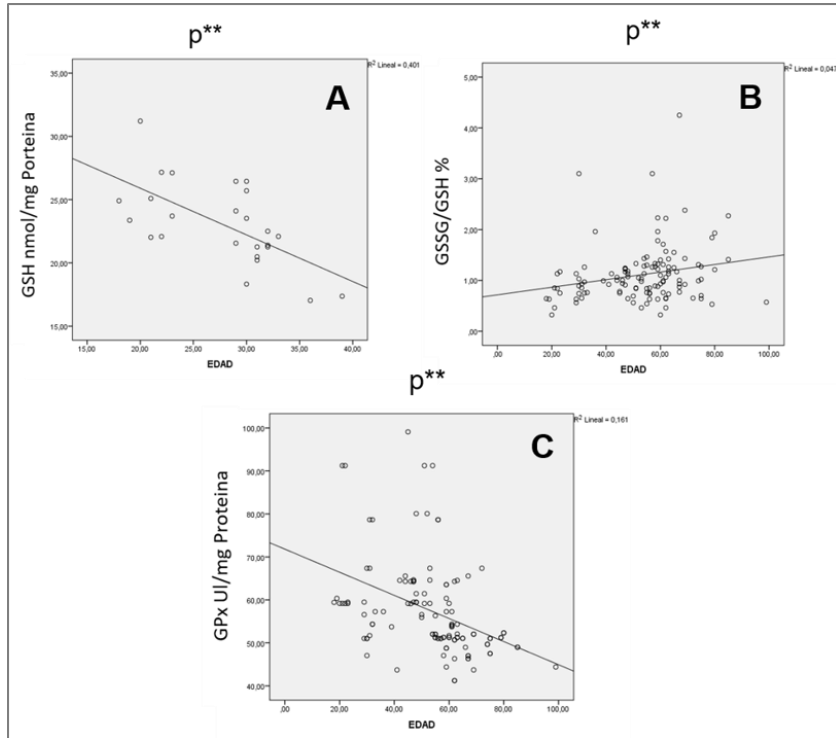


Figura R- 19. Correlación entre los metabolitos del sistema Glutación con la edad de la población estudiada (18 a 90).

Correlaciones de la Edad con: **A:** GSH, **B:** GSSG/GSH y **C:** GPx; ** $p < 0,01$.

3. ESTUDIO DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA ACTIVIDAD FÍSICA Y PARAMETROS DE EO.

Para el estudio del efecto del ejercicio físico se han seleccionado dos metabolitos como indicadores de oxidación a nivel sistémica: la relación GSSG/GSH en células mononucleares circulantes y la base modificada 8-oxo-dG en orina puntual en el grupo control y en el grupo de entrenamiento en estado basal y después del ejercicio de resistencia.

En el presente estudio, examinamos cómo el EO responde a diferentes intensidades (cantidad de resistencia empleada) de ejercicio durante 16 semanas de programa de entrenamiento de la fuerza (RTP) con bandas elásticas en mujeres mayores para mejorar nuestra comprensión de la relación dosis-respuesta de la intensidad del ejercicio con el EO.

3.1. FLUJO DE PARTICIPANTES Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO ANTROPOMÉTRICAS DE LA POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN CON EJERCICIO FÍSICO.

En la figura R-20 se muestran los detalles del flujo de participantes en el estudio.

Debido a la baja cantidad de hombres en el grupo de alta intensidad (ALTO, 6 repeticiones) (n=3) que podría haber afectado la detección de diferencias entre grupos con el nivel de confianza y poder estadístico requerido en el presente estudio, decidimos excluir a los hombres de los análisis presentados aquí. Además, el tamaño desigual de muestra entre grupos en el caso de los hombres (ALTO: n= 3; MOD, 15 repeticiones: n = 9; y CG: n = 14) podría afectar la estadística (decreciente) y las tasas de error Tipo I (aumentando).

Por otra parte, debido al alto coste de los análisis de biomarcadores del sistema operativo, solo 70 muestras de sangre y 60 las muestras de orina se recolectaron inicialmente. Al final de la intervención, disponíamos de 63 muestras de mujeres mayores. (ALTO: n =24, MOD: n =20 y CG: n =19) y 50 muestras de orina (ALTO: n = 20, MOD: n = 16, y CG: n = 14). Las muestras se distribuyeron por igual entre los grupos según la proporción de mujeres que fueron inicialmente asignadas a cada grupo (ALTO> MOD> CG), con la intención de hacer que el tamaño de la muestra sea lo más similar posible entre los tres grupos con respecto a la proporción inicial. Ninguno de los desertores abandonó el programa como resultado de lesiones o respuestas adversas al tratamiento.

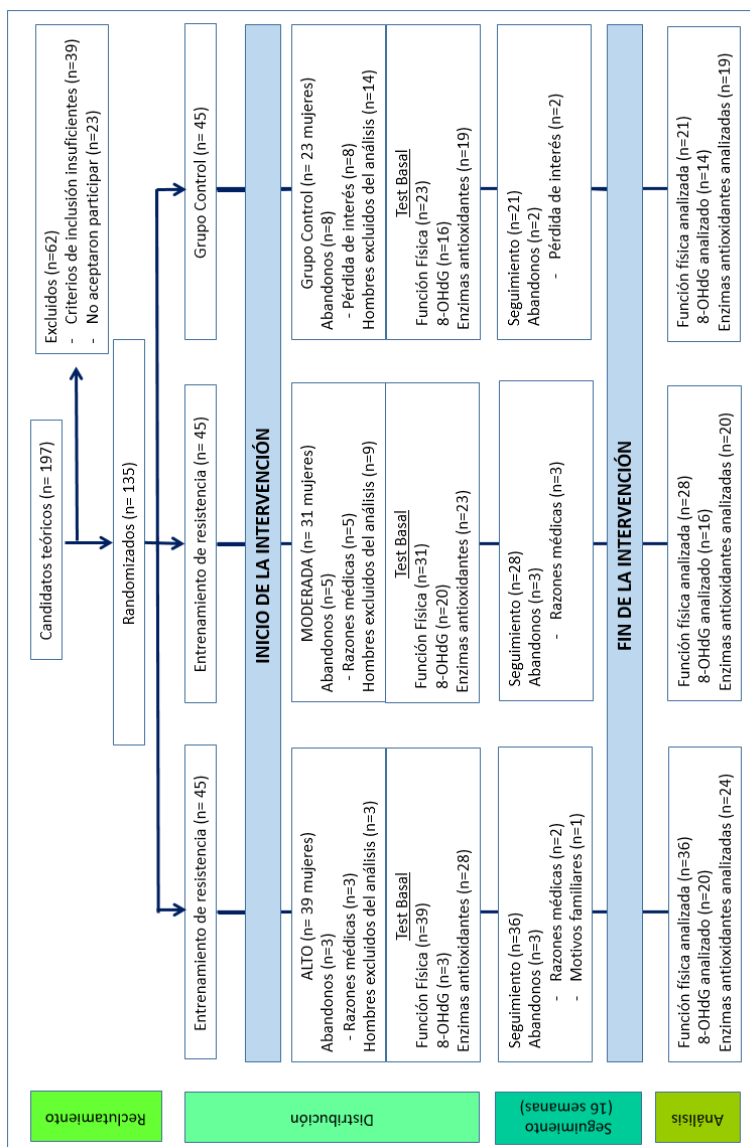


Figura R- 20. Diagrama de flujo de participación

CG: grupo de control; RTP: programa de entrenamiento de resistencia; ALTO: grupo de alta intensidad (6 repeticiones); MOD: grupo de intensidad moderada (15 repeticiones); 8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

El seguimiento incluyó todas las medidas de la prueba de referencia para los dos grupos experimentales, pero solo la función física para el GC, ya que se esperaba que las medidas de 8-oxo-dG y antioxidantes mostraran pocos cambios en este grupo durante el período de estudio.

La tasa de asistencia para el programa de ejercicios fue muy similar para los dos grupos: 83,33% para ALTO y 83,74% para el grupo MOD (30 de 36 sesiones, incluida las sesiones de familiarización, en ambos casos), y la tasa de adherencia al estudio superior al 90% en los tres grupos (ALTO: 92,30%, MOD: 90,32% y CG: 91,30%).

Las características basales de los sujetos se presentan en la tabla R-9. Al inicio del estudio, la edad, las características antropométricas, el estado redox y el tiempo TUG ($p > 0,05$) no difirió entre los grupos de intervención (Tablas R-9, R-10 y R-11). Las comparaciones entre grupos revelaron diferencias entre el grupo ALTO y CG para el Arm Curl ($p = 0,008$), entre ambos grupos de intervención y el CG para el Chair Stand (ALTO: $p = 0,002$; MOD: $p = 0,001$), y entre grupos de entrenamiento ($p = 0,015$) y MOD versus CG ($p = 0,029$) para 6MWT (Tabla R-11).

Tabla R- 9. Características bioquímicas de la población estudiada.

Parámetro	Media	±SD	Rango normalidad
Glucosa (mg/dL)	105,4	22,0	70-105
Urea (mg/dL)	38,9	11,1	19-50
Creatinina (mg/dL)	0,8	0,2	0,7-1,2
GOT (UI/L)	23,6	15,7	5-34
GPT (UI/L)	20,5	9,6	1-55
GGT (UI/L)	25,0	23,8	H: 12-64 M: 9-36
FAL (UI/L)	69,7	17,2	40-150
Sodio (mEq/L)	140,8	2,0	136-145
Potasio (mEq/L)	4,6	0,4	3,5-5
Cloro (mEq/L)	104,9	2,5	110-111
Colesterol total (mg/dL)	201,8	38,4	80-200
HDL-colesterol (mg/dL)	54,4	12,3	45-70
LDL-colesterol (mg/dL)	125,1	33,0	40-150
Triglicéridos (mg/dL)	110,1	45,0	30-150
Proteínas (g/dL)	7,1	0,5	6,4-8,3

Tabla R- 10. Características antropométricas de la población estudiada

Características	ALTO (n =39)	MOD (n = 31)	CG (n = 23)
Edad (años)	71,10 ± 5,30	68,74 ± 6,05	70,46 ± 8,10
Peso (kg)	64,67 ± 10,12	67,35 ± 10,68	66,73 ± 8,63
Altura (m)	1,52 ± 0,04	1,53 ± 0,06	1,52 ± 0,04
BMI (kg/m ²)	28,10 ± 4	29,20 ± 4,80	29,13 ± 3,95
Masa Grasa (%)	36,56 ± 6,31	38,48 ± 6,53	39,27 ± 5,61

Los datos se presentan como la media +/- desviación estándar. IMC: índice de masa corporal; CG: grupo de control; ALTO: grupo de alta intensidad (6 repeticiones); MOD: grupo de intensidad moderada (15 repeticiones).

Los cambios en la función física en los diferentes momentos del estudio se presentan en la tabla R-11. Se observa que hubo un importante efecto del tiempo ($p < 0,05$) para todas las pruebas de función física en ambos grupos de entrenamiento (ALTO y MOD), pero sin efectos significativos entre ellos por tiempo de intervención (entre los grupos de intensidad ALTO y MOD).

Las mejoras obtenidas después del programa de entrenamiento de resistencia (RTP) en ambos grupos para el Arm Curl (brazo curvado), el Chair Stand (soporte de la silla) y TUG mostraban grandes Effect Size (ES). Para el 6MWT, las mejoras tenían un pequeño ES en el caso del grupo MOD y ES moderada en el caso del grupo ALTO. Se encontró un efecto significativo para la interacción Grupo x Tiempo para Arm Curl entre MOD y CG. El CG mostró una

mejora significativa en la fuerza de la extremidad superior (ES: 0,42), pero no hubo cambios significativos para las otras pruebas.

Tabla R- 11. Efecto de intervención de la actividad física.

Prueba	Grupo	Basal	Post test	p Valor (tiempo)	Δ %	ES
Arm Curl (rep)	ALTO (n=36)	15,06 + 3,48§	23,92 + 3,91§	.000	+58,85	2,39
	MOD (n=28)	16,71 + 4,28	26,21 + 5,18§	.000	+56,83	1,99
	CG (n=21)	18,32 + 5,82	20,77 + 5,92	.002	+13,39	0,42
Chair Stand (rep)	ALTO (n ¼ 36)	12,50 + 2,58§	19,39 + 3,33§	.000	+55,11	2,31
	MOD (n=28)	11,93 + 2,72§	18,57 + 3,80	.000	+55,68	2,01
	CG (n=21)	15,45 + 5,24	16,91 + 7,11	.176	+9,41	0,23
TUG (s)	ALTO (n=36)	6,60 + 0,90	5,96 + 0,69	.000	-9,71	-0,80
	MOD (n=28)	7 + 1,00	5,83 + 0,64	.000	-16,74	-1,39
	CG (n=21)	6,51 + 1,37	6,26 + 1,89	.339	-3,84	-0,15
6MWT (m)	ALTO (n=36)	486,66 + 47,82*	514,50 + 54,42	.002	+5,71	0,54
	MOD (n=28)	529,67 + 59,85§	548,82 + 59,98§	.000	+3,61	0,32
	CG (n=21)	464,59 + 101,39	477,40 + 98,90	.266	+2,75	0,23

Los datos se presentan como la media + desviación estándar. Δ%: porcentaje de cambio de pre a posttest; 6MWT: 6 min walk test; Arm Curl: 30-s Arm Curl Test; CG = grupo control; Chair Stand: 30-s Chair Stand Test; ALTO: grupo de alta intensidad (6 repeticiones); MOD: grupo de intensidad moderada (15 repeticiones); rep: repeticiones; s: segundos; m: minutos; TUG: 8-Foot-Up-and-Go Test;

* Significativamente diferente de MOD ($p \leq 0,05$); § significativamente diferente de CG ($p \leq 0,05$).

3.2. DAÑO DE ADN Y ESTADO REDOX.

La tabla R-12 y figura R-21 muestra los resultados de la actividad redox por grupo en los diferentes puntos de tiempo del estudio.

Respecto al estado redox, los resultados mostraron una disminución significativa (- 10,91%, $p = 0,002$) en el GSH en el grupo ALTO (pre: $22,71 \pm 3,83$ nmol/mg de proteína, post $20,23 \pm 3,35$ nmol/mg de proteína; ES -0,69) y no hubieron cambios significativos (- 0,74%, $p = 0,857$) en el grupo MOD (pre: $20,84 \pm 3,15$ nmol/mg de proteína, post $20,69 \pm 4,22$ nmol/mg de proteína; ES = -0,04).

Los valores basales de GSH en el CG fueron $22,46 \pm 2,67$ nmol/mg de proteína. Además, se observó una diferencia significativa entre el grupo ALTO y CG en este parámetro después del programa de ejercicio ($p = 0,048$).

Los grupos de entrenamiento no mostraron ningún cambio antes y después de la intervención en GSSG (ALTO pre: $0,23 \pm 0,08$ nmol/mg de proteína, post $0,25 \pm 0,13$ nmol/mg de proteína; $p = 0,903$; $\Delta\%$ incremento = +7,91; ES -0,19. MOD pre: $0,25 \pm 0,07$ nmol/mg de proteína, post: $0,23 \pm 0,09$ nmol / mg de proteína; $p = 0,479$; $\Delta\% = -7,15$; ES = - 0,25) o en la relación GSSG/GSH% (ALTO pre: $1,05 \pm 0,48\%$, post: $1,29 \pm 0,79\%$; $p = 0,375$; $\Delta\% = 12,65$; ES = - 0,25. MOD pre: $1,25 \pm 0,40\%$, post: $1,19 \pm 0,57\%$; $p = 0,717$; $\Delta\% = -4,18$; ES = - 0,15). Los datos GSSG basales en el CG fueron $0,23 \pm 0,10$ nmol/mg de proteína y la relación GSSG/GSH fue $1,08 \pm 0,59\%$. No hubo diferencias significativas entre los grupos en estos parámetros.

Resultados

Tabla R- 12. Efecto del entrenamiento sobre el estado redox sistémico valorado en función de la relación porcentual GSSG/GSH

Variables	Grupo	Pre	Post	P-Valor (tiempo)	Δ%	ES
GSH (nmol/mg prot)	AI (n=24)	22,71 ± 3,83	20,23 ± 3,35 [§]	0,002*	-10,91	-0,69
	MI (n=20)	20,84 ± 3,15	20,69 ± 4,22	0,857	-0,74	-0,04
	CG (n=19)	22,46 ± 2,67	-	-	-	-
GSSG (nmol/mg prot)	AI (n=24)	0,23 ± 0,08	0,25 ± 0,13	0,903	+7,91	0,19
	MI (n=20)	0,25 ± 0,07	0,23 ± 0,09	0,479	-7,15	-0,25
	CG (n=19)	0,23 ± 0,10	-	-	-	-
GSSG/GSH (%)	AI (n=24)	1,05 ± 0,48	1,29 ± 0,79	0,375	+12,65	-0,25
	MI (n=20)	1,25 ± 0,40	1,19 ± 0,57	0,717	-4,68	-4,18
	CG (n=19)	1,08 ± 0,59	-	-	-	-

AI: ALTO, Alta Intensidad (6 repeticiones); MI: MOD, Moderada Intensidad (15 repeticiones); CG: Grupo Control; GSSG: glutatión oxidado, GSH: glutatión reducido.

*: Diferencias significativas intra-grupo pre-post intervención ($p \leq 0,05$); §: diferencia respecto al grupo control ($p \leq 0,05$)

En la orina, hubo un aumento significativo de 8-oxo-dG (71,07%, $p = 0,010$) en el grupo ALTO (pre: $2,12 \pm 1,34$ nmol/mmol creatinina, post: $3,64 \pm 1,37$ nmol/mmol de creatinina) con un gran ES (1,12) y una disminución significativa (-25,66%, $p = 0,033$) en el grupo MOD (pre: $3,91 \pm 1,40$ nmol/mmol de creatinina, post $2,90 \pm 1,54$ nmol/mmol de creatinina) con un moderado ES (- 0,69). La media basal y la desviación estándar fueron $2,75 \pm 1,30$ para el CG. No encontramos ningún efecto significativo entre los grupos por interacción de tiempo (Tabla R-13 y figura R-21).

Tabla R- 13. . Efecto del entrenamiento sobre los niveles de 8-oxo-dG en orina

Variables	Grupo	Pre	Post	P-Valor (tiempo)	Δ%	ES
8-oxo-dG en orina (nmol/mmol creatinina)	AI (n=20)	2,12 ± 1,34	3,64 ± 1,37	0,010*	+71,07	1,12
	MI (n=16)	3,91 ± 1,40	2,90 ± 1,54	0,033*	-25,66	-0,69
	CG (n=14)	2,75 ± 1,30	-	-	-	-

*: Diferencias significativas intra-grupo pre-post intervención ($p \leq 0,05$); AI: ALTO: alta intensidad (6 repeticiones); MI: MOD: moderada intensidad (15 repeticiones); CG: grupo control.

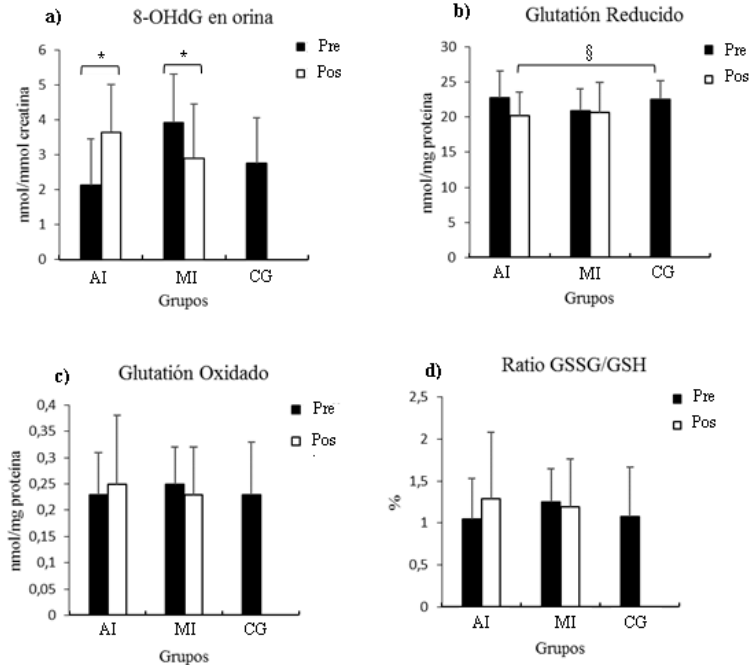


Figura R- 21. Cambios en la actividad redox por grupos

Niveles de a) 8-oxo-dG en orina, b) Glutación reducido, c) Glutación oxidado, y d) ratio GSSG/GSH evaluados en los grupos de Alta Intensidad (AI) (6 repeticiones), Moderada Intensidad (MI) (15 repeticiones) y CG antes y después del periodo de entrenamiento. Datos expresados en medias. *Diferencias significativas pre-post intervención ($p \leq 0,05$); § diferencias significativas respecto al CG ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS SOBRE EL PAPEL DE LOS MARCADORES DEL EO Y SU EVOLUCION A LO LARGO DEL ENVEJECIMIENTO.

El envejecimiento es un proceso biológico continuo que modifica la estructura y la función de los organismos vivos. Es el proceso biológico por el que los seres vivos se hacen viejos, que comporta una serie de cambios estructurales y funcionales que aparecen con el paso del tiempo y no son consecuencia de enfermedades ni accidentes. Es un proceso gradual de degradación del organismo humano (230,231)

El seguimiento de este proceso evolutivo es de extraordinaria importancia biomédica y motivo de gran interés por parte de geriatras, sociólogos e incluso economistas, aunque todavía hoy está lleno de dificultades. La obtención de marcadores biológicos fiables y sencillos es todavía difícil e incluso los análisis antropométricos y bioquímicos no son capaces de definir la edad biológica (232).

Desde el descubrimiento por Moses Gomberg (1866-1947) (233) de la existencia del primer radical libre orgánico, el trifenilmetilo, el concepto radical químico cambió vertiginosamente para dar paso a una nueva era conceptual en la que la química básica contemplaba importantes proyecciones hacia la bioquímica metabólica, la fisiología y, poco después, también la medicina.

Su trabajo condujo a teorías modernas de la estructura y reactividad de las moléculas orgánicas, teorías cuya aplicación ha tenido un tremendo impacto en la vida moderna. Ahora sabemos que los radicales libres orgánicos son esenciales para la forma en que

funcionan algunas enzimas en el cuerpo humano. Sabemos que los radicales libres orgánicos están involucrados en el proceso de envejecimiento del cuerpo, en su funcionamiento saludable y en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades graves. Comprender los radicales libres orgánicos, tanto en su aspecto químico como bioquímico, nos ha ayudado a entender mejor la síntesis de ADN junto a otros muchos otros fenómenos naturales, desde el deterioro de los alimentos hasta los efectos de las quemaduras solares. Los radicales libres orgánicos también desempeñan un papel importante en la producción de plásticos, caucho sintético y otros materiales sintéticos ampliamente utilizados(31,36,234).

1.1. EL ENVEJECIMIENTO Y EL EO

Aunque el interés por conocer la esencia del proceso del envejecimiento ha atraído la atención tanto de filósofos como científicos desde tiempos muy remotos, el interés general por este aspecto de gran importancia no adquirió su relevancia científica hasta después de los años 60, tras el enunciado de la teoría de los radicales libres como causantes del envejecimiento por D. Harman (9). Esta es por el momento la más aceptada por científicos y gerontólogos y tiene su base hipotética en el hecho de un proceso común modificable por factores genéticos y ambientales en el que las especies reactivas de oxígeno producidos por nuestras células son los responsables del deterioro y lesiones de las estructuras moleculares y tisulares que se acumulan en los organismos con el paso del tiempo (235).

En este campo de la investigación biomédica en relación con el papel del EO en el envejecimiento y sus efectos deletéreos han surgido, sin embargo, nuevas tendencias basadas en los resultados

obtenidos utilizando distintas líneas celulares donde los ROS, más que agentes citotóxicos o devastadores, se comportan como moléculas señalizadoras con efectos beneficiosos. Incluso se ha propuesto, en base a datos experimentales, que las especies más longevas o que aquellas especies animales que consiguen vivir por encima de su expectativa de vida establecida, lo consiguen gracias a la inducción de sistemas antioxidantes, a la reducción de los procesos de oxidación molecular y/o a la expresión de determinados factores transcripcionales responsables de prolongar la longevidad de ciertas células (236–239).

Sin embargo, en algunos casos estas observaciones no se han podido confirmar de forma unánime por todos los grupos de trabajo y el aumento de productos de oxidación es un hecho claramente comprobado y aceptado por una gran mayoría científica (240,241).

Este hecho, y otros relacionados, han servido para el desarrollo de distintas líneas de investigación encaminadas a conocer el papel de los productos de modificación oxidativa por ROS y su modulación en función de las distintas edades de animales de experimentación y humanos como posibles marcadores biológicos del envejecimiento y procesos degenerativos asociados (242).

En la actualidad, entre distintos marcadores que se han propuesto para medir la edad biológica de los seres vivos no cabe duda que los marcadores de EO se presentan como metabolitos idóneos y de elección. Es por ello por lo que seleccionar los productos más apropiados y reproducibles para medir el grado de oxidación molecular es de vital importancia. En este sentido, durante los últimos años, han sido muchas las aportaciones realizadas por distintos grupos de investigación, que invariablemente han demostrado el aumento del EO como un fenómeno asociado al envejecimiento de las especies.

Para el estudio de los productos de oxidación y/o antioxidantes y su aplicación traslacional, como marcadores de envejecimiento y de enfermedad, es necesario la validación adecuada de los métodos utilizados para su valoración, así como de los rangos de normalidad de la población sana. Y pese a los grandes esfuerzos realizados durante las últimas cuatro décadas, son muchas las tareas que quedan por realizar, así como las incógnitas por resolver. Uno de los aspectos más determinantes a la hora de comprobar el papel del EO y sus metabolitos como marcadores del envejecimiento es la elección y el diseño de un modelo experimental apropiado. Esto pasa por seleccionar a la población objeto de estudio, que contemple distintas edades y la diferencia de género y la ausencia de patología asociada, además de otros factores de interferencia como la utilización de determinados fármacos, los hábitos dietéticos o el consumo de tabaco. Esto dificulta el estudio cuando se trata de analizar estos metabolitos en personas de edad avanzada con un buen estado de salud. Para ello se han tenido en cuenta constantes antropométricas, clínicas y bioquímicas, además de una encuesta previa a su inclusión en el estudio.

En nuestro trabajo hemos utilizado los marcadores de estrés oxidativo, productos de oxidación y antioxidantes, más representativos y reproducibles, y aplicando las tecnologías aceptadas por la comunidad científica para su cuantificación (31,36,243).

1.2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

En nuestro estudio hemos comprobado la tendencia a la disminución progresiva de todos los sistemas antioxidantes a medida que se avanza en edad (Tabla R-2). En el caso de la actividad catalasa esta disminución es especialmente importante con una reducción del

12% y 24% frente a la SOD y la GPx con porcentajes de disminución del 3% y 8% y 4% y 7% respectivamente, mientras que la reducción del PAO fue del 7% y 22% en los grupos B y C con respecto al grupo de personas menor edad (Grupo A).

Existe evidencia experimental que apoya el papel de la actividad catalasa como factor determinante en la longevidad de algunas especies animales. En el trabajo de Cutler RG et al (2005) se demuestra un aumento de la longevidad entre el 17 y el 21% en ratones transgénicos C57BL/67 con una sobreexpresión de esta enzima de 50 veces su valor basal. Estos animales, además, presentan una disminución de los niveles de EO en el músculo y corazón y menor severidad de la arterioesclerosis asociada a la edad (244).

La disminución de los sistemas antioxidantes edad-dependiente se ha comprobado también en un estudio similar al nuestro en el que se analizaron distintos sujetos distribuidos en tres grupos en función de la edad: Jóvenes (20-39 años), adultos de mediana edad (40-64 años) y adultos de más mayores a partir de los 65 años. Estos autores encontraron que las enzimas antioxidantes SOD y GPx presentaban menor actividad en las personas de mayor de 65 años comparado con el grupo de jóvenes mientras que la actividad catalasa se mantuvo invariable. Sin embargo, la capacidad antioxidante total del plasma también disminuyó significativamente en el grupo de personas de mayor edad (245) coincidiendo con nuestros resultados.

Como se muestra en la tabla R-2 y figura R-3, la disminución de la GPx alcanza valores significativos al comparar los grupos B (** $p < 0,05$) y C (** $p < 0,001$) con el grupo A de menor edad y también es estadísticamente significativo la diferencia entre el grupo B y C (++++ $p < 0,001$). Sin embargo, cabe destacar que los niveles enzimáticos

de esa enzima en los grupos B y C se mantienen con actividades del $53,22 \pm 11,76$ y $51,53 \pm 8,81$ UI/g.prot respectivamente. En ambos casos estos valores son superiores a los niveles establecidos como factor de riesgo cardiovascular ($<42\text{U/gHb}$) (128) o los que se encuentran en pacientes hipertensos ($<30\text{U/g prot}$) (124). Los sujetos incluidos en nuestro estudio no presentaban factores de riesgo cardiovascular ni otras patologías que pudiera comprometer la actividad de la GPx.

El grupo de Lee HC, observó disminución de las tres enzimas estudiadas, SOD, catalasa y GPx, en los fibroblastos de piel de personas de edad avanzada. La disminución enzimática de la SOD afecta a la isoforma Cu/Zn-SOD mientras que la actividad intramitocondrial de esa enzima (Mn-SOD) está aumentada. Los autores señalan además que el declive de las funciones fisiológicas y trastornos asociados con el envejecimiento es consecuencia de la progresiva inestabilidad genética del ADN mitocondrial, las mutaciones de las proteínas transportadoras de electrones y el aumento de la producción de ROS y productos de oxidación molecular (246–248).

En resultados publicados por otros autores no se observan esta tendencia a la disminución de las tres enzimas antioxidantes citadas en el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, en un estudio realizado con musculo esquelético se comprobó la disminución de la enzima SOD en las personas de mayor edad (66-75 años), mientras que no se observaron cambios en las actividades Catalasa y GPx (199).

Sin embargo, conviene señalar que nuestro estudio analiza los niveles de antioxidantes y productos de oxidación no en un tejido específico sino a nivel sistémico como expresión de un estado general

del organismo y con el objeto de validar estos productos de EO como marcadores biológicos de la edad del individuo.

Posiblemente por el sistema experimental planteado y las técnicas distintas utilizadas para el análisis de las enzimas defensivas. Prior RL y Cao G. señalan que la interpretación de resultados a la hora de valorar las actividades antioxidantes requiere un análisis detallado del método utilizado, la muestra analizada y la situación fisiopatológica en que se lleva a cabo. El aumento de la capacidad de antioxidantes no es un signo de situación saludable o resultado deseable si ésta es la respuesta a una inducción por especies reactivas de oxígeno. De la misma forma, la disminución de antioxidantes tampoco debe considerarse como un efecto nocivo si ésta se acompaña de la disminución de prooxidantes. Por ello, se recomienda la medida no de una sola actividad sino de un conjunto de actividades enzimáticas y sustratos antioxidantes a la hora de valorar de forma integral la capacidad defensiva de las células frente al EO y enfermedades ligadas con el envejecimiento (249,250).

1.3. VALORACIÓN DEL ESTADO REDOX A TRAVÉS DE LA RELACIÓN GSSG/GSH

Como ya hemos comentado, el sistema del glutatión, formado por los niveles de GSH y GSSG junto a otras enzimas relacionadas representa, especialmente a través de la relación de sus concentraciones GSSG/GSH, uno de los más representativos indicadores del estado redox celular y fiel marcador del EO (92,93,251).

Los cambios en los niveles de GSH y el aumento de la relación GSSG/GSH se ha relacionado con el envejecimiento en distintas especies animales, así como con distintas disfunciones celulares. Ello ha llevado a proponer el suplemento de antioxidantes como una forma de prevenir contra los efectos deletéreos y enfermedades asociados con el envejecimiento (252).

Sin embargo, en otros artículos científicos los autores señalan la ausencia de efectos beneficiosos del aporte de antioxidantes en términos de alargar la vida de los animales e incluso advierten de algunos efectos deletéreos de este tipo de intervenciones (253).

Posiblemente, estos efectos inesperados, por parte de los antioxidantes, se deban a la importancia y la necesidad de mantener las concentraciones fisiológicas de ROS y su papel como moléculas señalizadoras en la regulación de los diversos procesos homeostáticos de las células (57,58,212).

Las modificaciones postraduccionales mediadas por cambios redox de los tioles se consideran mecanismos moleculares importantes que median muchas respuestas antioxidantes, mientras que los microARN sensibles al equilibrio redox han surgido como actores clave en la regulación postranscripcional de la expresión génica. La comprensión de tales mecanismos puede proporcionar la base para intervenciones terapéuticas basadas en antioxidantes en enfermedades relacionadas con las alteraciones de ese equilibrio (254).

1.4. PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación lipídica es uno de los efectos mejor demostrados y definidos de EO sobre las biomoléculas orgánicas (31,255,256).

En nuestro estudio hemos utilizado dos marcadores de peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA) y los F2-8-Isoprostanos (F2-IP) que reflejan fielmente este proceso de modificación oxidativa. El MDA es un cetoaldehído fisiológico derivado de la descomposición de ácidos grasos desaturados como subproducto del metabolismo del ácido araquidónico. El MDA puede reaccionar con muchas otras biomoléculas como proteínas y lipoproteínas plasmáticas modificando su estructura y su función biológica. Este producto de peroxidación se ha encontrado a concentraciones elevadas en el plasma de pacientes diabéticos y en el interior de las placas de la arterioesclerosis donde inducen la formación de células espumosas (257).

Hemos comprobado como el MDA aumenta progresivamente en el interior de la CMNc de los sujetos a medida que avanzan en edad con incrementos del 15% y 21% en los grupos B y C con respecto al grupo de adultos de menor edad siendo las diferencias significativas en el grupo C (**p<0,001) lo que demuestra el aumento de la peroxidación lipídica especialmente en las edades más avanzadas.

El análisis de MDA se ha utilizado extensivamente como marcador de EO y enfermedades relacionadas. Su método habitual de análisis consiste en un test colorimétrico al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) o bien mediante la cromatográfica de alta presión y detección ultravioleta (HPLC-UV) (258).

Sin embargo, el propio MDA participa en reacciones con moléculas distintas al TBA y es un sustrato catabólico. Solo ciertos productos de peroxidación lipídica generan MDA (invariablemente con bajos rendimientos), y el MDA no es el único producto final de la formación y descomposición de peróxidos ni una sustancia generada exclusivamente a través de la peroxidación lipídica. Muchos factores (por ejemplo, el tipo de estímulo desencadenante y las condiciones de

peroxidación) modulan la formación de MDA a partir de lípidos. Factores adicionales, como pueden ser los reactivos y constituyentes de la prueba de TBA tienen profundos efectos en la respuesta analítica derivada del peróxido graso. Esto hace que la prueba con TBA sea inespecífica para este metabolito. Por otra parte, los materiales no relacionados con los lípidos, así como los productos de descomposición derivados de peróxidos que no sean MDA pueden dar positivos para el TBA. La reactividad de TBA y la degradación oxidativa de los lípidos respaldan la conclusión de que la determinación de MDA y la prueba de TBA pueden ofrecer, en el mejor de los casos, una ventana estrecha y algo empírica sobre el complejo proceso de peroxidación de lípidos. En consecuencia, ni la determinación de MDA ni la respuesta de la prueba de TBA generalmente se pueden considerar como un índice de diagnóstico de la aparición y/o extensión de la peroxidación lipídica, la formación de hidroperóxido lipídico o la lesión oxidativa del lípido tisular al no tener una evidencia química exacta y de forma independiente del analito que se está midiendo y su fuente de origen (259).

Estas limitaciones del análisis del TBA se subsanan con el uso del método más específico como HPLC-UV que es el que hemos utilizado en nuestro estudio (258).

Los isoprostanos F2 constituyen un grupo de compuestos de la familia de las prostaglandinas que se derivan exclusivamente del ácido araquidónico y está considerado como un producto fiel reflejo y específico de peroxidación lipídica que se puede cuantificar en distintos fluidos biológicos y aplicando diferentes técnicas de análisis ((260,261).

Se producen a través de la oxidación no enzimática del ácido araquidónico por especies reactivas de oxígeno que posteriormente son escindidos y liberados al torrente circulatorio por fosfolipasas antes

de ser eliminados por la orina. A día de hoy existe todavía cierta controversia sobre el mecanismo de formación de los F2-IP tanto “in vitro” como “in vivo”, tanto en humanos como en animales, sugiriéndose dos vías de generación de estos productos, la no enzimática y la enzimática catalizada por la ciclooxigenasa (COX) (262).

Los niveles elevados de F2-IP están además considerados como factores de riesgo cardiovascular (263,264).

En nuestro trabajo hemos preferido determinar los niveles de F2-IP en orina como aproximación experimental para confirmar la validez de este metabolito como marcador del envejecimiento y comparar sus cambios con los niveles de MDA en células sanguíneas circulantes. Efectivamente existe correlación positiva y significativa (* $p < 0,05$) entre ambos metabolitos (ver anexo-1).

Los F2-IP aumentan en los dos grupos de mayor edad (B y C) con respecto al de personas más jóvenes con un porcentaje de incremento del 10% y 52% respectivamente y una diferencia significativa en este último caso de *** $p < 0,001$. Sin embargo, no existe diferencia significativa entre el grupo A y B, lo que sugiere que la mayor formación de este producto de peroxidación se produce en edades más avanzadas de la vida.

Resultados similares en los que se demuestra el aumento de F2-IP en relación con el envejecimiento se han observado en modelos de enfermedades neurodegenerativas así como en algunos modelos de animales (265,266).

Cabe destacar, que hasta el momento no se han llevado a cabo estudios de correlación entre los niveles de F2-IP y el rango de edades que hemos abarcado en este trabajo.

1.5. PRODUCTOS DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.

La modificación oxidativa de proteínas inducida por ROS se produce por un mecanismo de carbonilación que afecta a distintos residuos de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. Estas modificaciones afectan principalmente a los aminoácidos lisina, arginina, prolina y treonina. La formación de grupos carbonilos es la más frecuente y utilizada como marcador de oxidación espontánea tanto "in vitro" como "in vivo". La estabilidad de estos productos los convierte en sustratos asequibles para su determinación por métodos de laboratorio además de ser estables a -80°C durante más de 10 años (267).

El aumento de estos productos de oxidación, se puede cuantificar en plasma o suero mediante la utilización de anticuerpos específicos y cuantificación espectrofotométrica y se ha visto que el aumento de proteínas carboniladas es dependiente de la edad y guarda relación con el proceso de envejecimiento, así como con la patogenia de distintos procesos degenerativos e inflamatorios asociados (268,269).

En nuestro estudio hemos encontrado discretos aumento de estos productos a lo largo de los grupos de edades estudiados. Si consideramos el grupo de menor edad (Grupo A) como grupo control, los incrementos que se observan en el resto de grupos de edad más avanzada (Grupo B y C) son del 5% y el 10% respectivamente.

1.6. LESIÓN OXIDATIVA DEL MATERIAL GENÉTICO (ADN INTRACELULAR Y SISTÉMICO)

La oxidación del ADN puede producirse por los ROS generados bajo distintas condiciones tanto fisiológicas como

fisiopatológicas y se han desarrollado diferentes metodologías para su análisis y cuantificación (260,270).

Los radicales hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$) son especies muy reactivas que presentan una afinidad muy alta hacia las bases nucleotídicas del material genético induciendo distintos tipos de modificaciones oxidativas, la mayor parte de las cuales, especialmente la 8-oxo-dG, presenta un alto poder mutagénico por lo que su vinculación con la carcinogénesis es muy alta (48,96,97).

De hecho, la incidencia de impactos lesivos del material genético aumenta de forma exponencial y guarda un perfil similar con aumento de la incidencia de tumores con la edad (271,272).

En este trabajo, para determinación de 8-oxo-dG, hemos utilizado uno de los métodos de elección aprobado por el consorcio europeo para el estudio y validación de este metabolito en líquidos biológicos del que formamos parte, que se basa en su separación y posterior cuantificación por HPLC y detección electroquímica. Esta técnica permite el análisis de 8-oxo-dG a partir de diferentes medios biológicos como células aisladas, material tisular, suero y orina (108,109). Los niveles de 8-oxo-dG en las CMNc se llevó a cabo previa digestión enzimática del ADN genómico siguiendo la metodología previamente descrita. Además, se utilizó esta misma técnica de cuantificación en muestras de suero y orina. Esto nos permite valorar de forma global el grado de lesión oxidativa de esta molécula, así como, de forma indirecta, tener una idea general de la eficiencia de su reparación por la enzima de reparación ya que los niveles de esta base modificada en estos líquidos biológicos son expresión de su separación de la cadena de ADN por la hOOG1 (149) y su eliminación sin mayor modificación metabólica. Diversos estudios han comprobado

el aumento de esta base modificada en distintos tejidos animales en función de la edad de animales de experimentación (273).

En lo que respecta a los cambios encontrados en las concentraciones de 8-oxo-dG se aprecia un incremento importante especialmente en lo que respecta a los niveles en suero y orina. El aumento de 8-oxo-dG en las CMNc es discreto cuando se compara el grupo B con el A con un incremento del 6% y que alcanza un valor significativo en el grupo de mayor edad (Grupo C) ($***p<0.001$) sin encontrar diferencia significativa entre los grupos B y C. Sin embargo, los niveles de este metabolito tanto en suero como en orina presentan mayores incrementos cuando se comparan los grupos de mayor con los de menor edad. Las diferencias en los niveles de 8-oxo-dG en suero son significativos al comparar ambos grupos B y C ($**p<0,05$ y $***p<0,001$ respectivamente) con el de menor edad, así como entre estos entre los grupos B y C ($***p<0.001$). Resultados muy similares se observaron al analizar los cambios en los niveles de este metabolito en orina si bien en este caso y en el grupo C de edad más avanzada el incremento con respecto al grupo más joven (grupo A) fue del 100%. Estos resultados sugieren que la efectividad de los sistemas de reparación está conservada en las personas de edad avanzada sin patología crónica asociada. Es posible que la eficiencia en los sistemas de reparación contribuya a mantener la integridad del genoma y prevenir o reducir la incidencia de enfermedades tumorales en las personas más longevas con una salud conservada.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros grupos de investigación que muestran la misma tendencia al aumento de 8-oxo-dG en la orina proporcionalmente con la edad tanto en animales de experimentación como en humanos. Usando la técnica de dilución isotópica con cromatografía líquida y espectrofotometría de

masas, el grupo de Wei analizó un total de 12228 sujetos, hombres y mujeres de edades comprendidas entre los 2 y 90 años observó un incremento de la 8-oxo-dG así como de la 8-oxo-guanosina procedente de la oxidación del RNA en el grupo de edad entre 81 a 90 años con respecto al grupo de 21 y 30 años (193).

Las concentraciones de 8-oxo-dG que hemos obtenido con el método analítico utilizado son muy similares a las que se han publicado por otros autores (274) sin bien existe una gran variabilidad en función del método utilizado.

1.7. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

El estudio de correlaciones estadísticas entre los metabolitos de EO entre ellos y con todo el conjunto de edades estudiadas (18 a 90 años) se recoge en el anexo-I de esta Tesis. En las figuras R-16 a R-19 se presentan aquellas correlaciones seleccionadas en base a su significancia estadística y relevancia como potenciales marcadores biológicos de envejecimiento.

Es posible que pese a la disminución de sistemas antioxidantes en las personas de mayor edad y el aumento de los productos de oxidación molecular de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, éstos no superen los límites de la patogenicidad. Es por ello por lo que debería estimarse con precisión cuales son los límites de concentraciones umbral a partir de los cuales los marcadores de EO predicen el estatus de enfermedad o envejecimiento saludable lo que requiere realizar estudios de grandes poblaciones para llegar a establecer los índices patológicos de estos metabolitos.

2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL EJERCICIO FISICO

Según hemos podido comprobar, este estudio es el primero en investigar los efectos de un programa de entrenamiento de moderada-larga duración (16 semanas de entrenamiento de la fuerza) con bandas elásticas con diferentes intensidades (carga o resistencia empleada) en el daño del ADN y estado GSH, GSSG y GSSG / GSH en adultos mayores. El hallazgo principal y novedoso del presente estudio fue que el entrenamiento de la fuerza de alta intensidad (6 repeticiones) aumenta el EO, como lo demuestra el aumento en las concentraciones en orina 8-OHdG y la disminución en el tripéptido antioxidante GSH.

Sin embargo, el entrenamiento de la fuerza a intensidad moderada (15 repeticiones) da como resultado una disminución en el daño al ADN sin cambios significativos en la relación GSH o GSSG/GSH. Las dos intensidades fueron igualmente efectivas para mejorar la función física en mujeres mayores, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos de entrenamiento en los parámetros de la función física.

Planteamos la hipótesis de que el entrenamiento de la fuerza de alta intensidad (6 repeticiones) aumentaría el EO, detectado como un aumento en la concentración de 8-oxo-dG, mientras que la rutina de intensidad moderada (15 repeticiones) reduciría este parámetro. Esta hipótesis fue parcialmente refutada porque no encontramos diferencias significativas entre los efectos de las dos intensidades en este marcador, aunque 8-oxo-dG aumentó significativamente en el grupo de 6 repeticiones y disminuyó significativamente en el grupo de 15 repeticiones. A continuación, planteamos la hipótesis de que el entrenamiento de la fuerza a ambas intensidades produciría aumentos similares en la concentración de los parámetros del estado redox

tiólico, que fue refutada porque ninguna de las dos intensidades mejoró los niveles de moléculas antioxidantes. Nuestra hipótesis final fue que los grupos experimentales aumentarían sus valores de función física en cantidades similares. Los hallazgos confirmaron esta hipótesis, ya que no encontramos diferencias en las mejoras en los parámetros de la función física entre las dos intensidades.

Hasta la fecha, pocos estudios han investigado el efecto del entrenamiento de la fuerza en los biomarcadores del sistema operativo, y más específicamente en el daño del ADN. Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con los de Parise, Brose y Tarnopolsky (275) que mostraron que en individuos mayores (edad media 71 años), tras 14 semanas de entrenamiento de la fuerza 3 veces a la semana con el 50-80% de su 1RM redujo significativamente sus niveles urinarios de 8-oxo-dG sin producir cambios en el GSH. Además, nuestros resultados en el grupo de 15 repeticiones están de acuerdo con los obtenidos por Soares et al. (276), que mostró que 16 semanas de entrenamiento de resistencia 3 veces por semana con el 75% de 1RM disminuyeron significativamente el daño al ADN. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con los de Rall, et al. (277) que encontraron que 12 semanas de entrenamiento de la fuerza en adultos mayores con artritis reumatoide, 2 veces a la semana con el 50-80% de 1RM, no dieron como resultado un cambio significativo en los niveles de 8-oxo-dG urinario, aunque esta diferencia podría deberse a su pequeño tamaño de muestra.

Franzke, et al.(278) mostraron, después de completar un protocolo de entrenamiento progresivo de la fuerza de 6 meses con bandas elásticas a razón de dos veces/sesiones por semana, que el daño en el ADN aumentó en adultos institucionalizados de edad muy avanzada. Sin embargo, los autores no especificaron la intensidad con la que trabajaron sus participantes, (278) por lo que la discrepancia

entre nuestros hallazgos y los de ellos puede estar relacionada con la intensidad del ejercicio y el hecho de que la relación entre el ejercicio y el EO es complejo y multifactorial. La intensidad del ejercicio, la duración del entrenamiento, el número de ejercicios, el estado previo del entrenamiento y el tipo de población -todos los factores que pueden modificar la respuesta del biomarcador del EO- variaron entre todos estos estudios. Además, algunas de las discrepancias en los hallazgos pueden estar relacionadas con el tiempo transcurrido después de que se realizaron los ejercicios antes de que se midiera el 8-oxo-dG.

Varios cambios metabólicos agudos resultantes del ejercicio pueden persistir al menos 72 horas después del ejercicio (279) por lo que en nuestro estudio extrajimos las muestras de sangre de los participantes 72 horas después de su última sesión de entrenamiento. Además, el uso de diferentes biomarcadores de daño en el ADN a través de los distintos estudios que se han llevado a cabo confunde y hace más difícil establecer comparaciones.

Los resultados que obtuvimos en el presente estudio se corresponden con estudios previos donde los regímenes de ejercicio muy intensos o muy largos indujeron un aumento del daño cromosómico (280), pero intensidades menores, incluso la práctica de Tai Chi, produjeron significativamente menor daño en el ADN (281).

Radak et al. (282) señalaron que un nivel moderado de ROS es esencial para las respuestas adaptativas al ejercicio, pero un ejercicio o ejercicio muy prolongado o agotador al que la persona no está acostumbrada puede afectar el equilibrio entre la producción de ROS y el sistema de defensa antioxidante.

Esta observación se manifestó claramente en el presente estudio, donde el entrenamiento de la fuerza a una intensidad moderada (15 repeticiones) generó una respuesta adaptativa beneficiosa frente al EO, mientras que la alta intensidad (6

repeticiones) produjo un desequilibrio a favor de la producción de ROS y una disminución del sistema antioxidante GSH.

Una posible explicación para esta respuesta podría ser que, a medida que avanza el envejecimiento, los humanos se vuelven gradualmente menos adaptables a los incrementos de ROS cuando reciben entrenamiento de alta intensidad (movilización de resistencias más altas), lo que aumenta su susceptibilidad al EO (210).

Con respecto al estado redox tiólico, los resultados presentes proporcionan datos preliminares de que la actividad redox es dependiente de la dosis en adultos mayores, dependiendo de las intensidades aplicadas. La disminución significativa de la actividad de GSH (-10,91%) junto con el aumento de GSSG (+ 7,91%) producido por el entrenamiento de resistencia de alta intensidad (AI) podría interpretarse como evidencia de una defensa antioxidante insuficiente para hacer frente a la producción de radicales libres como resultado de la intervención. En contraste, la reducción en GSSG (-7.15%) junto con la ausencia de cambios en GSH como resultado del entrenamiento de resistencia de intensidad moderada (15 repeticiones) muestra que los niveles moderados serían la intensidad de entrenamiento óptima para mujeres mayores porque produce el estímulo necesario para producir cambios adaptativos efectivos en el sistema antioxidante enzimático mientras se reducen los niveles de daño en el ADN.

Nuestros resultados con respecto a GSH contrastan con los de estudios previos, que han sugerido que el GSH aumenta después de un programa de ejercicios de entrenamiento de la fuerza en sujetos ancianos con edades comprendidas entre 60 y 83 años (283).

Curiosamente, parece existir un equilibrio compensatorio entre los diversos componentes que contribuyen al sistema general de defensa antioxidante en la sangre (284).

Este equilibrio parece ser el resultado del hecho de que las enzimas antioxidantes funcionan en redes, donde la disminución de un antioxidante en particular puede ser compensada por un aumento en otro, como se puede observar en el presente estudio. Al igual que con los biomarcadores del sistema operativo, su respuesta parece estar condicionada por la intensidad de entrenamiento. Se ha propuesto que el ejercicio físico puede contribuir a la adaptación antioxidante tanto en personas jóvenes como ancianas (285,286).

Publicaciones anteriores han informado resultados muy variados con respecto a la defensa antioxidante en adultos mayores físicamente activos frente a menos activos (287).

Pocos estudios han examinado los efectos de los “Resistance Training Program” (RTP) (programas para entrenamiento de la fuerza al movilizar resistencias) sobre la actividad antioxidante en adultos mayores. La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) son las enzimas más comúnmente analizadas y, en general, los estudios han demostrado que el entrenamiento de resistencia resulta en su aumento (276,279,288,289) o no produce cambios (290–292).

Nuestros resultados contrastan con los publicados por Çakir-Atabek (279) que no encontraron alteraciones agudas en GSH después de una única sesión de entrenamiento de la fuerza en hombres no entrenados, seguidas de mejoras significativas en este parámetro después de 6 semanas de entrenamiento de la fuerza que fue independiente de la intensidad de entrenamiento (70-85% de 1RM).

Por otro lado, Peters et al. (293) informaron que, después de 6 semanas de entrenamiento de ejercicio de fuerza de tipo isométrico, los marcadores de EO disminuyeron significativamente y la relación de GSH/GSSG en sangre total aumentó (+61%) en adultos hipertensos.

Por lo tanto, es necesario profundizar en estas investigaciones en relación con los efectos del entrenamiento de la fuerza sobre el contenido de tisular y sistémico de GSH y GSSG con el fin de comprender la respuesta a diferentes tipos de parámetros de entrenamiento de la fuerza.

En cuanto a los resultados de la función física, después de 16 semanas de la intervención, tanto el grupo AI como el MI mostraron un rendimiento mejorado en todas las pruebas de función física, y esta mejora no difirió significativamente entre las dos intensidades. Como era de esperar, no observamos cambios en el rendimiento físico en el GC, excepto en el test de Arm Curl, en el cual este grupo mostró una mejora significativa. Una posible explicación para este resultado inesperado, además del aprendizaje técnico del gesto motor, es que la mera participación en este estudio motivó subconscientemente a los participantes del GC a mejorar, junto con la motivación intrínseca de querer producir un resultado mejor de lo que lograron en su medición inicial.

Las mejoras que observamos en las pruebas de fuerza dinámica (Arm Curl y Chair Stand) fueron prácticamente idénticas para ambos grupos experimentales. Sin embargo, para el test de equilibrio agilidad/dinámico (TUG), el grupo MI logró las mayores mejoras, mientras que en la prueba de capacidad aeróbica (6MWT), el grupo AI mostró la mayor mejoría, que también alcanzó significación clínica (28 m) de acuerdo con el umbral previamente establecido de 24-54 m para adultos mayores (294,295).

Las mejoras en el TUG para el grupo MI también fueron clínicamente relevantes, de acuerdo con el umbral de 1.09 establecido por Mangione, Miller y Naughton (296) después de que revisaron 12 estudios con un total de 691 participantes que realizaron un entrenamiento progresivo de la fuerza.

Nuestros resultados sobre la función física son consistentes con estudios publicados anteriormente, sugiriendo que el entrenamiento de la fuerza con alta intensidad es mejor que el entrenamiento a bajas intensidades para los resultados motores donde debe producirse de manera muy específica o concreta una fuerza direccionada pero puede no ser necesario para la mejora de resultados que buscan la funcionalidad o mejora de determinadas tareas motrices esenciales en las labores cotidianas, donde las intensidades menores pueden ser suficientes y adecuadas (297,298), especialmente cuando los adultos mayores en cuestión no son frágiles y no presentan comorbilidades relevantes (299).

Una posible explicación para la falta de diferencia en los resultados de capacidades funcionales es que puede existir un umbral por encima del cual las ganancias de fuerza no conducen a mejoras funcionales adicionales (300).

Otro argumento utilizado con frecuencia es que el volumen de entrenamiento relativamente alto al entrenar con intensidades moderadas (10-15 repeticiones) comparado con el necesario al entrenar con altas intensidades (4-8 repeticiones) puede tener un impacto considerable en la adaptación cuando el número de series y ejercicios es igual entre grupos (300), como fue el caso en el presente estudio.

Además, de acuerdo con nuestros hallazgos, estudios previos que utilizaron protocolos, métodos y dispositivos de entrenamiento similares (223,224,301,302) también informaron mejoras en el funcionamiento físico en adultos mayores después de usar materiales elásticos (278).

Los valores basales para las pruebas de función física en el presente estudio fueron bajos en promedio en comparación con los

valores de referencia para mantener la independencia física a la edad de nuestros participantes (218).

Específicamente, el grupo ALTO mostró un rango de valores en las pruebas Chair Stand, 6MWT y TUG equivalentes a los valores de referencia para un grupo de edad de 80 a 84 años, mientras que el grupo MOD mostró resultados de Chair Stand y TUG equivalentes a un grupo de edad de 85 a 89 años de edad. El GC en realidad mostró resultados que se acercaron más a los valores de referencia para su grupo de edad, excepto en la capacidad aeróbica, donde los valores fueron más típicos para las mujeres de 80-84 años. Por el contrario, después de completar el RTP, los valores de las pruebas de fuerza dinámica de los miembros superiores e inferiores en ambos grupos experimentales fueron equivalentes a los de las mujeres menores de 60 años. Además, los resultados para los grupos ALTO y MOD para el TUG y 6MWT al final del estudio fueron muy similares a los de sus respectivos grupos de edad reales correspondientes. Dichas mejoras son relevantes para los adultos mayores porque están asociados con una mejor calidad de vida e independencia funcional (303) así como un menor riesgo de muerte (304).

Finalmente, la presente investigación tiene algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta al intentar extraer conclusiones basadas en evidencia. Los resultados informados en este experimento son específicos para mujeres mayores sanas; por lo tanto, no deben extrapolarse a otras poblaciones. Además, el análisis de actividades de antioxidantes endógenos como la catalasa, la superóxido dismutasa y la enzima glutatión peroxidasa podría haber reflejado mejor la adaptación del sistema antioxidante inducida por el entrenamiento de resistencia en este contexto. Además, el pequeño tamaño de muestra de los grupos fue otra limitación. Finalmente, no controlamos o evaluamos los niveles diarios de actividad física o la

ingesta nutricional, aunque a nuestros sujetos se les solicitó que mantuvieran sus actividades diarias regulares de vida durante todo el período de estudio y que no cambiaran sus hábitos nutricionales.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. El análisis de los niveles de antioxidantes en una población sana de edad comprendida entre los 18 a 40 años, 41 a 60 y 61 a 90 años demuestra la disminución de las enzimas SOD, Catalasa y GPx así como el PAO de forma progresiva, existiendo diferencias significativas entre los tres grupos de edad estudiados.
2. Los niveles del antioxidante GSH disminuyen progresivamente y de forma proporcional con la edad de la población mientras que su producto de oxidación GSSG y la relación GSSG/GSH aumentan, siendo significativos los cambios encontrados al comparar el grupo de mayor con el de menor edad. Lo que demuestra un mayor grado de oxidación sistémica en las personas adultas mayores de 60 a 90 años, comparado con los adultos jóvenes de 18 a 40 años.
3. Los productos de peroxidación lipídica MDA y F2-isoprostanos también aumentan progresivamente a medida que se avanza en edad con diferencias que solo son significativas al comparar el grupo de 61 a 90 años, con el de 18 a 40 años.
4. La oxidación de proteínas, cuantificado por la concentración sérica de grupos carbonilo experimenta un aumento progresivo, con diferencia significativa entre los grupo de 61 a 90 años y el de 18 a 40 años.
5. A medida que transcurre la edad aumenta el grado de lesión oxidativa del ADN medido por los niveles de 8-oxo-dG

genómico de las células mononucleares circulantes. Este aumento se acompaña también de niveles progresivamente más elevados de 8-oxo-dG tanto en el suero como en la orina de los sujetos incluidos en el estudio, con diferencias significativas entre los tres grupos de edad. Este resultado sugiere que si bien existe un mayor grado de lesión del material genético con la edad, la actividad de los sistemas de reparación se conserva en las personas mayores que no presentan patologías ni comorbilidades asociadas al envejecimiento.

6. Existe una correlación estadísticamente significativa entre los niveles en orina de F2-IP y 8-oxo-dG, y ambos metabolitos correlacionan significativamente con la concentración intracelular de GSH, y la relación GSSG/GSH.
7. Los niveles de 8-oxo-dG en orina correlacionan negativamente y de forma significativamente con la actividad intracelular de la enzima GPx.
8. Los niveles de F2-IP y 8-oxo-dG eliminados por la orina así como las concentraciones intracelulares de GSH, GSSG, relación GSSG/GSH y actividad GPx correlacionan con niveles diferentes de significativa estadística con la edad de los sujetos estudiados y apuntan hacia su utilidad como marcadores biológicos del envejecimiento poblacional.
9. Nuestros resultados muestran que el programa de entrenamiento de la fuerza con resistencia progresiva (bandas elásticas) de 16 semanas en sesiones de ejercicio de dos veces por semana, desarrollado con un carácter del esfuerzo

de 8-9 sobre 10 al final de cada serie y aplicado con una intensidad o resistencia moderada para un total de 15 repeticiones puede mejorar el estrés oxidativo al disminuir el daño del ADN en mujeres mayores sanas. Sin embargo se pudo observar el efecto contrario cuando un entrenamiento similar de la fuerza (mismo tipo de ejercicios, velocidad de ejecución y carácter del esfuerzo) se desarrolla con una intensidad más alta, es decir, mayor resistencia empleada para un total de 6 repeticiones.

10. El entrenamiento de la fuerza con alta intensidad (6 repeticiones) induce una disminución significativa en GSH, mientras que los niveles de este antioxidante no se ven afectados tras el ejercicio de fuerza de intensidad moderada (15 repeticiones), lo que confirma mejores resultados en la prevención del estrés oxidativo.
11. Las mejoras en la función física observadas tras el periodo de entrenamiento de la fuerza se producen independientemente de la intensidad/resistencia empleada. Por lo tanto, la implementación de un protocolo de entrenamiento de la fuerza con un nivel de intensidad moderado (15 repeticiones) puede ser la mejor estrategia para reducir el daño en el ADN y conseguir una mayor independencia física de las mujeres mayores.
12. Estos marcadores de estrés oxidativo pueden ser útiles como herramienta no invasiva y de bajo coste (ensayo de 8-oxo-dG en orina) para valorar el estrés oxidativo y la disnea en mujeres mayores, sabiendo, además, que los dispositivos elásticos empleados para aplicar el entrenamiento de la fuerza

Conclusiones

también son sumamente de fácil acceso y uso además de económicos.

BIBLIOGRAFIA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado García AM, Salazar Maya ÁM. Análisis del concepto de envejecimiento. *Gerokomos*. 2014;25(6):57–62.
2. Abellán García A, Pujol Rodríguez R. “Un perfil de las personas mayores en España. Indicadores estadísticos básicos.” *Informes envejecimiento en red* nº 10. Madrid; 2015.
3. OMS. Campaña de la OMS por un envejecimiento activo. 2001;
4. Lachs MS, Feinstein AR, Cooney LM, Drickamer MA, Marottoli RA, Pannill FC, et al. A simple procedure for general screening for functional disability in elderly patients. *Annals of Internal Medicine*. 1990. p. 699–706.
5. Crowther MR, Parker MW, Achenbaum WA, Larimore WL, Koenig HG. Rowe and Kahn’s Model of Successful Aging Revisited: Positive Spirituality—The Forgotten Factor. *Gerontologist*. 2002;42(5):613–20.
6. Martinson M, Berridge C. Successful aging and its discontents: A systematic review of the social gerontology literature. *Gerontologist*. 2015;55(1):58–69.
7. Sastre J, Pamplona R, Ramón JR. *Biogerontología Médica*. Sociedad Española de Geriátría y Gerontología, editor. Madrid; 2009. 417 p.
8. Da Cruz AC, Petronilho F, Heluany CCV, Vuolo F, Miguel SP, Quevedo J, et al. Oxidative stress and aging: correlation with clinical parameters. *Aging Clin Exp Res*. 2014 Feb 3;26(1):7–

- 12.
9. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298–300.
10. Wu IC, Hsiung CA, Hsu CC, Lin XZ. Oxidative Stress and Frailty: A Closer Look at the Origin of a Human Aging Phenotype. In: *Aging.* Elsevier; 2014. p. 3–14.
11. Salvador S, Donderis S, Olivares C, Guaita M, Espinosa O, Rodriguez J, et al. El estrés oxidativo en la patología degenerativa. Mecanismos de acción y marcadores de lesión molecular. *Química Clínica.* 2006;25(2):49–57.
12. Tower J. Sex-specific regulation of aging and apoptosis. *Mech Ageing Dev.* 2006 Sep 1;127(9):705–18.
13. Masoro EJ. Biochemical and molecular mechanisms of aging: from model systems to human longevity. Vol. 1790, *Biochimica et Biophysica Acta.* Elsevier B.V.; 2009. p. 949–50.
14. Lemaître J-F, Berger V, Bonenfant C, Douhard M, Gamelon M, Plard F, et al. Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. *Proceedings Biol Sci.* 2015 May 7;282(1806):20150209.
15. Dai D-F, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Heal.* 2014;3:6.
16. Edrey YH, Salmon AB. Revisiting an age-old question regarding oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2014 Jun;71:368–78.
17. Rose MR. Modern biological theories of aging. *Am J Hum*

- Genet. 1988;43(2):220.
18. Cesari M, Vellas B, Gambassi G. The stress of aging. *Exp Gerontol.* 2013 Apr;48(4):451–6.
 19. Miquel J. Integración de teorías del envejecimiento (parte II). *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2006 Mar 1;41(2):125–7.
 20. Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Garcia-Valles R, Pareja-Galeano H, Gambini J, Borrás C, et al. Mitochondria as sources and targets of damage in cellular aging. *Clin Chem Lab Med.* 2012 Feb 1;50(8):1287–95.
 21. Masoro EJ. Hormesis and the antiaging action of dietary restriction. *Exp Gerontol.* 33(1–2):61–6.
 22. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Mar;8(3–4):572–81.
 23. Poljsak B, Milisav I. Aging, Oxidative Stress and Antioxidants. In: *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants.* InTech; 2013. p. 331–53.
 24. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2007 Jan;292(1):R18–36.
 25. Sastre J, Pallardó F V, Gambini J, Borrás C, Viña J. *Biogerontología Médica.* Sociedad Española de Geriatria y Gerontología, editor. Madrid: Ergon; 2009. 13–24 p.
 26. Gruber J, Schaffer S, Halliwell B. The mitochondrial free radical theory of ageing--where do we stand? *Front Biosci.*

- 2008 May 1;13:6554–79.
27. Greaves LC, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations and ageing. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):1015–20.
 28. Sohal RS, Orr WC. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med*. 2012 Feb 1;52(3):539–55.
 29. Jimenez LF, Merchant H, Betanzos Fernandez A, Martinez Palomo A, Covarrubias Robles A, García Carrancá A. *Biología celular y molecular*. Gaona Figueroa L, editor. Mexico: Pearson; 2003. 912 p.
 30. Pryor WA. *Free radicals in biology*. Academic Press; 1976. 304 p.
 31. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. University. Oxford University Press; 2007. 851 p.
 32. Hill HA. The chemistry of dioxygen and its reduction products. *Ciba Found Symp*. 1978;6–8(65):5–17.
 33. Hill HA. Oxygen, oxidases, and the essential trace metals. *Philos Trans R Soc London*. 1981 Aug 14;294(1071):119–28.
 34. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978 Sep 8;201(4359):875–80.
 35. Ames BN, Saul RL, Schwiers E, Adelman R, Cathcart R. Oxidative DNA damage as related to cancer and aging: The assay of thymine glycol, thymidine glycol, and hydroxymethyluracil in human and rat urine. In: *Molecular Biology of Aging: Gene stability and gene expression*. Sohal RA, Birnbaum LS, Cutler RG, editors. New York: Raven Press; 1985. 137–144 p.

36. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617–31.
37. Cadenas E. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annu Rev Biochem.* 1989 Jun;58(1):79–110.
38. Saez G, Thornalley PJ, Hill HA, Hems R, Bannister J V. The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Oct 28;719(1):24–31.
39. Viña J, Saez GT, Wiggins D, Roberts AF, Hems R, Krebs HA. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem J.* 1983 Apr 15;212(1):39–44.
40. Sáez GT, Bannister W, Bannister J V. Free radicals and thiol compounds. The role of glutathione against free radical toxicity. In: *CRC handbook of physiological functions of glutathione.* Viña J, editor. Florida: CRC Press Inc; 1990. 237–254 p.
41. Davis Conference. Oxygen Radicals and Human Disease. Vol. 107, *Annals of Internal Medicine.* 1987. p. 526.
42. Beauchamps C, Fridovich I. A Mechanism for the Production of Ethylene from Methional The Generation of the Hydroxyl Radical. Vol. 245, *The Journal of biological chemistry.* 1970.
43. Haber F, Weiss J. No Title. London: *Proc. Roy. Soc.;* 1974. p. 332.
44. Rigo A, Stevanato R, Finazzi-Agro A, Rotilio G. An attempt to evaluate the rate of the haber-weiss reaction by using $\cdot\text{OH}$

- radical scavengers. FEBS Lett. 1977 Aug 1;80(1):130–2.
45. Saez GT. Biopatología de los radicales libres. In: Leone AMP, editor. Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías. Real Academia de Farmacia de Madrid; 2005. p. 201–24.
46. Dean J, Aneshansley DJ, Edgerton HE, Eisner T. Defensive spray of the bombardier beetle: a biological pulse jet. Science. 1990 Jun 8;248(4960):1219–21.
47. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. Science (80-). 1985 Jan 25;227(4685):375–81.
48. Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. Lancet. 1994 Sep 24;344(8926):862–3.
49. Gregory EM, Fridovich I. Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. J Bacteriol. 1973 May;114(2):543–8.
50. Morgan RW, Christman MF, Jacobson FS, Storz G, Ames BN. Hydrogen peroxide-inducible proteins in Salmonella typhimurium overlap with heat shock and other stress proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Nov;83(21):8059–63.
51. Christman MF, Storz G, Ames BN. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 May;86(10):3484–8.
52. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1.

- EMBO J. 1991 Aug;10(8):2247–58.
53. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 1992;17(4):221–37.
54. Oliva MR, Iradi A, Garrido F, Ramos M, Oltra AM, Muñoz P, et al. Oxidative stress induces the expression of the major histocompatibility complex in murine tumor cells. *Free Radic Res.* 2001 Aug;35(2):119–28.
55. Tormos C, Javier Chaves F, García M, Garrido F, Jover R, O'Connor J, et al. Role of glutathione in the induction of apoptosis and c-fos and c-jun mRNAs by oxidative stress in tumor cells. *Cancer Lett.* 2004 May 10;208(1):103–13.
56. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull.* 1993 Jul;49(3):506–22.
57. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996 May;10(7):709–20.
58. Goldschmidt-Clermont PJ, Moldovan L. Stress, superoxide, and signal transduction. *Gene Expr.* 1999;7(4–6):255–60.
59. González-Santiago L, Suárez Y, Zarich N, Muñoz-Alonso MJ, Cuadrado A, Martínez T, et al. Aplidin® induces JNK-dependent apoptosis in human breast cancer cells via alteration of glutathione homeostasis, Rac1 GTPase activation, and MKP-1 phosphatase downregulation. *Cell Death Differ.* 2006 Nov 17;13(11):1968–81.

60. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999 Jan;11(1):1–14.
61. Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*. 1999 Nov;27(9–10):936–44.
62. Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med*. 2000 May 1;28(9):1405–20.
63. Seifermann M, Epe B. Oxidatively generated base modifications in DNA: Not only carcinogenic risk factor but also regulatory mark? *Free Radic Biol Med*. 2017 Jun;107:258–65.
64. Wang R, Hao W, Pan L, Boldogh I, Ba X. The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Jul 24;
65. Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:669–78.
66. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 1968 Nov 10;243(21):5753–60.
67. Sáez GT, Están-Capell N. Antioxidant Enzymes. *Encyclopedia of Cancer*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014;
68. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994 Sep 26;97(3A):5S-13S; discussion 22S-28S.
69. Gero E. The role of ascorbic acid in biological oxidations. *Ann Nutr Aliment*. 1964;18:C501-20.

70. Guo Q, Packer L. Ascorbate-dependent recycling of the vitamin E homologue Trolox by dihydrolipoate and glutathione in murine skin homogenates. *Free Radic Biol Med.* 2000 Aug;29(3–4):368–74.
71. Azzi A. Many tocopherols, one vitamin E. *Mol Aspects Med.* 2018 Jun;61:92–103.
72. Stahl W, Schwarz W, von Laar J, Sies H. All-trans β -Carotene Preferentially Accumulates in Human Chylomicrons and Very Low Density Lipoproteins Compared with the 9-cis Geometrical Isomer. *J Nutr.* 1995 Aug 1;125(8):2128–33.
73. Palozza P, Luberto C, Calviello G, Ricci P, Bartoli GM. Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(6):1065–73.
74. Kennedy TA, Liebler DC. Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J Biol Chem.* 1992 Mar 5;267(7):4658–63.
75. Schmitz HH, Poor CL, Gugger ET, Erdman JW. Analysis of carotenoids in human and animal tissues. *Methods Enzymol.* 1993;214:102–16.
76. Varela-López A, Giampieri F, Battino M, Quiles JL. Coenzyme Q and Its Role in the Dietary Therapy against Aging. *Molecules.* 2016 Mar 18;21(3):373.
77. Kawamukai M. Biosynthesis and applications of prenylquinones. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018 Jun 3;82(6):963–77.

78. Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp.* 1995;61:103–16.
79. McCormack D, McFadden D. A review of pterostilbene antioxidant activity and disease modification. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:575482.
80. Benlloch M, Obrador E, Valles SL, Rodriguez ML, Sirerol JA, Alcácer J, et al. Pterostilbene Decreases the Antioxidant Defenses of Aggressive Cancer Cells *In Vivo*: A Physiological Glucocorticoids- and Nrf2-Dependent Mechanism. *Antioxid Redox Signal.* 2016 Jun 10;24(17):974–90.
81. Jiang Z, Chen K, Cheng L, Yan B, Qian W, Cao J, et al. Resveratrol and cancer treatment: updates. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Sep;1403(1):59–69.
82. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1987 Jan 1;210(1):37–9.
83. Subbiah MT, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Oct;77(4):1095–7.
84. Jordan VC, Schafer JM, Levenson AS, Liu H, Pease KM, Simons LA, et al. Molecular classification of estrogens. *Cancer Res.* 2001 Sep 15;61(18):6619–23.
85. Lagranha CJ, Silva TLA, Silva SCA, Braz GRF, da Silva AI, Fernandes MP, et al. Protective effects of estrogen against cardiovascular disease mediated via oxidative stress in the

- brain. *Life Sci.* 2018 Jan 1;192:190–8.
86. Sáez GT, Valls V, Muñoz P, Perez-Broseta C, Iradi A, Oliva MR, et al. The role of glutathione in protection against DNA damage induced by rifamycin SV and copper(II) ions. *Free Radic Res Commun.* 1993;19(2):81–92.
87. Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Loft S. Radiation-induced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis.* 1994 Aug;15(8):1609–12.
88. Muñoz P, Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent J V, Oliva MR, et al. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1995 Apr;18(4):747–55.
89. Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett.* 2018 Oct 1;433:33–42.
90. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol.* 2014 Jul 1;5:151.
91. Paniker N V, Srivastava SK, Beutler E. Glutathione metabolism of the red cells. Effect of glutathione reductase deficiency on the stimulation of hexose monophosphate shunt under oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 1970 Sep 22;215(3):456–60.
92. Sies H. *Biochemistry of Oxidative Stress.* Angew Chemie Int Ed English. 1986 Dec 1;25(12):1058–71.
93. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015 Apr;4:180–3.
94. Darnell JE, Doolittle WF. Speculations on the early course of

- evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Mar;83(5):1271–5.
95. Ohta T, Kimura M. Functional Organization of Genetic Material as a Product of Molecular Evolution. *Nature*. 1971 Sep 10;233(5315):118–9.
96. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 1991 Jan 31;349(6308):431–4.
97. Oliva MR, Ripoll F, Muñoz P, Iradi A, Trullenque R, Valls V, et al. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog*. 1997 Apr;18(4):232–43.
98. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jun 1;30(11):1286–92.
99. Collado R, Oliver I, Tormos C, Egea M, Miguel A, Cerdá C, et al. Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis. *Cancer Lett*. 2012 Apr 28;317(2):144–9.
100. Collado R, Ivars D, Oliver I, Tormos C, Egea M, Miguel A, et al. Increased Oxidative Damage Associated with Unfavorable Cytogenetic Subgroups in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–5.
101. Ivars D, Orero MT, Javier K, Díaz-Vico L, García-Giménez JL, Mena S, et al. Oxidative imbalance in low/intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome patients: The influence of iron overload. *Clin Biochem*. 2017 Nov;50(16–17):911–7.

102. Sanchez M, Torres JV, Tormos C, Iradi A, Muñiz P, Espinosa O, et al. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett.* 2006 Feb 20;233(1):28–35.
103. Cerdá C, Sánchez C, Climent B, Vázquez A, Iradi A, El Amrani F, et al. Oxidative Stress and DNA Damage in Obesity-Related Tumorigenesis. In: *Advances in experimental medicine and biology.* 2014. p. 5–17.
104. Monzo-Beltran L, Vazquez-Tarragón A, Cerdà C, Garcia-Perez P, Iradi A, Sánchez C, et al. One-year follow-up of clinical, metabolic and oxidative stress profile of morbid obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. 8-oxo-dG as a clinical marker. *Redox Biol.* 2017 Aug;12:389–402.
105. Borrego S, Vazquez A, Dasí F, Cerdá C, Iradi A, Tormos C, et al. Oxidative Stress and DNA Damage in Human Gastric Carcinoma: 8-Oxo-7'8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a Possible Tumor Marker. *Int J Mol Sci.* 2013 Feb 6;14(2):3467–86.
106. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1603–16.
107. Sáez GT. DNA Damage and Repair in Degenerative Diseases 2016. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
108. European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis MD, Evans MD, Olinski R, Loft S, Cooke MS. Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-

- deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB J.* 2010 Apr;24(4):1249–60.
109. Barregard L, Møller P, Henriksen T, Mistry V, Koppen G, Rossner P, et al. Human and Methodological Sources of Variability in the Measurement of Urinary 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jun 20;18(18):2377–91.
110. Sanz A. Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2016 Aug;1857(8):1116–26.
111. Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, et al. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;340:209–344.
112. Cerdá Mico C, Sáez Tormo G. Implicaciones fisiopatológicas del estrés oxidativo fetal. In: Pascual-Leone AM, Medina JM, editors. *Desarrollo perinatal: Origen de Patologías Adultas.* Instituto de España. Real Academia de Farmacia.; 2008. p. 303–26.
113. Wu L, Juurlink BHJ. Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2002 Mar 1;39(3):809–14.
114. Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, et al. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension.* 2001 Feb;37(2 Pt 2):541–6.
115. Trolliet MR, Rudd MA, Loscalzo J. Oxidative stress and renal

- dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res.* 2001;24(2):116–23.
116. Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertens* . 2001 Feb;37(2 Pt 2):554–60.
117. Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 2):943–9.
118. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 15;88(22):10045–8.
119. Raj L. Nitric oxide in hypertension: relationship with renal injury and left ventricular hypertrophy. *Hypertens* . 1998 Jan 1;31(1 Pt 2):189–93.
120. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertens* . 1999 Oct;34(4 Pt 1):539–45.
121. Orié NN, Zidek W, Tepel M. Reactive oxygen species in essential hypertension and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hypertens*. 1999 Dec;12(12 Pt 1-2):1169–74.
122. Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertens* . 2002 Mar 1;39(3):777–80.
123. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification

- hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*. 2002 Apr 30;105(17):2107–11.
124. Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, et al. Antioxidant Activities and Oxidative Stress Byproducts in Human Hypertension. *Hypertension*. 2003 May;41(5):1096–101.
125. Sáez GT, Tormos C, Giner V, Chaves J, Lozano J V, Iradi A, et al. Factors Related to the Impact of Antihypertensive Treatment in Antioxidant Activities and Oxidative Stress By-Products in Human Hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17:809–16.
126. Fandos M, Corella D, Guillén M, Portolés O, Carrasco P, Iradi A, et al. Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population. *Free Radic Res*. 2009 Jan 12;43(12):1179–86.
127. Giner V, Tormos C, Chaves FJ, Saez G, Redon J. Microalbuminuria and oxidative stress in essential hypertension. *J Intern Med*. 2004 May;255(5):588–94.
128. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, et al. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2003 Oct 23;349(17):1605–13.
129. Berliner JA, Watson AD. A Role for Oxidized Phospholipids in Atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2005 Jul 7;353(1):9–11.
130. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, McConnell JP, Lennon RJ, Kornman KS, et al. Oxidized Phospholipids, Lp(a) Lipoprotein,

- and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2005 Jul 7;353(1):46–57.
131. Espinosa O, Jiménez-Almazán J, Chaves FJ, Tormos MC, Clapes S, Iradi A, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic Res.* 2007 Jan 7;41(5):546–54.
132. Violi F, Loffredo L, Carnevale R, Pignatelli P, Pastori D. Atherothrombosis and Oxidative Stress: Mechanisms and Management in Elderly. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Nov 10;27(14):1083–124.
133. Kong X, Guan J, Li J, Wei J, Wang R. P66Shc-SIRT1 Regulation of Oxidative Stress Protects Against Cardio-cerebral Vascular Disease. *Mol Neurobiol.* 2017 Sep 30;54(7):5277–85.
134. Xu Q, Huff LP, Fujii M, Griending KK. Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system. *Free Radic Biol Med.* 2017 Aug;109:84–107.
135. Taverne YJHJ, Bogers AJJC, Duncker DJ, Merkus D. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev.* 2013 Apr 22;2013:862423.
136. Vara D, Pula G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Curr Mol Med.* 2014;14(9):1103–25.
137. He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015 Nov 20;16(11):27770–80.

138. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med*. 2018 Jun 21;378(25):e34.
139. Cerdá Micó C, Borreguero Oliva S, Sáez Tormo G. Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. In: *Monografías Real Academia Nacional de Farmacia*. 2010.
140. Carvalho A, Firuzi O, Joao Gama M, van Horsen J, Saso L. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope? *Curr Drug Targets*. 2017 Mar 30;18(6):705–18.
141. Sakellariou GK, Lightfoot AP, Earl KE, Stofanko M, McDonagh B. Redox homeostasis and age-related deficits in neuromuscular integrity and function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017 Dec;8(6):881–906.
142. Jackson MJ, McArdle A. Role of reactive oxygen species in age-related neuromuscular deficits. *J Physiol*. 2016 Apr 15;594(8):1979–88.
143. Miller RA. Gerontology as oncology. Research on aging as the key to the understanding of cancer. *Cancer*. 1991 Dec 1;68(11 Suppl):2496–501.
144. Zimmerman R, Cerutti P. Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T1/2/C18 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Apr;81(7):2085–7.
145. Du MQ, Carmichael PL, Phillips DH. Induction of activating mutations in the human c-Ha-ras-1 proto-oncogene by oxygen free radicals. *Mol Carcinog*. 1994 Nov;11(3):170–5.

146. Wei H. Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species. *Med Hypotheses*. 1992 Nov;39(3):267–70.
147. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N Y Acad Sci*. 1992 Nov 21;663:85–96.
148. Mondal S, Heidelberger C. Transformation of C3H/10T1/2CL8 mouse embryo fibroblasts by ultraviolet irradiation and a phorbol ester. *Nature*. 1976 Apr 22;260(5553):710–1.
149. Markkanen E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2017 Nov;59:82–105.
150. Poletto M, Legrand AJ, Fletcher SC, Dianov GL. p53 coordinates base excision repair to prevent genomic instability. *Nucleic Acids Res*. 2016 Apr 20;44(7):3165–75.
151. Gannett PM, Sura TP. Base pairing of 8-oxoguanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine with 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytosine, 2'-deoxyguanosine, and thymidine. *Chem Res Toxicol*. 6(5):690–700.
152. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull*. 1993 Jul;49(3):523–44.
153. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med (Berl)*. 1996 Jun;74(6):297–312.
154. Soini Y, Haapasaari K-M, Vaarala MH, Turpeenniemi-Hujanen T, Kärjä V, Karihtala P. 8-hydroxydeguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011 Mar;4(3):267–75.

155. Pylväs M, Puistola U, Laatio L, Kauppila S, Karihtala P. Elevated serum 8-OHdG is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2011 Apr;31(4):1411–5.
156. Pande D, Negi R, Karki K, Khanna S, Khanna RS, Khanna HD. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. *Transl Res.* 2012 Dec;160(6):411–8.
157. Roszkowski K, Olinski R. Urinary 8-Oxoguanine as a Predictor of Survival in Patients Undergoing Radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Apr 1;21(4):629–34.
158. Dziaman T, Banaszkiwicz Z, Roszkowski K, Gackowski D, Wisniewska E, Rozalski R, et al. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and uric acid as efficient predictors of survival in colon cancer patients. *Int J cancer.* 2014 Jan 15;134(2):376–83.
159. He H, Zhao Y, Wang N, Zhang L, Wang C. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine expression predicts outcome of esophageal cancer. *Ann Diagn Pathol.* 2014 Dec;18(6):326–8.
160. Lee JD, Cai Q, Shu XO, Nechuta SJ. The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *J Womens Health (Larchmt).* 2017 May;26(5):467–82.
161. Cerdá Micó, C; Salvador Verdú, A; Ocete Mochón, D; Torregrosa Sánchez, M; Fandos Martínez, M; Sáez Tormo G. Estrés oxidativo, envejecimiento y cancer. In: Sastre, Juan; Ramón, R; Pamplona R, editor. *Biogerontología Médica.* Ergón; 2009. p. 71–85.

162. Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res.* 2006 Jan 7;40(12):1339–49.
163. Lou MF, Dickerson JE, Garadi R. The role of protein-thiol mixed disulfides in cataractogenesis. *Exp Eye Res.* 1990 Jun;50(6):819–26.
164. Humphries KM, Szweda PA, Szweda LI. Aging: A shift from redox regulation to oxidative damage. *Free Radic Res.* 2006 Jan 7;40(12):1239–43.
165. Vilar-Rojas C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch Med Res.* 1996;27(1):1–6.
166. Martinez M, Hernández AI, Martínez N, Ferrándiz ML. Age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain Res.* 1996 Aug 26;731(1–2):246–8.
167. Yan LJ, Sohal RS. Analysis of oxidative modification of proteins. *Curr Protoc protein Sci.* 2001 May;Chapter 14:Unit14.4.
168. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2002 Jul 1;33(1):29–36.
169. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science.* 1992 Aug 28;257(5074):1220–4.
170. Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA. Protein modification in aging. *EXS.* 1992;62:64–72.
171. Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001 Nov;56(11):B459-

- 67.
172. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006 Jan 7;40(12):1250–8.
173. Castro JP, Jung T, Grune T, Siems W. 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radic Biol Med.* 2017 Oct;111:309–15.
174. Barber AA, Bernheim F. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Adv Gerontol Res.* 1967;2:355–403.
175. Chio KS, Reiss U, Fletcher B, Tappel AL. Peroxidation of subcellular organelles: formation of lipofuscinlike fluorescent pigments. *Science.* 1969 Dec 19;166(3912):1535–6.
176. Sohal RS, Brunk UT. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol.* 1989;266:17–26; discussion 27-9.
177. Jozwiak Z, Jasnowska B. Changes in oxygen-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. *Mech Ageing Dev.* 1985 Oct 14;32(1):77–83.
178. Farooqui MY, Day WW, Zamorano DM. Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comp Biochem Physiol B.* 1987;88(1):177–80.
179. Zhang H, Forman HJ. 4-hydroxynonenal-mediated signaling and aging. *Free Radic Biol Med.* 2017 Oct;111:219–25.
180. Di Domenico F, Tramutola A, Butterfield DA. Role of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the pathogenesis of alzheimer

- disease and other selected age-related neurodegenerative disorders. *Free Radic Biol Med.* 2017 Oct;111:253–61.
181. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989 Apr 6;320(14):915–24.
182. Anitschkow N CS. Ueber experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung fuer die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentrbl Allg Pathol Pathol Anat.* 1913;24:1–9.
183. Steinberg D. In celebration of the 100th anniversary of the lipid hypothesis of atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2013 Nov;54(11):2946–9.
184. Radak Z, Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: Links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2010 Aug 15;49(4):587–96.
185. Hart RW, D'Ambrosio SM, Ng KJ, Modak SP. Longevity, stability and DNA repair. *Mech Ageing Dev.* 1979 Feb;9(3–4):203–23.
186. Su CM, Brash DE, Turturro A, Hart RW. Longevity-dependent organ-specific accumulation of DNA damage in two closely related murine species. *Mech Ageing Dev.* 1984 Oct 15;27(2):239–47.
187. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jun;87(12):4533–7.

188. Gaubatz JW. DNA damage during aging of mouse myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1986 Dec;18(12):1317–20.
189. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol.* 1993 Oct;34(4):609–16.
190. Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998 Jan;217(1):53–63.
191. Shi F, Nie B, Gan W, Zhou X-Y, Takagi Y, Hayakawa H, et al. Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. *Free Radic Res.* 2012 Sep 21;46(9):1093–8.
192. Nie B, Gan W, Shi F, Hu G-X, Chen L-G, Hayakawa H, et al. Age-Dependent Accumulation of 8-Oxoguanine in the DNA and RNA in Various Rat Tissues. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:1–9.
193. Gan W, Liu X-L, Yu T, Zou Y-G, Li T-T, Wang S, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanosine as a Potential Biomarker of Aging. *Front Aging Neurosci.* 2018 Feb 27;10:34.
194. Gan W, Nie B, Shi F, Xu X-M, Qian J-C, Takagi Y, et al. Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC–MS/MS: Urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free Radic Biol Med.* 2012 May 1;52(9):1700–7.
195. Muñiz, Maria José P, Garcia Barchino MJ, Iradi A, Mahiques

- E, Marco V, Oliva MR, et al. Age-Related Changes of Liver Antioxidant Enzymes and 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine During Fetal–Neonate Transition and Early Rat Development. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)*. 2000 Jun 1;49(6):497–500.
196. Cand F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic Biol Med*. 1989;7(1):59–63.
197. Cutler RG. Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr*. 1991 Jan 1;53(1 Suppl):373S-379S.
198. Rikans LE, Moore DR, Snowden CD. Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1991 May 24;1074(1):195–200.
199. Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 1999 Sep;27(5–6):617–22.
200. Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol*. 2001 Feb;36(2):209–20.
201. Navarro A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Mol Aspects Med*. 2004 Feb;25(1–2):37–48.
202. Pawluk H, Pawluk R, Robaczewska J, Kędziora-Kornatowska K, Kędziora J. Biomarkers of antioxidant status and lipid peroxidation in elderly patients with hypertension. *Redox Rep*.

- 2017 Nov 2;22(6):542–6.
203. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Nov 10;23(14):1144–70.
204. McCarter R. Caloric restriction, exercise and aging. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. In: Sen CK, Packer L, Hänninen O, editors. Elsevier; 2000. p. 1207.
205. WHO. Keep fit for life Meeting the nutritional needs of older persons. 2002.
206. Beltran Valls MR, Dimauro I, Brunelli A, Tranchita E, Ciminelli E, Caserotti P, et al. Explosive type of moderate-resistance training induces functional, cardiovascular, and molecular adaptations in the elderly. *Age (Omaha)*. 2014 Apr 18;36(2):759–72.
207. Zorrilla García A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. 2002;21(3):178–85.
208. Polidori MC, Mecocci P, Cherubini A, Senin U. Physical Activity and Oxidative Stress During Aging. *Int J Sports Med*. 2000 Apr;21(3):154–7.
209. Lovering RM, Brooks S V. Eccentric exercise in aging and diseased skeletal muscle: good or bad? *J Appl Physiol*. 2014 Jun 1;116(11):1439–45.
210. Ji LL. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Apr;928:236–47.
211. Ji LL. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Apr;959:82–92.

212. Schmidt HHHW, Stocker R, Vollbracht C, Paulsen G, Riley D, Daiber A, et al. Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Nov 10;23(14):1130–43.
213. Theilen NT, Kunkel GH, Tyagi SC. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. *J Cell Physiol*. 2017 Sep;232(9):2348–58.
214. Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol*. 2016 Dec;10:191–9.
215. Radak Z, Bori Z, Koltai E, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Douroudos II, et al. Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 15;51(2):417–23.
216. Gargallo P, Colado JC, Jueas A, Hernando-Espinilla A, Estañ-Capell N, Monzó-Beltran L, et al. The Effect of Moderate- Versus High-Intensity Resistance Training on Systemic Redox State and DNA Damage in Healthy Older Women. *Biol Res Nurs*. 2018 Mar 23;20(2):205–17.
217. Schulz KF, Altman DG, Moher D, CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC Med*. 2010 Dec 24;8(1):18.
218. Rikli RE, Jones CJ. Development and validation of criterion-referenced clinically relevant fitness standards for maintaining physical independence in later years. *Gerontologist*. 2013 Apr 1;53(2):255–67.
219. Flandez J, Belando N, Gargallo P, Fernández-Garrido J,

- Vargas-Foitzick RA, Devis-Devis J, et al. Metabolic and Functional Profile of Premenopausal Women With Metabolic Syndrome After Training With Elastics as Compared to Free Weights. *Biol Res Nurs*. 2017 Mar;19(2):190–7.
220. Mora Vicente J, González Montesinos JL, Mora Rodríguez H. Batería De Tests Más Utilizadas Para La Valoración De Los Niveles De Condición Física En Sujetos Mayores. *REEFD*. 2007;380–381(6–7):107–29.
221. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee I-M, et al. Quantity and Quality of Exercise for Developing and Maintaining Cardiorespiratory, Musculoskeletal, and Neuromotor Fitness in Apparently Healthy Adults. *Med Sci Sport Exerc*. 2011 Jul;43(7):1334–59.
222. Romero-Arenas S, Pérez-Gómez J, Alcaraz PE. Circuit training. A useful tool for preventing the effects of aging? *Cult Sci Sport*. 2011;6:185–92.
223. Colado JC, Garcia-Masso X, Rogers ME, Tella V, Benavent J, Dantas EH. Effects of aquatic and dry land resistance training devices on body composition and physical capacity in postmenopausal women. *J Hum Kinet*. 2012 May;32:185–95.
224. Colado JC, Garcia-Masso X, Pellicer M, Alakhdar Y, Benavent J, Cabeza-Ruiz R. A Comparison of Elastic Tubing and Isotonic Resistance Exercises. *Int J Sports Med*. 2010 Nov 11;31(11):810–7.
225. Gargallo P, Flandez J, Colado JC, Calatayud J, Madera J, Moya D. Elastic tubing and free weights achieved comparable improvements in pre and postmenopausal women. *J Strength*

Cond Res. 2014;28:S81.

226. Colado JC, Pedrosa FM, Juegas A, Gargallo P, Carrasco JJ, Flandez J, et al. Concurrent validation of the OMNI-Resistance Exercise Scale of perceived exertion with elastic bands in the elderly. *Exp Gerontol.* 2018;103:11–6.
227. Lowry OH, Rosebrough NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265–75.
228. Li Y-S, Song M-F, Kasai H, Kawai K. 8-hydroxyguanine in urine and serum as an oxidative stress marker: effects of diabetes and aging. *J UOEH.* 2013 Jun 1;35(2):119–27.
229. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences Second Edition.* Lawrence Erlbaum;
230. Miller R. Chapter 1. *Biology of Aging and Longevity.* In: Hazzard: *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology.* Third. NY: McGraw-Hill; 1994. p. 3–4.
231. age | Definition of age in English by Lexico Dictionaries [Internet]. [cited 2019 Aug 10]. Available from: <https://www.lexico.com/en/definition/age>
232. Geokas M. *Clinics in geriatric medicine. The aging process.* 1985;1.
233. Gomberg M. An Instance of Trivalent Carbon: Triphenylmethyl; *J Am Chem Soc.* 1900 Nov;22(11):757–71.
234. The Discovery of Organic Free Radicals by Moses Gomberg. *Am Chem Soc Div Hist Chem Off Commun.* 2000;1–4.

235. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239–47.
236. Davies JMS, Cillard J, Friguet B, Cadenas E, Cadet J, Cayce R, et al. The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. *GeroScience*. 2017 Dec 21;39(5–6):499–550.
237. Lomeli N, Bota DA, Davies KJA. Diminished stress resistance and defective adaptive homeostasis in age-related diseases. *Clin Sci*. 2017 Nov 1;131(21):2573–99.
238. Ludovico P, Osiewacz HD, Costa V, Burhans WC. Cellular Models of Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:1–3.
239. Back P, Braeckman BP, Matthijssens F. ROS in Aging *Caenorhabditis elegans*: Damage or Signaling? *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:1–14.
240. Monti D, Salvioli S, Capri M, Malorni W, Straface E, Cossarizza A, et al. Decreased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly and centenarians. *Mech Ageing Dev*. 2000 Dec 20;121(1–3):239–50.
241. Gabriela Jimenez A. “The Same Thing That Makes You Live Can Kill You in the End”: Exploring the Effects of Growth Rates and Longevity on Cellular Metabolic Rates and Oxidative Stress in Mammals and Birds. *Integr Comp Biol*. 2018 Sep 1;58(3):544–58.
242. Jacob KD, Noren Hooten N, Trzeciak AR, Evans MK. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev*. 2013 Mar;134(3–4):139–

57.

243. Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, et al. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med.* 2015 Jan;78:233–5.
244. Cutler RG. Oxidative Stress and Aging: Catalase Is a Longevity Determinant Enzyme. *Rejuvenation Res.* 2005 Sep;8(3):138–40.
245. Tokunaga K, Kanno K, Ochi M, Nishimiya T, Shishino K, Murase M, et al. [Lipid peroxide and antioxidants in the elderly]. *Rinsho Byori.* 1998 Aug;46(8):783–9.
246. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol.* 2001 Mar 31;44(1):1–11.
247. Barja G. Updating the Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: An Integrated View, Key Aspects, and Confounding Concepts. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Oct 20;19(12):1420–45.
248. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging.* 2007;2(3):377–87.
249. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999 Dec;27(11–12):1173–81.

250. Artur Y, Herbeth B, Guémouri L, Lecomte E, Jeandel C, Siest G. Age-related variations of enzymatic defenses against free radicals and peroxides. *EXS*. 1992;62:359–67.
251. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86(1):715–48.
252. Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol*. 2002 Dec;37(12):1333–45.
253. Milisav I, Ribarič S, Poljsak B. Antioxidant Vitamins and Ageing. In: *Sub-cellular biochemistry*. 2018. p. 1–23.
254. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:183–97.
255. Pryor W, editor. *The Nature of Free Radicals in Biology V1*. 1st ed. Academic Press; 1980. 370 p.
256. Dalle-Donne I. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem [Internet]*. 2006 Feb 16 [cited 2019 Aug 12];52(4):601–23. Available from: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2005.061408>
257. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(5):707–27.
258. Gutteridge JMC, Tickner TR. The characterisation of thiobarbituric acid reactivity in human plasma and urine. *Anal Biochem*. 1978 Nov;91(1):250–7.

259. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515–40.
260. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(2):231–55.
261. Montuschi P, Barnes PJ, ROBERTS LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 2004 Dec;18(15):1791–800.
262. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. *Free Radic Biol Med.* 2000 Feb 15;28(4):505–13.
263. Davies SS, Roberts LJ. F2-isoprostanes as an indicator and risk factor for coronary heart disease. *Free Radic Biol Med.* 2011 Mar 1;50(5):559–66.
264. Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008 Feb 1;44(3):247–56.
265. Montine TJ, Peskind ER, Quinn JF, Wilson AM, Montine KS, Galasko D. Increased Cerebrospinal Fluid F2-Isoprostanes are Associated with Aging and Latent Alzheimer's Disease as Identified by Biomarkers. *NeuroMolecular Med.* 2011 Mar 15;13(1):37–43.
266. Choksi KB, Roberts LJ, DeFord JH, Rabek JP, Papaconstantinou J. Lower levels of F2-isoprostanes in serum and livers of long-lived Ames dwarf mice. *Biochem Biophys*

- Res Commun. 2007 Dec 28;364(4):761–4.
267. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003 Dec 29;25(3–4):207–18.
268. Stadtman ER, Levine RL. Protein Oxidation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Jan 25;899(1):191–208.
269. Stadtman ER. Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jan 25;928(1):22–38.
270. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*. 2002 Jun 1;32(11):1102–15.
271. Orgel LE. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing: a correction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970 Nov;67(3):1476.
272. Zetterberg H, Båth M, Zetterberg M, Bernhardt P, Hammarsten O. The Szilard Hypothesis on the Nature of Aging Revisited. *Genetics*. 2009 May;182(1):3–9.
273. Cooke MS, Olinski R, Loft S, European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis. Measurement and Meaning of Oxidatively Modified DNA Lesions in Urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Jan 9;17(1):3–14.
274. Lorenzano S, Rost NS, Khan M, Li H, Lima FO, Maas MB, et al. Oxidative Stress Biomarkers of Brain Damage. *Stroke*. 2018 Mar;49(3):630–7.
275. Parise G, Brose A, Tarnopolsky M. Resistance exercise

- training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults. *Exp Gerontol.* 2005 Mar;40(3):173–80.
276. Soares JP, Silva AM, Oliveira MM, Peixoto F, Gaivão I, Mota MP. Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. *Age (Omaha).* 2015 Jun 5;37(3):61.
277. Rall, Roubenoff, Meydani, Han, Meydani. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging: effect of progressive resistance training. *J Nutr Biochem.* 2000 Nov;11(11–12):581–4.
278. Franzke B, Halper B, Hofmann M, Oesen S, Jandrasits W, Baierl A, et al. The impact of six months strength training, nutritional supplementation or cognitive training on DNA damage in institutionalised elderly. *Mutagenesis.* 2015 Jan 1;30(1):147–53.
279. Çakir-Atabek H, Demir S, Pinarbaşılı RD, Gündüz N. Effects of Different Resistance Training Intensity on Indices of Oxidative Stress. *J Strength Cond Res.* 2010 Sep;24(9):2491–7.
280. Schiffel C, Zieres C, Zankl H. Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutat Res.* 1997 Mar 17;389(2–3):243–6.
281. Goon JA, Aini AHN, Musalmah M, Anum MYY, Wan Ngah WZ. Long term Tai Chi exercise reduced DNA damage and increased lymphocyte apoptosis and proliferation in older adults. *Med J Malaysia.* 2008;63(4):319–24.
282. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen

- Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Apr 1;18(10):1208–46.
283. Vincent K, Vincent H, Braith R, Lennon S, Lowenthal D. Resistance exercise training attenuates exercise-induced lipid peroxidation in the elderly. *Eur J Appl Physiol*. 2002 Jan 1;87(4–5):416–23.
284. Kłapcińska B, Derejczyk J, Wieczorowska-Tobis K, Sobczak A, Sadowska-Krepa E, Danch A. Antioxidant defense in centenarians (a preliminary study). *Acta Biochim Pol*. 2000;47(2):281–92.
285. Lawler JM, Powers SK. Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Can J Appl Physiol*. 1998 Feb;23(1):23–55.
286. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem*. 2001 Jun;8(7):829–38.
287. Traustadóttir T, Davies SS, Su Y, Choi L, Brown-Borg HM, Roberts LJ, et al. Oxidative stress in older adults: effects of physical fitness. *Age (Omaha)*. 2012 Aug 14;34(4):969–82.
288. Padilha CS, Ribeiro AS, Fleck SJ, Nascimento MA, Pina FLC, Okino AM, et al. Effect of resistance training with different frequencies and detraining on muscular strength and oxidative stress biomarkers in older women. *Age (Omaha)*. 2015 Oct 30;37(5):104.
289. Ribeiro AS, Deminice R, Schoenfeld BJ, Tomeleri CM, Padilha

- CS, Venturini D, et al. Effect of Resistance Training Systems on Oxidative Stress in Older Women. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2017 Oct;27(5):439–47.
290. Çakır-Atabek H, Özdemir F, Çolak R. Oxidative stress and antioxidant responses to progressive resistance exercise intensity in trained and untrained males. *Biol Sport.* 2015 Aug 4;32(4):321–8.
291. Shahar S, Norshafarina NS, Badrasawi M, Noor NIM, Abdul Manaf Z, Zaitun Yassin M, et al. Effectiveness of exercise and protein supplementation intervention on body composition, functional fitness, and oxidative stress among elderly Malays with sarcopenia. *Clin Interv Aging.* 2013 Oct;8:1365.
292. Valls MRB, Dimauro I, Brunelli A, Tranchita E, Ciminelli E, Caserotti P, et al. Explosive type of moderate-resistance training induces functional, cardiovascular, and molecular adaptations in the elderly. *Age (Omaha).* 2014 Apr 18;36(2):759–72.
293. Peters PG, Alessio HM, Hagerman AE, Ashton T, Nagy S, Wiley RL. Short-term isometric exercise reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: Possible role of reactive oxygen species. *Int J Cardiol.* 2006 Jun 16;110(2):199–205.
294. Holland AE, Hill CJ, Rasekaba T, Lee A, Naughton MT, McDonald CF. Updating the Minimal Important Difference for Six-Minute Walk Distance in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010 Feb;91(2):221–5.
295. Mangione KK, Craik RL, McCormick AA, Blevins HL, White

- MB, Sullivan-Marx EM, et al. Detectable Changes in Physical Performance Measures in Elderly African Americans. *Phys Ther.* 2010 Jun 1;90(6):921–7.
296. Mangione KK, Miller AH, Naughton I V. Cochrane Review: Improving Physical Function and Performance With Progressive Resistance Strength Training in Older Adults. *Phys Ther.* 2010 Dec 1;90(12):1711–5.
297. Borde R, Hortobágyi T, Granacher U. Dose-Response Relationships of Resistance Training in Healthy Old Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* 2015 Dec;45(12):1693–720.
298. Peterson MD, Rhea MR, Sen A, Gordon PM. Resistance exercise for muscular strength in older adults: A meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2010 Jul;9(3):226–37.
299. Raymond MJ, Bramley-Tzerfos RE, Jeffs KJ, Winter A, Holland AE. Systematic Review of High-Intensity Progressive Resistance Strength Training of the Lower Limb Compared With Other Intensities of Strength Training in Older Adults. *Arch Phys Med Rehabil.* 2013 Aug;94(8):1458–72.
300. Steib S, Schoene D, Pfeifer K. Dose-Response Relationship of Resistance Training in Older Adults. *Med Sci Sport Exerc.* 2010 May;42(5):902–14.
301. Colado JC, Triplett NT. Effects of a Short-Term Resistance Program Using Elastic Bands Versus Weight Machines for Sedentary Middle-Aged Women. *J Strength Cond Res.* 2008 Sep;22(5):1441–8.
302. Chupel MU, Direito F, Furtado GE, Minuzzi LG, Pedrosa FM,

- Colado JC, et al. Strength Training Decreases Inflammation and Increases Cognition and Physical Fitness in Older Women with Cognitive Impairment. *Front Physiol.* 2017 Jun 12;8:377.
303. Aparicio García-Molina, V.A Carbonell Baeza A, Delgado Fernández Mg-M. Beneficios de la actividad física en personas mayores. *Rev Int Med y Ciencias la Act Física y el Deport .* 2010;10(40):556–76.
304. Rossi AP, Bianchi L, Volpato S, Bandinelli S, Guralnik J, Zamboni M, et al. Dynapenic Abdominal Obesity as a Predictor of Worsening Disability, Hospitalization, and Mortality in Older Adults: Results From the InCHIANTI Study. *Journals Gerontol Ser A.* 2017 Aug 1;72(8):1098–104.

ANEXOS

VIII. ANEXOS

1. ANEXO I. Abreviaturas

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
Ac-OGG1	OGG1 acetilada
ACR	acroleína— lisina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AI	Alta Intensidad
AP-1	Activador de proteína
APE1 apurinica/apirimidinica1	endonucleasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenintrifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
CG	Grupo Control
CMNc	Células mononucleares circulantes
CoQ	Coenzima Q
CREA	Creatinina
CuZnSOD	Superóxido dismutasa de Zn y Cu
4-HNE	4-8 hidroxinonenal .
DNP	Dinitrofenilhidrazina

DO	Daño Oxidativo
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EO	Estrés Oxidativo
ER	Receptores de estrógenos
ES	Tamaño del efecto (Effect Size)
ETC	Cadena de Transporte Electrónico mitocondrial
F2-IP	F2-Isoprostanos
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GLC	Glucosa
GOT	Aspartato amino transferasa
GPT	Alanina amino transferasa
GPxs	Glutación peroxidasas
GR	GSH reductasa
GS	Glutamina sintetasa
G-6-PDH	Glucosa-6-P deshidrogenasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GSTs	Glutathion S-transferasa
GTP	Guanosín Trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HEL	Aductos de hexanoil —lisina
INE	Instituto Nacional de Estadística
LDL	Lipoproteína de baja densidad

LDLox	LDL oxidadas
LDG	Genes determinantes de longevidad
LOO [•]	Radical peroxilo
LPO	Productos de peroxidación lipídica
LPS	Lipopolisacárido
LSD1	Histona desmetilasa específica lisina
MDA	Malonildialdehido
[(MDA (TBA) ₂]	Ácido MDA-tiobarbitúrico
MI	Moderada Intensidad
MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso
mtNOS	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Factor transcripción nuclear Kappa B
Nrf2	Factor 2 relacionado con el eritroide 2
NO	Óxido nítrico
¹ O ₂ :	Oxígeno singlete
O ₂ ^{•-}	Radical aniónico superóxido
OGG1	8-oxoguanina-DNA glicosilasa
[•] OH	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OH8dG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihidro-2'deoxiguanosina
8-oxo-dGo	8-hidroxiguanina

8-oxoG	8-oxo-7,8-dihidroguanina
PAO	Capacidad antioxidante del plasma
PBN	N-terc-butil-alfa-fenilnitrona
PC	Proteínas Carboniladas
PCRU	Proteína C reactiva ultrasensible
PG	Prostaglandina
Prxs	Peroxidasas.
PT	Proteínas totales
REP	Repeticiones
REST SETS	Recuperación activa entre series
REST EXER	Descanso entre ejercicios
1RM	Una repetición máxima
RONS	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
-ROOH	Hidroperóxidos
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPE	Tasa de esfuerzo percibido
r.p.e.	Resonancia Paramagnética de Electrones
RT	Temperatura ambiente
RTP	Programa de entrenamiento de resistencia
SETS	Nº de series por ejercicio
SNC	Sistema nervioso central
-SH	Grupo tiólico o grupo sulfhidrilo
SOD	Superóxido dismutasas

SPPB	Short Physical Performance Battery o Test de Guralnik
-S-S-	Puente disulfuro
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Tbooh	Tert-butil-hidroperóxido
TC	Colesterol Total
TG	Triglicéridos
TMAO	N-óxido de trimetilamina
Trx	Tiorredoxinas
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TUG	Time-up-and-go
URE	Urea
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

2. ANEXO II. CORRELACIONES ESTADÍSTICAS

2.1. CORRELACIONES 18 - 90 AÑOS

		EDAD	8-OXO	ISO	OXO-DG	CAT
EDAD	Correlación Pearson	1	,673**	,362**	-,010	-,115
	Sig. (unilateral)		,000	,000	,458	,106
	N	120	102	102	120	120
8-OXO	Correlación Pearson	,673**	1	,575**	-,016	,132
	Sig. (unilateral)	,000		,000	,435	,093
	N	102	102	102	102	102
ISO	Correlación Pearson	,362**	,575**	1	,019	,050
	Sig. (unilateral)	,000	,000		,425	,307
	N	102	102	102	102	102
OXO-DG	Correlación Pearson	-,010	-,016	,019	1	-,012
	Sig. (unilateral)	,458	,435	,425		,448
	N	120	102	102	120	120
CAT	Correlación Pearson	-,115	,132	,050	-,012	1
	Sig. (unilateral)	,106	,093	,307	,448	
	N	120	102	102	120	120
GSH	Correlación Pearson	-,359**	-,446**	-,341**	,015	,086
	Sig. (unilateral)	,000	,000	,000	,434	,175
	N	120	102	102	120	120
GSSG	Correlación Pearson	,122	,107	,070	-,075	-,121
	Sig. (unilateral)	,092	,143	,241	,208	,094
	N	120	102	102	120	120
GSSG_GSH	Correlación Pearson	,217**	,244**	,176*	-,072	-,134
	Sig. (unilateral)	,009	,007	,038	,216	,073
	N	120	102	102	120	120
GPX	Correlación Pearson	-,401**	-,375**	-,157	,119	,241**
	Sig. (unilateral)	,000	,000	,057	,098	,004
	N	120	102	102	120	120
SOD	Correlación Pearson	,055	,051	-,020	,065	-,023
	Sig. (unilateral)	,276	,304	,423	,242	,400
	N	120	102	102	120	120
MDA	Correlación Pearson	-,244**	-,087	,173*	,093	,232**
	Sig. (unilateral)	,004	,191	,041	,155	,005
	N	120	102	102	120	120

		GSH	GSSG	GSSG_GSH	GPX	SOD
EDAD	Correlación Pearson	-	,122	,217 ^{**}	-,401 ^{**}	,055
	Sig. (unilateral)	,000	,092	,009	,000	,276
	N	120	120	120	120	120
8-OXO	Correlación Pearson	-	,107	,244 ^{**}	-,375 ^{**}	,051
	Sig. (unilateral)	,000	,143	,007	,000	,304
	N	102	102	102	102	102
ISO	Correlación Pearson	-	,070	,176 [*]	-,157	-,020
	Sig. (unilateral)	,000	,241	,038	,057	,423
	N	102	102	102	102	102
OXO-DG	Correlación Pearson	,015	-,075	-,072	,119	,065
	Sig. (unilateral)	,434	,208	,216	,098	,242
	N	120	120	120	120	120
CAT	Correlación Pearson	,086	-,121	-,134	,241 ^{**}	-,023
	Sig. (unilateral)	,175	,094	,073	,004	,400
	N	120	120	120	120	120
GSH	Correlación Pearson	1	-,148	-,452 ^{**}	,272 ^{**}	-,065
	Sig. (unilateral)	-	,053	,000	,001	,240
	N	120	120	120	120	120
GSSG	Correlación Pearson	-,148	1	,934 ^{**}	-,114	,187 [*]
	Sig. (unilateral)	,053		,000	,107	,020
	N	120	120	120	120	120
GSSG_GSH	Correlación Pearson	-	,934 ^{**}	1	-,217 ^{**}	,188 [*]
	Sig. (unilateral)	,000	,000		,009	,020
	N	120	120	120	120	120
GPX	Correlación Pearson	,272 [*]	-,114	-,217 ^{**}	1	-,038
	Sig. (unilateral)	,001	,107	,009		,341
	N	120	120	120	120	120
SOD	Correlación Pearson	-,065	,187 [*]	,188 [*]	-,038	1
	Sig. (unilateral)	,240	,020	,020	,341	
	N	120	120	120	120	120
MDA	Correlación Pearson	,182 [*]	-,291 ^{**}	-,336 ^{**}	,086	-,197 [*]
	Sig. (unilateral)	,024	,001	,000	,176	,015
	N	120	120	120	120	120

		MDA
EDAD	Correlación de Pearson	-,244 ^{**}
	Sig. (unilateral)	,004
	N	120
8-OXO	Correlación de Pearson	-,087
	Sig. (unilateral)	,191
	N	102
ISO	Correlación de Pearson	,173 [*]
	Sig. (unilateral)	,041
	N	102
OXO-DG	Correlación de Pearson	,093
	Sig. (unilateral)	,155
	N	120
CAT	Correlación de Pearson	,232 ^{**}
	Sig. (unilateral)	,005
	N	120
GSH	Correlación de Pearson	,182 [*]
	Sig. (unilateral)	,024
	N	120
GSSG	Correlación de Pearson	-,291 ^{**}
	Sig. (unilateral)	,001
	N	120
GSSG_GSH	Correlación de Pearson	-,336 ^{**}
	Sig. (unilateral)	,000
	N	120
GPX	Correlación de Pearson	,086
	Sig. (unilateral)	,176
	N	120
SOD	Correlación de Pearson	-,197 [*]
	Sig. (unilateral)	,015
	N	120
MDA	Correlación de Pearson	1
	Sig. (unilateral)	
	N	120

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (1 cola).

* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (1 cola).

2.2. CORRELACIONES 18 - 40 AÑOS

		EDAD	8-OXO	ISO	OXO-DG	CAT
EDAD	Correlación Pearson	1	,490 ^{**}	,385 [*]	,125	-,130
	Sig. (unilateral)		,006	,029	,275	,268
	N	25	25	25	25	25
8-OXO	Correlación Pearson	,490 ^{**}	1	,080	,181	,013
	Sig. (unilateral)	,006		,351	,194	,475
	N	25	25	25	25	25
ISO	Correlación Pearson	,385 [*]	,080	1	,043	-,104
	Sig. (unilateral)	,029	,351		,420	,310
	N	25	25	25	25	25
OXO-DG	Correlación Pearson	,125	,181	,043	1	-,006
	Sig. (unilateral)	,275	,194	,420		,489
	N	25	25	25	25	25
CAT	Correlación Pearson	-,130	,013	-,104	-,006	1
	Sig. (unilateral)	,268	,475	,310	,489	
	N	25	25	25	25	25
GSH	Correlación Pearson	-,633 ^{**}	-,297	-,188	,257	-,151
	Sig. (unilateral)	,000	,075	,184	,107	,236
	N	25	25	25	25	25
GSSG	Correlación Pearson	,199	,086	,164	,050	-,169
	Sig. (unilateral)	,170	,342	,216	,407	,210
	N	25	25	25	25	25
GSSG_GSH	Correlación Pearson	,334	,157	,200	-,032	-,135
	Sig. (unilateral)	,051	,227	,169	,439	,260
	N	25	25	25	25	25
GPX	Correlación Pearson	-,283	,115	,071	-,031	,284
	Sig. (unilateral)	,085	,292	,369	,442	,084
	N	25	25	25	25	25
SOD	Correlación Pearson	,122	-,204	,171	,531 ^{**}	,076
	Sig. (unilateral)	,280	,163	,207	,003	,359
	N	25	25	25	25	25
MDA	Correlación Pearson	,054	,117	,364 [*]	,085	,247
	Sig. (unilateral)	,398	,289	,037	,344	,117
	N	25	25	25	25	25

		GSH	GSSG	GSSG_GSH	GPX	SOD
EDAD	Correlación Pearson	-,633**	,199	,334	-,283	,122
	Sig. (unilateral)	,000	,170	,051	,085	,280
	N	25	25	25	25	25
8-OXO	Correlación Pearson	-,297	,086	,157	,115	-,204
	Sig. (unilateral)	,075	,342	,227	,292	,163
	N	25	25	25	25	25
ISO	Correlación Pearson	-,188	,164	,200	,071	,171
	Sig. (unilateral)	,184	,216	,169	,369	,207
	N	25	25	25	25	25
OXO-	Correlación Pearson	,257	,050	-,032	-,031	,531**
	Sig. (unilateral)	,107	,407	,439	,442	,003
	N	25	25	25	25	25
CAT	Correlación Pearson	-,151	-,169	-,135	,284	,076
	Sig. (unilateral)	,236	,210	,260	,084	,359
	N	25	25	25	25	25
GSH	Correlación Pearson	1	-,260	-,493**	,049	,147
	Sig. (unilateral)		,104	,006	,408	,242
	N	25	25	25	25	25
GSSG	Correlación Pearson	-,260	1	,954**	-,083	,036
	Sig. (unilateral)	,104		,000	,347	,431
	N	25	25	25	25	25
GSSG_	Correlación Pearson	-,493**	,954**	1	-,133	-,012
	Sig. (unilateral)	,006	,000		,262	,477
	N	25	25	25	25	25
GPX	Correlación Pearson	,049	-,083	-,133	1	-,087
	Sig. (unilateral)	,408	,347	,262		,340
	N	25	25	25	25	25
SOD	Correlación Pearson	,147	,036	-,012	-,087	1
	Sig. (unilateral)	,242	,431	,477	,340	
	N	25	25	25	25	25
MDA	Correlación Pearson	,085	-,213	-,250	-,045	-,171
	Sig. (unilateral)	,343	,154	,114	,415	,207
	N	25	25	25	25	25

		MDA
EDAD	Correlación de Pearson	,054
	Sig. (unilateral)	,398
	N	25
8-OXO	Correlación de Pearson	,117
	Sig. (unilateral)	,289
	N	25
ISO	Correlación de Pearson	,364*
	Sig. (unilateral)	,037
	N	25
OXO-DG	Correlación de Pearson	,085
	Sig. (unilateral)	,344
	N	25
CAT	Correlación de Pearson	,247
	Sig. (unilateral)	,117
	N	25
GSH	Correlación de Pearson	,085
	Sig. (unilateral)	,343
	N	25
GSSG	Correlación de Pearson	-,213
	Sig. (unilateral)	,154
	N	25
GSSG_GSH	Correlación de Pearson	-,250
	Sig. (unilateral)	,114
	N	25
GPX	Correlación de Pearson	-,045
	Sig. (unilateral)	,415
	N	25
SOD	Correlación de Pearson	-,171
	Sig. (unilateral)	,207
	N	25
MDA	Correlación de Pearson	1
	Sig. (unilateral)	
	N	25

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (1 cola).

* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (1 cola).

2.3. CORRELACIONES 41 - 60 AÑOS.

		EDAD	8-OXO	ISO	OXO-DG	CAT
EDAD	Correlación Pearson	1	,150	-,256	,233	,013
	Sig. (unilateral)		,238	,109	,131	,475
	N	25	25	25	25	25
8-OXO	Correlación Pearson	,150	1	,422*	-,359*	,143
	Sig. (unilateral)	,238		,018	,039	,248
	N	25	25	25	25	25
ISO	Correlación Pearson	-,256	,422*	1	,060	,199
	Sig. (unilateral)	,109	,018		,388	,170
	N	25	25	25	25	25
OXO-	Correlación Pearson	,233	-,359*	,060	1	,084
	Sig. (unilateral)	,131	,039	,388		,344
	N	25	25	25	25	25
CAT	Correlación Pearson	,013	,143	,199	,084	1
	Sig. (unilateral)	,475	,248	,170	,344	
	N	25	25	25	25	25
GSH	Correlación Pearson	-,275	-,413*	-,174	,020	,417*
	Sig. (unilateral)	,092	,020	,202	,463	,019
	N	25	25	25	25	25
GSSG	Correlación Pearson	-,330	-,217	,084	,177	,079
	Sig. (unilateral)	,053	,148	,345	,199	,353
	N	25	25	25	25	25
GSSG	Correlación Pearson	-,233	-,071	,175	,223	-,143
	Sig. (unilateral)	,131	,369	,201	,142	,247
	N	25	25	25	25	25
GPX	Correlación Pearson	,151	,289	,298	,140	,406*
	Sig. (unilateral)	,235	,081	,074	,253	,022
	N	25	25	25	25	25
SOD	Correlación Pearson	,196	,154	,255	,372*	-,011
	Sig. (unilateral)	,173	,232	,109	,033	,478
	N	25	25	25	25	25
MDA	Correlación Pearson	,089	,064	,259	,024	-,027
	Sig. (unilateral)	,335	,380	,106	,454	,449
	N	25	25	25	25	25

		GSH	GSSG	GSSG_GSH	GPX	SOD
EDAD	Correlación Pearson	-,275	-,330	-,233	,151	,196
	Sig. (unilateral)	,092	,053	,131	,235	,173
	N	25	25	25	25	25
8-	Correlación Pearson	-,413*	-,217	-,071	,289	,154
	Sig. (unilateral)	,020	,148	,369	,081	,232
	N	25	25	25	25	25
ISO	Correlación Pearson	-,174	,084	,175	,298	,255
	Sig. (unilateral)	,202	,345	,201	,074	,109
	N	25	25	25	25	25
OXO-	Correlación Pearson	,020	,177	,223	,140	,372*
	Sig. (unilateral)	,463	,199	,142	,253	,033
	N	25	25	25	25	25
CAT	Correlación Pearson	,417*	,079	-,143	,406*	-,011
	Sig. (unilateral)	,019	,353	,247	,022	,478
	N	25	25	25	25	25
GSH	Correlación Pearson	1	,432*	,001	-,191	-,191
	Sig. (unilateral)		,016	,497	,180	,180
	N	25	25	25	25	25
GSSG	Correlación Pearson	,432*	1	,897**	,012	,291
	Sig. (unilateral)	,016		,000	,478	,079
	N	25	25	25	25	25
GSSG	Correlación Pearson	,001	,897**	1	,069	,451*
	Sig. (unilateral)	,497	,000		,372	,012
	N	25	25	25	25	25
GPX	Correlación Pearson	-,191	,012	,069	1	,247
	Sig. (unilateral)	,180	,478	,372		,117
	N	25	25	25	25	25
SOD	Correlación Pearson	-,191	,291	,451*	,247	1
	Sig. (unilateral)	,180	,079	,012	,117	
	N	25	25	25	25	25
MDA	Correlación Pearson	-,004	-,053	-,088	-,220	,057
	Sig. (unilateral)	,493	,400	,337	,146	,393
	N	25	25	25	25	25

		MDA
EDAD	Correlación de Pearson	,089
	Sig. (unilateral)	,335
	N	25
8-OXO	Correlación de Pearson	,064
	Sig. (unilateral)	,380
	N	25
ISO	Correlación de Pearson	,259
	Sig. (unilateral)	,106
	N	25
OXO-DG	Correlación de Pearson	,024
	Sig. (unilateral)	,454
	N	25
CAT	Correlación de Pearson	-,027
	Sig. (unilateral)	,449
	N	25
GSH	Correlación de Pearson	-,004
	Sig. (unilateral)	,493
	N	25
GSSG	Correlación de Pearson	-,053
	Sig. (unilateral)	,400
	N	25
GSSG_GSH	Correlación de Pearson	-,088
	Sig. (unilateral)	,337
	N	25
GPX	Correlación de Pearson	-,220
	Sig. (unilateral)	,146
	N	25
SOD	Correlación de Pearson	,057
	Sig. (unilateral)	,393
	N	25
MDA	Correlación de Pearson	1
	Sig. (unilateral)	
	N	25

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (1 cola).

**. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (1 cola).

2.4. CORRELACIONES 61 – 90 AÑOS



		EDAD	8-OXO	ISO	OXO-DG	CAT
EDAD	Correlación de Pearson	1	,284	-,006	,176	-,081
	Sig. (unilateral)		,100	,490	,200	,350
	N	25	22	22	25	25
8-OXO	Correlación de Pearson	,284	1	,650**	,364*	-,064
	Sig. (unilateral)	,100		,001	,048	,388
	N	22	22	22	22	22
ISO	Correlación de Pearson	-,006	,650**	1	,229	,118
	Sig. (unilateral)	,490	,001		,153	,300
	N	22	22	22	22	22
OXO-DG	Correlación de Pearson	,176	,364*	,229	1	-,236
	Sig. (unilateral)	,200	,048	,153		,128
	N	25	22	22	25	25
CAT	Correlación de Pearson	-,081	-,064	,118	-,236	1
	Sig. (unilateral)	,350	,388	,300	,128	
	N	25	22	22	25	25
GSH	Correlación de Pearson	-,115	-,473*	-,229	-,340*	,331
	Sig. (unilateral)	,293	,013	,153	,048	,053
	N	25	22	22	25	25
GSSG	Correlación de Pearson	,280	-,178	-,201	-,168	-,207
	Sig. (unilateral)	,087	,214	,185	,211	,160
	N	25	22	22	25	25
GSSG_GS	Correlación de Pearson	,320	,006	-,057	-,059	-,221
	Sig. (unilateral)	,059	,489	,401	,390	,145
	N	25	22	22	25	25
GPX	Correlación de Pearson	-,137	-,503**	-,459*	-,201	,001
	Sig. (unilateral)	,257	,009	,016	,167	,499
	N	25	22	22	25	25
SOD	Correlación de Pearson	,296	,322	,250	,125	-,069
	Sig. (unilateral)	,075	,072	,131	,277	,371
	N	25	22	22	25	25
MDA	Correlación de Pearson	-,526**	-,322	-,338	,191	-,177
	Sig. (unilateral)	,003	,072	,062	,180	,199
	N	25	22	22	25	25

		GSH	GSSG	GSSG_GSH	GPX	SOD
EDAD	Correlación de Pearson	-,115	,280	,320	-,137	,296
	Sig. (unilateral)	,293	,087	,059	,257	,075
	N	25	25	25	25	25
8-OXO	Correlación de Pearson	-,473*	-,178	,006	-,503**	,322
	Sig. (unilateral)	,013	,214	,489	,009	,072
	N	22	22	22	22	22
ISO	Correlación de Pearson	-,229	-,201	-,057	-,459*	,250
	Sig. (unilateral)	,153	,185	,401	,016	,131
	N	22	22	22	22	22
OXO-DG	Correlación de Pearson	-,340*	-,168	-,059	-,201	,125
	Sig. (unilateral)	,048	,211	,390	,167	,277
	N	25	25	25	25	25
CAT	Correlación de Pearson	,331	-,207	-,221	,001	-,069
	Sig. (unilateral)	,053	,160	,145	,499	,371
	N	25	25	25	25	25
GSH	Correlación de Pearson	1	-,087	-,370*	,415*	-,272
	Sig. (unilateral)		,340	,034	,020	,094
	N	25	25	25	25	25
GSSG	Correlación de Pearson	-,087	1	,947**	-,052	,174
	Sig. (unilateral)	,340		,000	,402	,203
	N	25	25	25	25	25
GSSG_G	Correlación de Pearson	-,370*	,947**	1	-,191	,269
	Sig. (unilateral)	,034	,000		,180	,097
	N	25	25	25	25	25
GPX	Correlación de Pearson	,415*	-,052	-,191	1	-,167
	Sig. (unilateral)	,020	,402	,180		,213
	N	25	25	25	25	25
SOD	Correlación de Pearson	-,272	,174	,269	-,167	1
	Sig. (unilateral)	,094	,203	,097	,213	
	N	25	25	25	25	25
MDA	Correlación de Pearson	,100	-,348*	-,410*	,184	-,234
	Sig. (unilateral)	,317	,044	,021	,189	,130
	N	25	25	25	25	25

		MDA
EDAD	Correlación de Pearson	-,526 **
	Sig. (unilateral)	,003
	N	25
8-OXO	Correlación de Pearson	-,322
	Sig. (unilateral)	,072
	N	22
ISO	Correlación de Pearson	-,338
	Sig. (unilateral)	,062
	N	22
OXO-DG	Correlación de Pearson	,191
	Sig. (unilateral)	,180
	N	25
CAT	Correlación de Pearson	-,177
	Sig. (unilateral)	,199
	N	25
GSH	Correlación de Pearson	,100
	Sig. (unilateral)	,317
	N	25
GSSG	Correlación de Pearson	-,348 *
	Sig. (unilateral)	,044
	N	25
GSSG_GSH	Correlación de Pearson	-,410 *
	Sig. (unilateral)	,021
	N	25
GPX	Correlación de Pearson	,184
	Sig. (unilateral)	,189
	N	25
SOD	Correlación de Pearson	-,234
	Sig. (unilateral)	,130
	N	25
MDA	Correlación de Pearson	1
	Sig. (unilateral)	
	N	25

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (1 cola).

* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (1 cola).

3. ANEXO III. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA PROCEDENTE DE ESTE ESTUDIO.
 1. Gargallo P, Colado JC, Jueas A, Hernando-Espinilla A, Estañ-Capell N, Monzó-Beltran L, et al. The Effect of Moderate- Versus High-Intensity Resistance Training on Systemic Redox State and DNA Damage in Healthy Older Women. *Biol Res Nurs.* 2018 Mar 23;20(2):205–17.
 2. Hernando-Espinilla,A; Estáñ-Capell, N; Gargallo, P; Colado, JC; Monzo-Beltrán, L; Santaolaria, M; Carbonell, A; Sáez, G. Effect of strength training on redox status and injury of genetic material in older adult. XII National Congress of the Clinical Laboratory;2018 Oct 23-26;. Bilbao, Spain.
 3. Page, P; Colado, JC; Sáez, G; Gargallo, P; Hernando, A; Estañ, N; Jueas, A; Muñoz, V; Tella, V; Rogers, ME. Effects of long-term elastic resistance training on oxidative damage of DNA in older adults. 64th Annual Congress of the American College of Sports Medicine (ACSM); 2017; Denver, Colorado, United States of America.
 4. Nicole L. Rogers, NL; Jueas, A; Fritz, N; Gargallo, P; Muñoz, V; Saez, G; Hernando, A; Colado, JC; Rogers, ME. Effects of drinking seawater during a resistance training program on kidney, performance and cardiovascular health. 63th Annual Congress of the American College of Sports Medicine (ACSM) and 7th World Congress on Exercise Medicine; 2016; Boston, Massachusetts, United States of America.
 5. Gargallo, P.; Muñoz, V.; Jueas, A.; Saez, G.; Hernando, A.; Iradi, A.; Colado, JC. Adaptations in muscle mass and motor function during resistance training with elastic bands at different intensities

in older adults. 21th annual Congress of the European College of Sport Science; 2016; Vienna, Austria.

6. Serrat, R.; Colado, JC.; Hernando, A.; Gargallo, P.; Iradi, A.; Muñoz, V.; Estañ, N.; Juesas, A.; Tormo, MC.; Monzó, L.; Ribera, S.; Sáez, G. Effects of a resistance training program on functional performance, oxidative stress and cardiovascular risk factor in health older adults. Oxygen Club of California World Congress. 'Oxidants and antioxidants in biology'; 2015; Valencia, Spain.