

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE BIOQUÍMICA**

**Evaluación del efecto antioxidante del ejercicio  
moderado y continuo en individuos con entrenamiento  
físico regular**

**TESIS**

para optar el título profesional de Químico Farmacéutico

**AUTORES**

Carlos Enrique Cabrera García

Elsa Elizabeth Robles Cairo

**ASESORA**

Elena Rafaela Benavides Rivera

**Lima – Perú**

**2010**

*“A mis queridos padres, por su inmenso amor, apoyo incondicional y por sus valiosos y sabios consejos que me ayudan a afrontar obstáculos durante mi vida y por darme confianza para cumplir mis metas, para que sientan como propios cada uno de mis logros conseguidos”.*

*ELSA ROBLES.*

*“A mi madre por su  
invaluable apoyo, aliento y  
constante dedicación en el  
transcurso de mi vida  
universitaria pensando  
siempre en un futuro mejor”*

*“A mi inigualable  
compañera Elsa, sin su  
apoyo el logro de las más  
sublimes metas sólo  
serían sueños”*

*“A aquellos farmacéuticos que  
nos antecedieron y que  
contribuyeron con su  
dedicación y profesionalismo  
al crecimiento de nuestra  
profesión”*

CARLOS CABRERA

## Agradecimientos

*A la Dra. Mg. Elena Benavides por su gran aporte a la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica como docente y por su asesoría, consejo y constante guía para el desarrollo de este trabajo.*

*A la Dra. QF. Elizabeth Carranza por su gran dedicación a la labor científica a favor de nuestra profesión y gran apoyo para el desarrollo de la fase experimental de este trabajo.*

## Agradecimientos

*A los miembros del jurado calificador:*

*Dra. María Elizabeth Gonzales Loayza*

*QF. Amelia Elizabeth Carranza Alva*

*QF. Gloria Clotilde Gordillo Rocha.*

*MG. Yadira Fernández Jerí*

*Por el tiempo dedicado a la revisión y calificación del presente trabajo y por sus invaluable aportaciones y sugerencias. Además por la excelsa misión de su labor docente.*

## SUMARIO

RESUMEN

SUMMARY

### I.- INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

### II.- GENERALIDADES

2.1 RADICALES LIBRES

2.2 DAÑOS PRODUCIDOS A MOLÉCULAS BIOLÓGICAS POR LAS  
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)

2.3 ESTRÉS OXIDATIVO

2.4 RELACIÓN ENTRE EL EJERCICIO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

2.5 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

### III.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

3.2 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA SUPEROXIDO  
DISMUTASA (SOD)

3.3 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA CATALASA  
(CAT)

3.4 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MALONDIALDEHIDO  
(MDA)

3.5 DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA

IV.- RESULTADOS

V.- DISCUSIÓN

VI.- CONCLUSIÓN

VII.- RECOMENDACIONES

VIII.- ANEXOS

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## RESUMEN

Se realizó la determinación cuantitativa de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y del marcador de estrés oxidativo malondialdehído (MDA) en eritrocitos de 57 personas de entre 20 y 30 años de edad: 19 personas con entrenamiento intenso, 19 personas sometidas a un entrenamiento moderado y continuo y 19 personas en un grupo control sin entrenamiento físico.

La actividad de SOD en el grupo de ejercicio intenso (1171 U SOD/g Hb) fue menor que en el grupo normal (1731 U SOD/g Hb) ( $p < 0,05$ ). La actividad del grupo de ejercicio moderado (1997 U SOD/g Hb) fue mayor que en el grupo normal. El valor de CAT en el grupo de ejercicio intenso (0,51 k CAT/g Hb) fue menor que en el grupo normal (0,60 k CAT/g Hb) ( $p < 0,025$ ). El valor del grupo de ejercicio moderado (0,51 k CAT/g Hb) fue menor que en el grupo normal ( $p < 0,025$ ). El valor de MDA en el grupo de ejercicio intenso (11,64  $\eta$ mol MDA/g Hb) fue menor que en el grupo normal (11,89  $\eta$ mol MDA/g Hb). El valor del grupo de ejercicio moderado (12,85  $\eta$ mol MDA/g Hb) fue mayor que en el grupo normal.

Se concluye que el grupo de ejercicio intenso presentó una menor actividad para superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), debido a un mayor estrés oxidativo por el ejercicio intenso y discontinuo. El grupo de ejercicio moderado presentó una mayor actividad para superóxido dismutasa (SOD), como respuesta adaptativa al ejercicio moderado y continuo.

**Palabras claves:** Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Malondialdehído (MDA), peroxidación lipídica, ejercicio moderado, ejercicio intenso, estrés oxidativo.



## SUMMARY

It had done the quantitative determination of the antioxidant enzymes superoxide Dismutase (SOD) and catalase (CAT) and of oxidative stress marker, Malondialdehyde (MDA) on erythrocytes of 57 people between 20 and 30 years of age: 19 people undergoing intense training, 19 people with moderate and continuous physical training and 19 people in a control group without training.

The value of SOD in the group of intense exercise (1171 U SOD / g Hb) was lower than in the normal group (1731 U SOD / g Hb) ( $p < 0.05$ ). The value of moderate exercise group (1997 U SOD / g Hb) was higher than in the normal group. The value of CAT in the group of intense exercise (CAT 0.51 k / g Hb) was lower than in normal group (0.60 k CAT / g Hb) ( $p < 0.025$ ). The value of moderate exercise group (0.51 k CAT / g Hb) was lower than in the normal group ( $p < 0.025$ ). The value of MDA in the group of intense exercise (11.64  $\eta$ mol MDA / g Hb) was lower than in the normal group (11.89  $\eta$ mol MDA / g Hb). The value of moderate exercise group (12.85  $\eta$ mol MDA / g Hb) was higher than in the normal group.

We conclude that the exercise group had less intense activity for superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) due to increased oxidative stress by intense and discontinuous exercise. The moderate exercise group showed a higher activity for superoxide dismutase (SOD), as an adaptive response to moderate and continuous exercise.

Keywords: Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malondialdehyde (MDA), Lipid Peroxidation, Moderate Exercise, Intense Exercise, Oxidative Stress.

## I.- INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son especies químicas con uno o más electrones libres en su órbita que los hace inestables y altamente reactivos; le sustraen un electrón a la molécula vecina oxidándola y transformándola en un nuevo radical libre. Las células producen continuamente radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROs), como parte de procesos metabólicos. Aunque la principal función de la mitocondria es la producción de energía genera especies reactivas de oxígeno durante la fosforilación oxidativa, la liberación su se estima entre 1 y 5% del oxígeno consumido durante la respiración, dependiendo del sustrato y del estado de respiración <sup>(1)</sup>.

Estos radicales libres son neutralizados por un elaborado sistema de defensa antioxidante. Los antioxidantes transforman los radicales libres en las especies menos reactivas, lo que limita sus efectos tóxicos. Estos sistemas pueden ser divididos en enzimáticos y no enzimáticos. El subgrupo enzimático incluye la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa <sup>(2)</sup>. Superóxido puede reaccionar con otras especies reactivas de oxígeno como el óxido nítrico para formar especies altamente tóxicas como el peroxinitrito, además de los efectos tóxicos directos <sup>(3)</sup>. El grupo no enzimático incluye una variedad de moléculas biológicas, como las vitaminas E, A y C y glutatión reducido (GSH) <sup>(4)</sup>.

Los radicales libres y los antioxidantes corporales se encuentran en equilibrio. Cuando estos radicales libres se acumulan, superan la barrera antioxidante y se llega al “estrés oxidativo”, el cual esta asociado a la aceleración del envejecimiento y diversas patologías degenerativas. Sin embargo, el término estrés oxidativo es típicamente

reservado para aquellos supuestos en que se ha dado lugar a daño tisular y se produce compuestos que pueden ser tóxicos o perjudiciales para el tejido. La demostración de que estos acontecimientos se han producido requiere utilizar un ensayo para un marcador adecuado para proporcionar evidencia de daños <sup>(5)</sup>.

La peroxidación lipídica (LPO) es un proceso autocatalítico que es una consecuencia común de la muerte celular. Los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana son peroxidados por reacciones mediadas por radicales libres. malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de dicho proceso.

El daño por radicales libres a las proteínas ha sido objeto de varias revisiones. Ahora se sabe que el daño puede proceder indirectamente, por la alteración de los aminoácidos, o directamente, mediante su desnaturalización, la alteración estructural, y la glicación. Las células también tienen procesos de reparación de proteínas dañadas, sin embargo, la influencia del ejercicio sobre el daño oxidativo y los procesos de reparación ha sido virtualmente ignorada <sup>(5)</sup>.

El ejercicio posee un rol controversial en la producción de RL. Se ha demostrado que el entrenamiento físico genera un sistema antioxidante aumentado y una reducción en la peroxidación de lípidos <sup>(6)</sup>. Además existen evidencias de una protección incrementada en contra de la lesión cardiaca producida por los radicales libres relacionada con el ejercicio <sup>(7)</sup>.

Existe evidencia de que el ejercicio físico regular y no agotador tiene efectos beneficiosos. Sin embargo los beneficios del ejercicio desaparecen con el agotamiento y la falta de entrenamiento porque durante el ejercicio físico agotador se genera tal

cantidad de radicales libres que las defensas antioxidantes se ven incapaces de prevenir el daño que éstas inducen <sup>(8)</sup>. Esto se fundamenta en que el ejercicio incrementa el consumo de oxígeno y por ende la respiración, por lo que se produce una mayor cantidad de radicales libres. Por lo tanto, teóricamente, si se hace más ejercicio se estarán formando más radicales. Por lo que el efecto del ejercicio en la producción de radicales libres es afectado por la intensidad y la continuidad del ejercicio <sup>(9)</sup>.

Por tal motivo para el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto antioxidante del ejercicio moderado y continuo en individuos con entrenamiento físico regular antioxidante.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en sujetos con entrenamiento físico moderado y sujetos no sometidos a entrenamiento físico.
- Comparar los niveles de malondialdehído (MDA) en sujetos con entrenamiento físico moderado y sujetos no sometidos a entrenamiento físico.

## II.- GENERALIDADES

### 2.1 RADICALES LIBRES

Un radical libre es una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones desapareados en el orbital más externo. Una molécula puede convertirse en radical libre tanto por ganancia como por pérdida de electrones. Al romperse un enlace covalente en forma simétrica, ambos fragmentos retienen un electrón, y por tanto, se convierten en radical libre. Este electrón desapareado le confiere al radical libre inestabilidad, tanto energética como cinética, lo que los hace compuestos altamente reactivos. Constituyen ejemplos de radicales libres: el átomo de hidrogeno (H), la molécula de triclorometilo ( $\text{CCl}_3$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el radical hidroxilo (OH), óxidos de nitrógeno como el óxido nítrico (NO), radicales peróxido ( $\text{RO}_2$ ), alcóxilo, entre otros.

#### 2.1.1 Producción de Radicales Libres:

Los radicales libres se producen en la respiración con la presencia de oxígeno que aunque es imprescindible en la vida celular de nuestro organismo, también produce estas moléculas reactivas que provocan a lo largo de la vida, efectos negativos para la salud debido a su capacidad de alterar el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos o grasas ("oxidación").

Los radicales libres pueden ser producidos por procesos fisiológicos normales o por la influencia de especies exógenas. Entre las fuentes endógenas de radicales libres tenemos:

- La **mitocondria** constituye la fuente principal de radicales libres. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar ATP. Una consecuencia directa de este proceso de fosforilación oxidativa es que, entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar uno o dos electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres.<sup>(29)</sup>
- Otras fuentes son los **peroxisomas**, organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno.
- Los **leucocitos** polimorfonucleares constituyen una fuente importante cuando se activan por diversas proteínas que actúan sobre ellos (complemento, interleukinas, etc). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de radicales libres. Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios.<sup>(29)</sup>
- La enzima **xantina deshidrogenasa** predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas formando ácido úrico. Cuando pasa a la forma **xantina oxidasa** (isquemia, estimulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.) genera el anión superóxido.<sup>(29)</sup>

También existen fuentes exógenas de radicales libres como xenobióticos, humo del cigarro, drogas como la adriamicina, radiaciones ultravioleta, ciertos componentes de la dieta (sales de hierro y cobre y compuestos fenólicos), traumatismos, procesos inflamatorios, ejercicios extenuantes, estados de hiperoxia, entre otros.<sup>(29)</sup>

## 2.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En mamíferos son muchos los procesos fisiológicos gatillados por estas especies, como por ejemplo los mecanismos patógenos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores.

Este término se refiere no sólo a los radicales con centro oxígeno, sino también incluye no radicales reactivos derivados del oxígeno (por ejemplo, el peróxido de hidrógeno).

### *Principales Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)*

*(Tomado de Giménez A<sup>(27)</sup>)*

<b>Radicales Libres</b>	<b>No Radicales</b>
<b>ROO<sup>•</sup></b> Radical Peróxido	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de hidrógeno
<b>OH<sup>•</sup></b> Radical Hidroxilo	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> Oxígeno Singlete
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> Anión Superóxido	

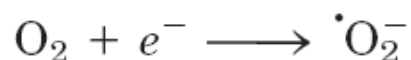
### 2.1.2.1 Oxígeno Singlete.-

El oxígeno singlete es una forma de oxígeno excitado por vía electrónica y no es un radical, pues los electrones no están desapareados. Tiene una media muy corta vida, pero es capaz de difundir y es permeable a las membranas. No tiene restricción de giro,

y por lo tanto, la capacidad de oxidación es mucho mayor (9). La dismutación del anión superóxido en agua puede conducir a la formación de oxígeno singlete en los sistemas biológicos<sup>(9)</sup>.

#### 2.1.2.2 Anion Superóxido.-

El anión superóxido se forma principalmente como producto intermedio en las reacciones bioquímicas. Este anión está cargado negativamente, y es relativamente impermeable en la membrana.



Sin embargo, en comparación con otros radicales libres, superóxido tiene una vida media relativamente larga que permite la difusión dentro de la célula y, por tanto, aumentar el número de los posibles objetivos. En las células inflamatorias se produce cantidades relativamente grandes de superóxido como parte del proceso por el que se resisten a los organismos invasores<sup>(10)</sup>. Aunque superóxido generalmente se considera relativamente no reactivo en comparación con otras especies de radicales, puede reaccionar rápidamente con algunos radicales como el NO<sup>(10)</sup>.

El interés de las investigaciones ha rodeado la posibilidad de que la protonación de superóxido que produce al radical hidroperoxilo (HO<sub>2</sub>·) pueda ocurrir a un pH fisiológico, facilitando la transferencia de superóxido a través de membranas. Sin embargo, la probabilidad y las circunstancias necesarias para la protonación de superóxido en la célula siguen siendo un tema de debate<sup>(10)</sup>.



El anión superóxido puede reducir algunos de los materiales biológicos (por ejemplo, el citocromo c) y oxidar otros como ascorbato. La dismutación de superóxido, tanto espontánea como catalizada por la superóxido dismutasa, proporciona una importante fuente de peróxido de hidrógeno en las células.

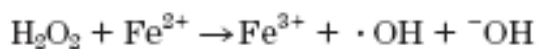


### 2.1.2.3 Peróxido de Hidrógeno.-

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es un compuesto reactivo que puede fácilmente generar radicales libres como el radical hidroxilo en circunstancias específicas. Es estable, permeable a las membranas, y tiene una vida media relativamente larga dentro de la célula. Es citotóxico, pero se considera un agente oxidante relativamente débil.

Además de su formación en la dismutación de  $\text{O}_2^-$ , una serie de sistemas enzimáticos también generan  $\text{H}_2\text{O}_2$  incluyendo oxidasas de ácido úrico y aminoácidos.

El peróxido de hidrógeno no es capaz de oxidar el ADN o lípidos directamente, pero puede inactivar algunas enzimas <sup>(10)</sup>. La citotoxicidad de peróxido de hidrógeno se debe principalmente a la capacidad de generar el radical hidroxilo a través de reacciones catalizadas por metales, tales como la reacción de Fenton:



En biología, parece probable que esta reacción sea de particular importancia como parte de la reacción de Haber-Weiss, donde el hierro (o el cobre) se mantiene en una forma reducida por superóxido y por lo tanto, es capaz de catalizar la formación de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno. La reacción neta es



En la práctica, las reacciones que se producen son:



o



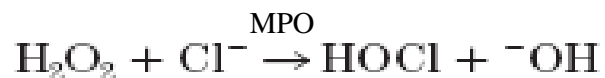
#### 2.1.2.4 Radical Hidroxilo.-

Los radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) son altamente reactivos con un fuerte potencial oxidante. Causan daño a las moléculas cercanas al lugar de su generación, y debido a su

alta reactividad no son permeables a la membrana.<sup>(10)</sup> Son potencialmente los EROs más perjudiciales presentes en los materiales biológicos, y su capacidad de reacción es tal que prácticamente es imposible confirmar que existen en los organismos vivos si no es a través de la demostración de la presencia de productos específicos de sus reacciones.

#### 2.1.2.5 Hiperclorito.-

Hiperclorito es formado por la acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO) utilizando peróxido de hidrógeno. Es predominantemente formado por los neutrófilos y puede dañar las biomoléculas mediante la oxidación de tioles, lípidos, ascorbato, y NADPH con la generación de diversos productos secundarios. Por otra parte, en la forma de ácido (es decir, el ácido hipocloroso), este oxidante puede atravesar las membranas celulares y puede causar fragmentación y agregación de las proteínas por reacciones múltiples<sup>(10)</sup>.



#### 2.1.3 Especies Reactivas de Nitrógeno (ERNs)

El término especies reactivas de nitrógeno (ERNs) se refiere tanto a los radicales de nitrógeno como a otras moléculas reactivas que tienen como centro reactivo al nitrógeno.

Las principales ERNs son el óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que es considerado como uno de los más potentes oxidantes biológicos. Las ERNs pueden dañar las células por distintos mecanismos: inactivación de los distintos complejos de la cadena respiratoria, daño a proteínas y a lípidos e inhibición de síntesis proteica o de ADN<sup>(11)</sup>.

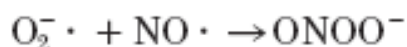
#### 2.1.3.1 Óxido Nítrico.-

El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por muchos tipos de células a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual existen tres tipos principales: la NOS neuronal (NOS1), que originalmente fue encontrada en el tejido nervioso, pero también está presente en la mayoría de tipos celulares; NOS endotelial (NOS3), originalmente descrita en las células endoteliales, y la NOS inducible (NOS2) que se encuentra predominantemente en los procesos inflamatorios.

El NO se une fácilmente a algunos metales de transición, y sus principales acciones en las células se refieren a su capacidad para unirse a los iones ferrosos. Esta unión de NO al hierro no sólo compromete un importante mecanismo de acción, sino también parece desempeñar un papel importante en su inactivación y eliminación a través de unión al hierro en la hemoglobina. El óxido nítrico es un agente reductor débil, reacciona con el oxígeno para formar dióxido de nitrógeno, y reacciona muy rápidamente con el superóxido para producir peroxinitrito<sup>(10)</sup>.

### 2.1.3.2 Peroxinitrito.-

La reacción de superóxido con el óxido nítrico para producir peroxinitrito se produce aproximadamente tres veces más rápido que la dismutación de superóxido para producir peróxido de hidrógeno e incluso más rápido que la reacción de óxido nítrico con las proteínas del grupo hemo, por lo que ésta es la reacción primaria cuando ambos están presentes <sup>(10)</sup>:



Peroxinitrito (o su forma protonada, ONOOH) es un fuerte agente oxidante y puede conducir al agotamiento de los grupos tiol, el daño al ADN, y la nitración de proteínas. Otro efecto de la formación de peroxinitrito es una disminución de la biodisponibilidad de superóxido y óxido nítrico <sup>(10)</sup>.

## **2.2 DAÑOS PRODUCIDOS A MOLÉCULAS BIOLÓGICAS POR LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son responsables de citotoxicidad y ataques oxidativos a las biomoléculas y a las células. La secuencia temporal del daño oxidativo es la siguiente:

- En fracción de segundos las especies reactivas de oxígeno (EROs) atacan a lípidos de membrana, activando el ciclo del glutatión (GSH). Se genera glutatión oxidado (GSSG) que puede formar disulfuros mixtos con proteínas.

Las EROs pueden atacar directamente a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos.

- Segundos después, cambia el potencial de membrana, el reciclado mitocondrial, se eleva el NADPH, disminuye el ATP, se produce xantina (por xantina oxidasa). Disminuye actividad glucolítica. Se estimula la actividad de la poli(ADP-ribosil-) polimerasa para reparar el ADN: disminuyendo los niveles de NAD<sup>+</sup> <sup>(12)</sup>.
- En una hora disminuye la capacidad de reparación del ADN, disminuye el transporte de Ca<sup>+</sup> al exterior celular. El aumento intracelular de calcio estimula proteasas y afecta al citoesqueleto. También se afecta el equilibrio K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> <sup>(12)</sup>.

La consecuencia es la pérdida de integridad celular (por disfunción metabólica), “burbujeo” (por daños en citoesqueleto), daños mutagénicos (por daños en ADN), y apoptosis o necrosis (por elevación del calcio intracelular) <sup>(12)</sup>.

### **2.2.1 Especies Reactivas de Oxígeno y Oxidación de Proteínas.-**

En la actualidad comienzan a emerger evidencias de que las relaciones entre los radicales libres, las proteínas y los mecanismos de proteólisis son mucho más complejas de lo que inicialmente se pensó. Diversas proteínas son consideradas no sólo como blanco de la acción de los radicales libres sino que pueden comportarse como generadoras y propagadoras de estas sustancias como en el caso de la mioglobina y la

peroxidasa que generan radicales libres en presencia de  $H_2O_2$ . De igual forma, los efectos del estrés oxidativo no sólo modifican las propiedades de las proteínas consideradas como sustratos de los mecanismos de proteólisis, sino que pueden afectar los mecanismos proteolíticos propiamente dichos, incluidas las vías lisosomal, proteosomal y de las calpaínas en el catabolismo proteico intracelular <sup>(13)</sup>.

El daño oxidativo a las proteínas tiene una química muy compleja. Entre las especies más deletéreas se incluyen radicales de propagación como el alcoxilo. A partir de las proteínas agredidas se generan algunos productos como los hidroperóxidos proteicos que son relativamente estables y pueden generar nuevos radicales al reaccionar con metales de transición. Los residuos azufrados y los residuos de lisina e histidina suelen ser muy susceptibles al daño oxidativo. En los aminoácidos azufrados se generan disulfuros que pueden ocasionar el establecimiento de puentes covalentes cruzados entre proteínas o subunidades con formación de agregados. En los segundos se produce su oxidación a grupos aldehídos lo cual también puede ocurrir con residuos de aspártico, prolina y arginina, esto da lugar a un incremento de grupos carbonilo en las proteínas agredidas. En los casos extremos llega a producirse incluso la fragmentación de las cadenas polipeptídicas <sup>(13)</sup>.

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo, aunque algunas son más vulnerables que otras como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina, el triptofano, la histidina, la metionina y la cisteína. En consecuencia, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones en la estructura terciaria, que puede acompañarse de una fragmentación

química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica <sup>(13)</sup>.

Las proteínas alteradas, posiblemente por un incremento de su hidrofobicidad, son más rápidamente ubiquitinizadas y degradadas por la vía proteosomal. En estos mecanismos degradativos pueden también participar el sistema lisosomal y las proteinasas dependientes de calcio (calpaínas). En ciertas condiciones pueden producirse dificultades para el catabolismo de las proteínas modificadas con acumulación de productos de difícil degradación <sup>(13)</sup>.

Estas alteraciones pudieran formar parte de los mecanismos de daño que se observan en el envejecimiento, la isquemia -reperfusión, la producción de cataratas y otras situaciones <sup>(13)</sup>.

### **2.2.2 Especies Reactivas de Oxígeno y Oxidación de Carbohidratos.-**

La oxidación de carbohidratos puede dar lugar a la formación de moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas. Los monosacáridos, una vez oxidados por los radicales libres producidos por metales de transición, pueden combinarse con los grupos carbonilo de las proteínas <sup>(13)</sup>.



### **2.2.3 Especies Reactivas de Oxígeno y Oxidación de Ácidos Nucleicos y Nucleótidos.-**

A semejanza de las proteínas, parece existir una muy baja posibilidad del establecimiento de reacciones en cadena; sin embargo, el daño puede ser más significativo, aunque sea muy limitado en extensión y localización. La interacción de radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo el sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación. Esto conduce a la producción de genes mutados y, por ende, de proteínas disfuncionales. Las modificaciones de las bases se deben, en gran parte, a los metales de transición, fundamentalmente al ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que se encuentra unido al ADN y que, en presencia del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), genera el hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) que modifica las bases del mismo. El hidroxilo puede atacar tanto purinas como pirimidinas, además de generar rupturas en las cadenas de ADN <sup>(13)</sup>.

### **2.2.4 Peroxidación Lipídica.-**

La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. A través de este proceso los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. El proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre. Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) e hidroxialqueno (4-HNE), como productos finales de la reacción. Gracias a su determinación se puede cuantificar la peroxidación lipídica y, por lo tanto, al estrés oxidativo en los organismos.

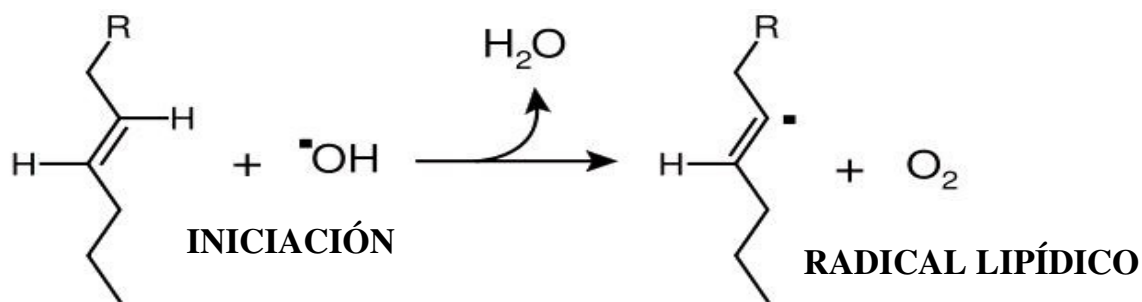
Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas y son responsables, en buena medida, de la fluidez de ésta. La función de estos lípidos localizados en las membranas biológicas es mantener la integridad de la célula. Entre los lugares en los que se pueden encontrar los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) destacan la membrana plasmática, la membrana celular del retículo endoplasmático y la membrana de la mitocondria.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y la ruptura de éstas, provoca un desmoronamiento de la estructura de membrana que conduce a una pérdida de permeabilidad y, posteriormente, a la muerte celular.

Al igual que cualquier reacción con radicales, esta consiste en tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación. Son reacciones dañinas, porque provocan la formación de distintas especies afines, las cuales a su vez tienen la capacidad de degradar membranas.

### 2.2.4.1. Iniciación:

La iniciación es el paso en donde el radical de ácido graso es producido. Los iniciadores en células vivas más notables son las especies reactivas del oxígeno, tales como  $\text{OH}\cdot$ , el cual combina con un hidrógeno para dar lugar a agua y a un radical lipídico.



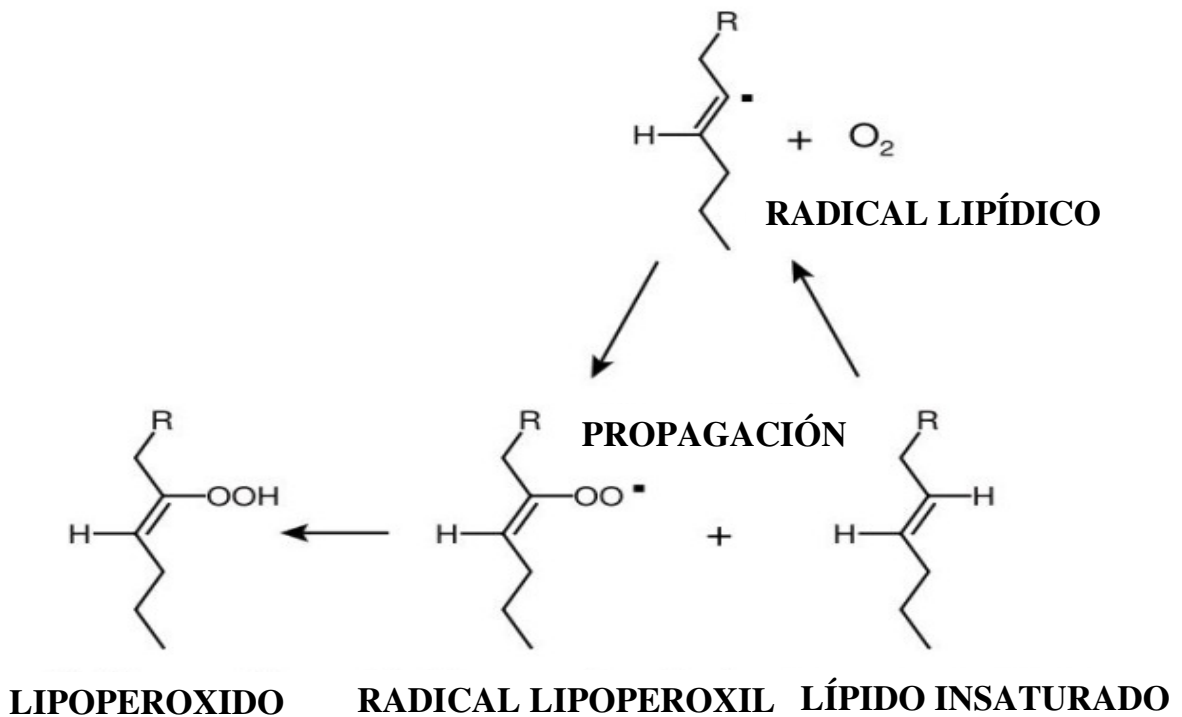
### **LÍPIDO INSATURADO**

El radical se une con el ácido graso, en este caso sería la cola de un fosfolípido en el cual se encuentra un lípido insaturado, en donde un radical  $\text{OH}$  se une a este para formar agua y un radical del lípido, es decir, cambia la estructura de la capa alterando la permeabilidad.

### 2.2.4.2 Propagación:

El radical lipídico no es una molécula estable, de modo que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando de este modo un radical ácido graso peroxil. Es una especie muy inestable, por lo cual reacciona con otro ácido graso dando

lugar a un ácido graso radical diferente y a un lipoperóxido o un peróxido cíclico si ha reaccionado consigo mismo. Este ciclo continúa ya que el nuevo radical lipídico se comporta de la misma manera.



En este paso el radical lipídico es muy inestable se une con oxígeno molecular creando un radical ácido peroxy-graso, especie inestable que reacciona con el ácido graso de otro fosfolípido (lípidos insaturados). Como consecuencia, genera un nuevo radical lipídico, provocando una secuencia en cadena, lo que se conoce como estrés oxidativo, en el que se da la producción fuera de control de radicales libres.

### **2.2.4.3 Terminación:**

Cuando un radical reacciona, siempre produce otro radical, es por ello que se trata de un mecanismo de reacción en cadena. La reacción radical se detendrá cuando dos radicales reaccionan y producen una especie no radical. Esto ocurre solamente cuando la concentración de especies radicales es lo suficientemente alta como para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales. Los organismos han evolucionado diferentes moléculas que aceleran el proceso de terminación atrapando radicales libres, protegiendo de esta manera la membrana celular. Uno de estos importantes antioxidantes es la vitamina E, otros antioxidantes de importancia incluyen las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa.

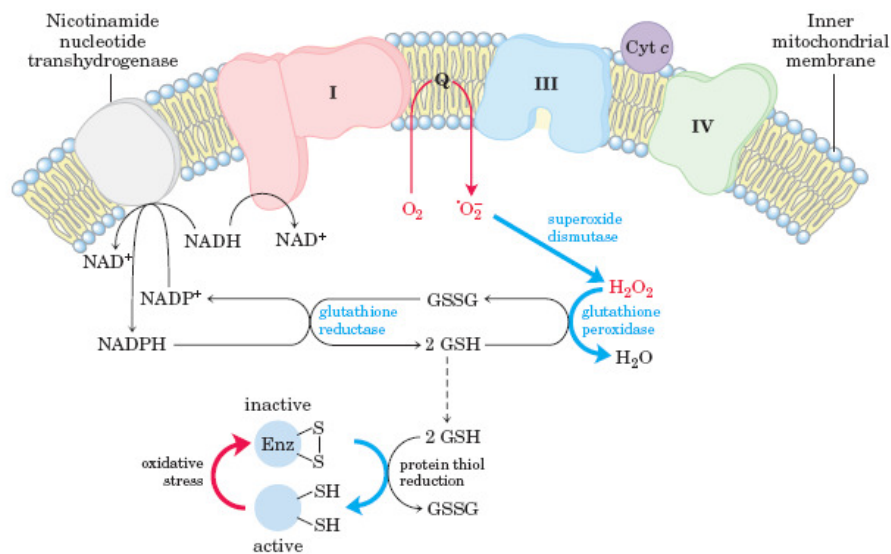
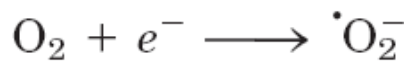
## **2.3 ESTRÉS OXIDATIVO.-**

Cuando los radicales libres se acumulan y superan la barrera antioxidante, se llega al “estrés oxidativo”, el cual está asociado a la aceleración del envejecimiento y diversas patologías degenerativas. Sin embargo, el término estrés oxidativo es típicamente reservado para aquellos supuestos en que se ha dado lugar a daño tisular y se producen compuestos que pueden ser tóxicos o perjudiciales para el tejido.

El término estrés oxidativo se definió por primera vez en 1985 como "una alteración en el equilibrio pro-oxidante-antioxidante en favor del primero" <sup>(10)</sup>. Aunque esta definición ha sido ampliamente utilizada por más de dos décadas, la definición de estrés oxidativo probablemente sufra una modificación en el futuro. De hecho, debido a

la complejidad asociada con la evaluación del balance redox celular, se ha argumentado que el término estrés oxidativo desafía una definición simple basada en oxidantes y antioxidantes. En un esfuerzo por perfeccionar el sentido del estrés oxidativo, Dean Jones, ha propuesto que este término debe ser redefinido como "una interrupción de señalización y control redox" <sup>(10)</sup>.

En la mitocondria se estima que del 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa. Varios pasos en el camino de la reducción del oxígeno en las mitocondrias tienen el potencial de producir radicales libres altamente reactivos que pueden dañar las células. El paso de los electrones del QH<sub>2</sub> a Citocromo bL a través del complejo III, y el paso de los electrones del Complejo I a QH<sub>2</sub>, implican al radical  $\cdot Q$  como intermediario. El  $\cdot Q$  puede, con baja probabilidad pasar un electrón al O<sub>2</sub> en la siguiente reacción:



*Radical superóxido,  $\cdot O_2^-$ , se forma en las reacciones de los complejos I y III, con el parcialmente reducido radical ubiquinona ( $\cdot Q$ ) como donador de un electrón al O<sub>2</sub>.*

*Las reacciones que se muestran en azul defienden a la célula contra los efectos perjudiciales de superóxido. (Tomado de Lehninger, Principles of Biochemistry)*

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas, cáncer, etc.

Un ambiente persistente oxidante en las células puede modificar las moléculas redox-sensibles. Un enfoque común para evaluar el estrés oxidativo en los sistemas biológicos consiste en la medición del aumento o disminución de una molécula redox-sensible que responde al estrés oxidativo. En general, un marcador de estrés oxidativo fiable debe poseer las siguientes cualidades:

- 1) Químicamente único y detectable,
- 2) Aumentar o disminuir durante los períodos de estrés oxidativo,
- 3) Poseer relativamente larga vida media.
- 4) No ser afectados por otros procesos celulares (por ejemplo, el ciclo celular, el metabolismo de energía, etc).

### **2.3.1 Enfermedades Relacionadas al Estrés Oxidativo y los Radicales Libres.-**

Cuando la actividad de los radicales libres se ve incrementada, es decir, en el estrés oxidativo, pueden originar la aparición de numerosa y graves enfermedades.

Este es el caso de algunos tipos de cánceres, provocados por tóxicos carcinogénicos (como los ésteres de forbol, hidracinas, quinonas, etc.) o las reacciones ionizantes, que pueden tener su origen en la actividad de los radicales libres que originan, provocando alteraciones en el ADN, como transformaciones de las bases, rotura de cromosomas y aumento en el número de copias de genes, también modificando (oxidando) diversas prostaglandinas (íntimamente relacionadas con la multiplicación celular), o alterando las membranas celulares (peroxidación de lípidos) y, por lo tanto, la comunicación entre células.

La arteriosclerosis es la primera causa de muerte en los humanos. Consiste en el endurecimiento y obstrucción de vasos sanguíneos debido al depósito de grasas (LDL, lipoproteínas de baja densidad) en la pared de los mismos, y acumulación de células defensivas. Los radicales libres actúan de diferentes maneras: lípidos de la sangre como el colesterol, en forma oxidada (lo que es muy frecuente en dietas ricas en grasas), pueden iniciar el ataque a células endoteliales de las arterias; el daño se incrementa debido a los radicales liberados por las células defensivas acumuladas, y porque las LDL de la sangre son rápidamente oxidadas por las células de la lesión (ateroma), y absorbidas rápidamente por macrófagos (células defensivas de los tejidos), que se convierten en células “espumosas”; algunos de éstos peróxidos de LDL también consiguen atraer más leucocitos de la sangre (monocitos), incrementando el tamaño de la lesión.

El cerebro posee un alto contenido en grasas y un elevado metabolismo, ya que utiliza el 20% del oxígeno consumido; así, peroxidación de lípidos y alteraciones en la fosforilación oxidativa están, probablemente, entre las causas de la demencia senil y



enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica, mediante un proceso denominado de excitotoxicidad. Este consiste en la muerte de las neuronas provocada por la activación de membranas mediante aminoácidos excitadores (glutamato), cuando el potencial eléctrico esta fuera de control debido a la falta de energía necesaria (ATP), suministrada por las mitocondrias, ya que los radicales libres son unos de los responsables del descenso de actividad de éstas y del daño en el ADN.

La enfermedad del Parkinson es muy común, y asociada con alteraciones en los movimientos y falta de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro. Las personas enfermas contienen, además, numerosas alteraciones en el ADN mitocondrial de las neuronas. La enfermedad de Alzheimer es también muy común y está asociada con demencia progresiva y atrofia de la corteza cerebral, también de causa heterogénea, pero relacionad con alteraciones en el complejo enzimático IV de las mitocondrias cerebrales. Se ha propuesto, además, como causa de esta enfermedad, la inactivación progresiva de un enzima (mediante oxidación catalizada por metales), glutamina sintetasa, en los lóbulos frontales del cerebro, enzima encargada del control del amoniaco intracelular y del pH. La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad debida a la degeneración de las neuronas motoras de la corteza y médula espinal, lo que conduce a una parálisis progresiva y, tarde o temprano, la muerte. Esta enfermedad está relacionada con un defecto en el gen SOD1, que codifica a la enzima antioxidante superóxido dismutasa, por lo que el consecuente aumento en la concentración de radical superóxido provocaría la muerte neuronal.

En las enfermedades inflamatorias se ha observado también la importancia de los radicales libres. Cuando las células defensivas como los neutrófilos se concentran y activan en focos infecciosos, artríticos, etc., contribuyen también al fenómeno inflamatorio mediante la eliminación masiva de radicales y daño tisular, como es el caso de la glomerulonefritis y de la artritis reumatoide, en donde los enfermos poseen niveles de proteínas oxidadas en los glomérulos renales y el líquido sinovial. Los radicales tomados con los alimentos, los producidos por bacterias y células desprendidas de las mucosas, y los oxidantes de la saliva y humo de tabaco, pueden alcanzar elevadas concentraciones en la luz del tubo digestivo, llegando a dañar la mucosa gastrointestinal provocando procesos inflamatorios, úlceras e incluso cáncer de colon, a pesar que el moco del tracto gastrointestinal y traqueobronquial posee propiedades antioxidantes. Las cataratas seniles son otro fenómeno asociado con el daño oxidativo, e inducido por la luz. El cristalino contiene altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, y se le considera responsable del alto contenido de proteínas modificadas en las cataratas, en experimentos con cristalinos "in vitro" se han producido las mismas lesiones físicas que en el hombre, mediante oxidaciones catalizadas por metales.

Los radicales libres son, probablemente, los últimos responsables en la producción y/o complicación de numerosos procesos patológicos, aunque son todavía muchos los interrogantes a resolver acerca de sus mecanismos de acción, y más aún sobre los modos de prevención y terapia.

## 2.4 RELACIÓN ENTRE EL EJERCICIO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.-

Históricamente, el interés en la fisiología del ejercicio se ha centrado principalmente en el problema del consumo de oxígeno. Sin embargo, en las últimas décadas, el interés de la comunidad científica en general, se ha centrado en los radicales de oxígeno. La paradoja del oxígeno ha motivado en los investigadores a la interrogante de si el ejercicio "excesivo" puede provocar un estrés oxidativo y suponer algunos riesgos para los sistemas biológicos. Una cantidad considerable de investigaciones han demostrado que los radicales son capaces de dañar una amplia gama de objetivos biológicos<sup>(5)</sup>.

El ejercicio se caracteriza por una alta tasa de formación de ADP porque incrementa el consumo de ATP con la carga de trabajo. Altos niveles de ADP activan la fosforilación oxidativa. Sin embargo un ADP abundante, que conlleva a una alta actividad metabólica y un consumo de oxígeno rápido, no refleja necesariamente una producción alta de oxidantes<sup>(1)</sup>.

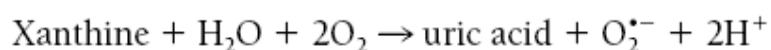
Existe una serie de posibles vías existen para la producción de oxidantes relacionados al ejercicio<sup>(2)(15)(16)</sup>.

- El consumo de oxígeno puede aumentar varias veces con el ejercicio<sup>(5)(16)(17)(18)</sup>.

Un aumento del metabolismo aeróbico durante el ejercicio es una fuente potencial de estrés oxidativo. En el músculo, las mitocondrias son una fuente importante de intermediarios reactivos que incluyen el superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y, posiblemente, el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ). El

reciente descubrimiento que las mitocondrias pueden generar óxido nítrico (NO·) también tiene implicancias para la producción de oxidantes y la función mitocondrial <sup>(1)</sup>.

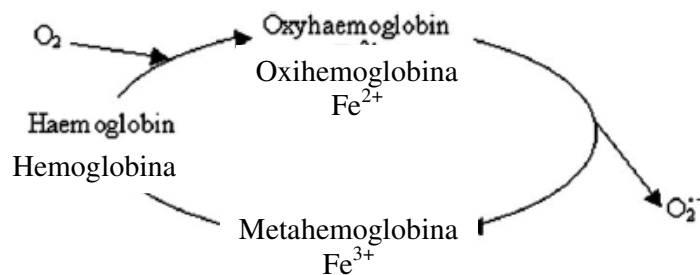
- La xantina deshidrogenasa oxida la hipoxantina a xantina y xantina a ácido úrico mediante NAD como aceptor de electrones que forman NADH. Durante el ejercicio intenso, las fibras en los músculos activos pueden llegar a un estado de hipoxia. Durante la isquemia, a través del metabolismo anaeróbico de ATP se forma xantina y xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa. Durante la reperusión, con el consiguiente aumento en la carga de oxígeno, la xantina oxidasa convierte la hipoxantina en ácido úrico, pero utiliza el oxígeno como aceptor de electrones formando entonces el radical superóxido <sup>(16)</sup>.



La conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa aparentemente implica la oxidación sulfhidrilo y se acelera en presencia de calcio. Sustratos para la xantina oxidasa están disponibles, especialmente durante el ejercicio exhaustivo, cuando hay excesiva degradación de las purinas <sup>(1)</sup>.

- El daño tisular resultante del ejercicio puede inducir la activación de células inflamatorias como los neutrófilos, con la consiguiente producción de radicales libres por la NADPH oxidasa <sup>(16)</sup>.
- Las concentraciones de catecolaminas se incrementan durante el ejercicio, y EROs pueden ser resultado de su auto-oxidación <sup>(16)</sup>.

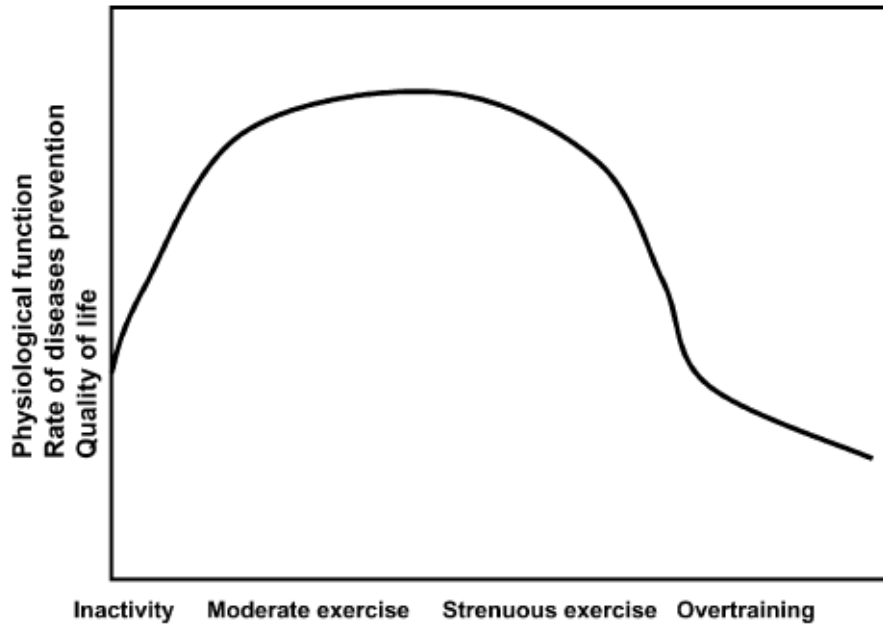
- Las mitocondrias del músculo sufren una mayor generación de superóxido con aumento de la temperatura. Por lo tanto la hipertermia inducida por el ejercicio puede causar estrés oxidativo <sup>(16)</sup>.
- La auto-oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina resulta en la producción de superóxido y la tasa de formación de metahemoglobina puede aumentar con el ejercicio <sup>(16)</sup>.



*Generación de aniones superoxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) durante la oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina (Tomado de Deaton Christopher <sup>(16)</sup>)*

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos juegan un papel vital en la protección de los tejidos al daño oxidativo excesivo durante el ejercicio. El agotamiento de cada uno de los sistemas antioxidantes aumenta la vulnerabilidad de los diversos tejidos y componentes celulares a las especies reactivas de oxígeno <sup>(19)</sup>. Sin embargo, cuando el ejercicio se combina con una suplementación con antioxidantes prudente, puede tener efectos beneficiosos sobre la salud <sup>(15)</sup>.

### 2.4.1 La Teoría de la Hormesis.-



*Tomado de Radak Z, Chung H, Koltai E. (20)*

Existe un considerable debate en la literatura sobre cómo el ejercicio afecta el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), la protección antioxidante y la reparación <sup>(18)</sup>. La tesis de la teoría de hormesis postula que los sistemas biológicos responden a la exposición a productos químicos, toxinas, y de la radiación con una curva de campana.

En toxicología, hormesis es un fenómeno de dosis-respuesta se caracteriza por una dosis baja de estimulación, dosis alta de la inhibición. Recientemente, se ha ampliado esta teoría a los radicales libres. Por lo tanto, se propone que el ejercicio modula los radicales libres y los efectos pueden ser descritos por el curva hormesis <sup>(20)</sup>.

#### **2.4.1.1 La Inactividad Física y El Estrés Oxidativo.-**

La inactividad física está asociada con un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno <sup>(21)</sup>. Es uno de los puntos extremos de la curva del ejercicio relacionado con la hormesis. La inactividad física se asocia con aumento en la incidencia de una variedad de enfermedades y condiciones patológicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, atrofia muscular, enfermedades de Alzheimer y de Parkinson y la obesidad. La inactividad física o los episodios de ejercicio extenuante, además, aumentan el riesgo de infección, mientras que el ejercicio moderado regula el incremento del sistema inmunológico <sup>(20)</sup>.

#### **2.4.1.2 El Ejercicio Moderado y El Estrés Oxidativo.-**

Durante el ejercicio moderado aumenta el consumo de oxígeno entre ocho y diez veces. A pesar que el ejercicio moderado puede aumentar la producción de radicales libres, parece inducir una protección antioxidante y disminución del estrés oxidativo. Así, el ejercicio físico regular protege contra el estrés oxidativo inducido por el ejercicio <sup>(3)</sup>. Por otra parte, el ejercicio regular de intensidad y duración moderada, tiene un amplio rango de efectos benéficos sobre el organismo <sup>(20)</sup>.

Durante el entrenamiento, se produce aumento en la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, aunque estas respuestas aparecen en tejidos muy específicos. Los episodios repetidos de ejercicio también puede aumentar la resistencia al estrés oxidativo <sup>(18)</sup>. El cuerpo parece ser capaz de soportar un aumento limitado de

los radicales libres, y de hecho, los datos sugieren que un aumento en las especies reactivas de oxígeno (EROs) son necesarias para que la adaptación del músculo se produzca<sup>(2)</sup>.

#### 2.4.1.3 Adaptación al Ejercicio.-

Prácticas consecutivas de ejercicio moderado, en un período determinado, inducen adaptaciones para prevenir el daño oxidativo masivo. Los beneficios del ejercicio nacen de la regulación con un alza de las enzimas antioxidantes y la reducción de la producción de radicales libres<sup>(1)(15)</sup>.

- **Reducción de la producción de radicales libres**, una adaptación importante que acompaña el entrenamiento regular es una disminución en el nivel basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por mitocondrias aisladas. (37) reportaron la primera evidencia de este fenómeno que demuestra que el entrenamiento disminuye la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de aproximadamente en 40%. Este cambio también podría tener consecuencias directas para el daño del ADN mitocondrial, porque O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se cree que son los intermediarios reactivos principales que generan daño al genoma mitocondrial. Actualmente no está claro qué mecanismo(s) mejora el acoplamiento de electrones y de las proteínas a la membrana interna mitocondrial para reducir la fuga de los intermediarios reactivos<sup>(1)</sup>.
- **El aumento de las defensas antioxidantes**, el entrenamiento protege del estrés oxidativo inducido por el ejercicio, al elevar los niveles de antioxidantes y enzimas antioxidantes. Existen numerosas pruebas que sugieren que el ejercicio regular aumenta la actividad de enzimas antioxidantes. Las especies reactivas de



oxígeno (EROs) participan en la regulación positiva de la expresión génica antioxidante de la adaptación por el ejercicio. Los factores de transcripción redox sensibles y las vías de señalización son inducidos por el ejercicio, y estas vías son obligatorias para que ocurran las respuestas de adaptación <sup>(20)</sup>.

En resumen, el ejercicio intenso aumenta los niveles de oxidantes y el estrés oxidativo en sujetos no entrenados, pero el ejercicio a largo plazo puede contrarrestar este efecto mediante el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes y reduciendo la producción de oxidantes. Estas defensas pueden ser fundamentales para prevenir el daño oxidativo crónico en el músculo durante el ejercicio, e incluso en reposo <sup>(1)</sup>.

#### 2.4.1.4 El Ejercicio Extenuante y el Estrés Oxidativo.-

El ejercicio agudo en sujetos no entrenados puede aumentar el estrés oxidativo. El ejercicio excesivo o sobreentrenamiento, el otro punto terminal de la curva de hormesis, aumenta el riesgo de la enfermedad y pone en peligro la salud <sup>(20)</sup>. Se asocia con el estrés oxidativo y el daño tisular. El ejercicio puede aumentar la generación de EROs y esto es especialmente cierto para los periodos cortos de ejercicio teniendo como consecuencia el daño oxidativo de los lípidos, las proteínas y el ADN <sup>(20)</sup>. Puesto que el ejercicio agudo extenuante y el entrenamiento crónico aumentan el consumo de antioxidantes, es concebible que los suplementos dietéticos de antioxidantes específicos sería beneficioso <sup>(19)</sup>.

De hecho, también es bien sabido que durante el sobreentrenamiento el proceso de adaptación no ocurre, y esto se debe principalmente a una recuperación incompleta de las sesiones de ejercicio <sup>(20)</sup>. Y por lo tanto puede disminuir el rendimiento atlético <sup>(14)</sup>.

El ejercicio vigoroso se ha demostrado que eleva la excreción de 8-hidroxi-desoxiguanosina urinaria (8-OHDG), lo que puede interpretarse como un incremento en el daño oxidativo del ADN o en la reparación del ADN <sup>(18)</sup>.

## **2.5 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.-**

Para proteger contra el estrés oxidativo, un sistema bien organizado de antioxidantes trabaja en forma coordinada para resistir a las perturbaciones redox en la célula. El término antioxidante se aplica a cualquier sustancia que retrasa o impide la oxidación de un sustrato <sup>(10)</sup>.

Durante el ejercicio las fibras musculares esqueléticas pueden producir especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de una variedad de diferentes vías. Esto guarda relación con la etiología de la fatiga inducida por el ejercicio del músculo esquelético <sup>(10)</sup>. Por lo tanto, dada la importancia de mantener la homeostasis redox en las fibras musculares, no es sorprendente que los miocitos contengan una red de mecanismos de defensa antioxidante para reducir el riesgo de daño oxidativo en los períodos de mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROs).

Dentro de la fibra, estos antioxidantes se encuentran estratégicamente en compartimientos por todo el citoplasma y en varios orgánulos (por ejemplo, las mitocondrias). Por otra parte, los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos existen en el espacio extracelular y en el vascular. En conjunto, estos antioxidantes protegen las fibras musculares de la lesión oxidativa durante los períodos de aumento de la producción de antioxidantes (por ejemplo, el ejercicio intenso o prolongado)<sup>(10)</sup>.

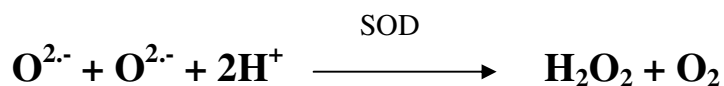
Entre las estrategias para proteger contra la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno (EROs) tenemos por ejemplo, algunos agentes, como la enzima catalasa, convierten las especies reactivas de oxígeno (EROs) en moléculas menos activas y previene la transformación de estas especies menos activas a una forma más perjudicial. Otra estrategia antioxidante es reducir al mínimo la disponibilidad de pro-oxidantes tales como el hierro y los iones de cobre, a través de la unión de metales a proteínas. Por otra parte, numerosos agentes de bajo peso molecular son capaces de barrer especies reactivas de oxígeno (EROs). Ejemplos de esta estrategia incluyen antioxidantes endógenos como el glutatión, ácido úrico y bilirrubina, junto con los agentes exógenos de la dieta, como el ácido ascórbico y vitamina E.

### **2.5.1 Enzimas Antioxidantes.-**

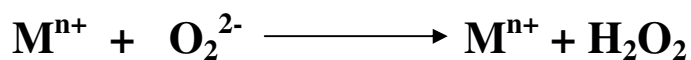
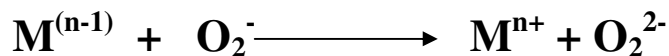
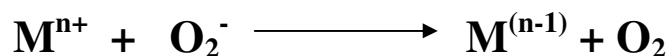
Las principales enzimas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y catalasa. Enzimas antioxidantes adicionales como peroxirredoxina, glutaredoxina, y tioredoxina reductasa también contribuyen a la protección contra la oxidación celular.

### 2.5.1.1 Superóxido Dismutasa.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich y constituye la primera línea de defensa contra los radicales superóxido.



La dismutación de los radicales superóxido produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ). El mecanismo de dismutación se describe a continuación.



En los mamíferos existen tres isoformas de SOD (SOD1, SOD2, SOD3), y todas ellas requieren un metal de transición en el sitio activo para lograr la ruptura catalítica del anión superóxido <sup>(10)</sup>. SOD1 requiere de cobre-cinc como cofactor y se localiza principalmente en el citosol y el espacio intermembrana mitocondrial. SOD2, Mn-SOD, utiliza manganeso como cofactor y se encuentra en la matriz mitocondrial. Por último, SOD3 requiere de cobre-cinc como cofactor y se encuentra en el espacio extracelular.

TABLE 1. *Properties of human SOD isoenzymes*

Property	SOD1	SOD2	SOD3
Cellular location	Cytosol and mitochondrial IMS	Mitochondrial matrix	Extracellular
Metal/monomer	1 Cu, 1 Zn	1 Mn	1 Cu, 1 Zn
Molecular mass, kDa	32.5	24.7	30
Subunit	Dimer	Tetramer	Tetramer
Inhibition by CN <sup>-</sup>	Yes	No	Yes
Inhibition by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Yes	Yes	Yes
Rate constant for reaction with O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.62 × 10 <sup>9</sup>	1.2 × 10 <sup>9</sup>	0.72 × 10 <sup>9</sup>

IMS, intermembrane space. Data from Hearn et al. (144) and Suzuki et al. (385).

### ***Resumen de las propiedades de las isoenzimas SOD humanos (Tomado de Powers)<sup>(10)</sup>***

Aunque los radicales superóxido, no son altamente tóxicos, pueden extraer electrones de las membranas biológicas o de otros componentes celulares, lo que resulta en una cadena de reacciones de radicales.

Los radicales superóxido también son tóxicos debido a su capacidad para participar en la formación de radicales hidroxilo y para reaccionar con el NO para formar peroxinitrito. La evidencia directa para apoyar esta idea es ilustrada por el hecho de que la mutagénesis de SOD1 en los seres humanos promueve la apoptosis de las neuronas espinales que resulta en la esclerosis lateral amiotrófica.

La proporción entre las isoenzimas SOD1 y SOD2 varía entre los tejidos. En el músculo esquelético, 15-35% de la actividad de la SOD total se encuentra en la mitocondria, y el restante 65-85% se encuentra en el citosol<sup>(10)</sup>.

### 2.5.1.2 Glutation Peroxidasa.-

Se han identificado cinco peroxidasas de glutatión en los mamíferos (GPX1-GPX5)<sup>(10)</sup>.

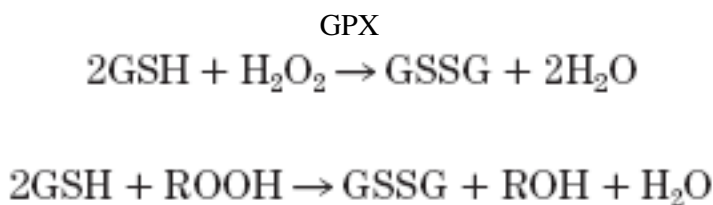
TABLE 2. *Physical characteristics and tissue locations of the multiple GPX proteins in humans*

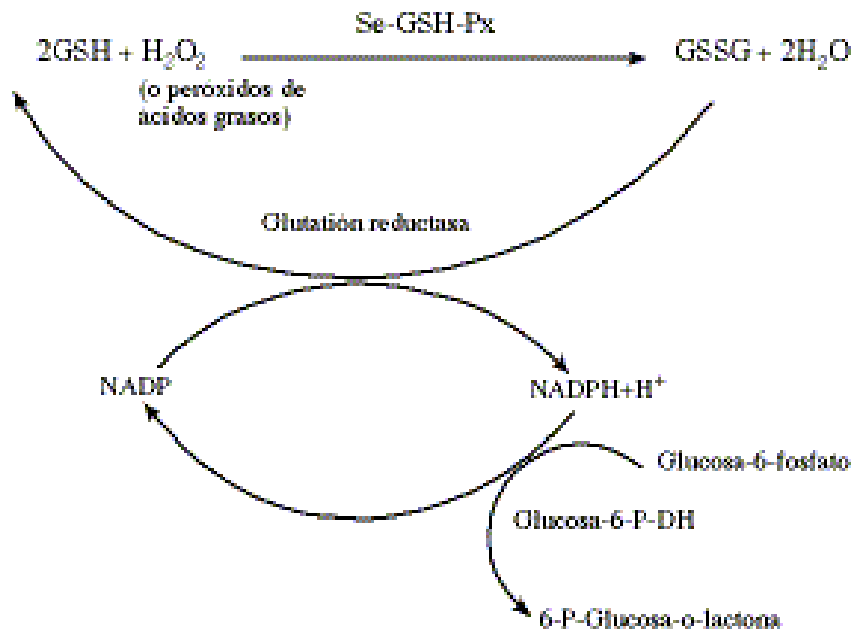
Property	GPX1	GPX2	GPX3	GPX4	GPX5
Cellular location	Cytosol and mitochondria	Cytosol	Extracellular space and cytosol	Membrane-bound nuclei and mitochondria	Extracellular and membrane bound
Subunit	Tetrameric	Tetrameric	Tetrameric	Monomeric	Dimeric
Molecular mass, kDa	21	22	22.5	19	24
Tissue location	All tissues	Stomach, intestine	All tissues	Testes, spermatozoa, heart, brain	Epididymis, spermatozoa, liver, kidney

Data from Brigelius-Flohe (54) and Drevet (101).

*(Tomado de Powers)<sup>(10)</sup>*

Todas las enzimas GPX catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidroperóxido orgánico (ROOH) a agua (H<sub>2</sub>O) y alcohol (ROH) respectivamente, utilizando el glutatión reducido (GSH), o en algunos casos, tiorredoxina glutaredoxina como donador de electrones<sup>(10)</sup>. Cuando GSH es el principal donador de electrones, dona un par de iones de hidrógeno y es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG) de la siguiente manera:





Aunque la reacción catalizada por todos GPXs parece ser la misma, GPXs individuales difieren en la especificidad de sustrato (es decir, variando la gama de hidroperóxidos) y localización celular (es decir, citosol vs mitocondrias)<sup>(10)</sup>.

La diferente especificidad de sustrato y localización celular de las diferentes isoformas de GPX parece optimizar la función GPX como una enzima antioxidante celular. Por otra parte, aunque todos los isoenzimas de GPX son peroxidasa eficientes, diferentes isoformas de GPX también pueden ejercer una gran variedad de funciones específicas en la regulación metabólica, como el silenciamiento de las lipoxigenasas<sup>(10)</sup>.

Para funcionar, la mayoría de las isoformas de GPX requieren un suministro de GSH que proporcione los electrones. Desde que el GSH es oxidado por GPX para formar GSSG, las células deben poseer una vía capaz de regenerar el GSH. La reducción de GSSG a GSH es realizada por la glutathión reductasa, una enzima que contiene flavina NADPH mediante la cual proporciona el poder reductor. Muchos

tejidos producen NADPH través de la vía de la pentosa-fosfato por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, pero los músculos esqueléticos producen NADPH, principalmente a través de la isocitrato deshidrogenasa <sup>(10)</sup>.

#### 2.5.1.3 Catalasa.-

La catalasa es la enzima encargada de la descomposición de peróxido de hidrógeno en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta principalmente localizada en los peroxisomas o microperoxisomes. Es un homotetramero con un peso molecular de 240 kDa y está ampliamente distribuida dentro de la célula <sup>(10)</sup>. El hierro es un cofactor necesario ubicado en el sitio activo de la enzima <sup>(10)</sup>. Aunque CAT y GPX tienen sustratos comunes, CAT tiene una afinidad mucho más baja para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en bajas concentraciones en comparación con GPX (es decir, GPX Km 1 M vs CAT Km 1 mM) <sup>(10)</sup>.

#### 2.5.1.4 Enzimas Antioxidantes Secundarias.-

Además de las enzimas antioxidantes primarias, las células contienen varias otras enzimas que pueden contribuir directa o indirectamente con el mantenimiento del



equilibrio redox. Entre estas, la tiorredoxina, glutaredoxina, y los sistemas de peroxirredoxina son contribuyentes importantes.

El sistema antioxidante tiorredoxina se compone de tiorredoxina (TRX) y tiorredoxina reductasa. Las células contienen dos sistemas de TRX, citosólica (TRX1) y mitocondrial (TRX2). Funcionalmente, TRX es la principal disulfuro reductasa responsable del mantenimiento de las proteínas en su estado reducido. La TRX oxidada es reducida por los electrones de NADPH a través de la tiorredoxina reductasa. Además de la prevención de la oxidación de las proteínas, muchas otras funciones fisiológicas de TRX se han descrito en particular la reducción de factores de transcripción, la protección contra el estrés oxidativo, y el control de la apoptosis. Por otra parte, la tiorredoxina reductasa también contribuye como una enzima antioxidante mediante la reducción de hidroperóxidos y funcionando como un NADPH-dependiente deshidroascorbato reductasa para reciclar la vitamina C<sup>(10)</sup>.

Similar a TRX, glutaredoxina (GRX) es una tiodisulfuro oxidorreductasa que está involucrada en la protección y reparación de proteínas tioles y no tioles durante los períodos de estrés oxidativo<sup>(10)</sup>. GRX protege los grupos tioles por la transferencia de electrones desde el NADPH a sustratos disulfuro, y este ciclo catalítico se da junto con el de glutatión reductasa y glutatión. Las células humanas contienen tres GRXs diferentes; GRX1 se encuentra en el citosol, mientras que tanto GRX2 y GRX5 se encuentran en la mitocondria.

Aunque TRX y GRX controlan el estado redox de los grupos tiol de las cadenas laterales cisteinil, su presencia simultánea en las células sugiere diferentes funciones

para cada proteína. De hecho, mientras que en TRX y GRX algunas funciones se solapan, las GRXS son únicamente reactivas con glutatión-disulfuros mixtos. Por lo tanto, parece que GRX y TRX funcionan de manera cooperativa para mantener el estado redox reducido de proteínas tioles y no tioles<sup>(10)</sup>.

Peroxirredoxina (PRX), fue descubierta en 1988 y es una peroxidasa capaz de reducir los hidroperóxidos y peroxinitrato con el uso de electrones proporcionados por un tiol fisiológico tal como TRX. Las células de mamíferos expresan seis isoformas de PRX (PRX I-VI) que se distribuyen de manera diferente dentro de la célula: PRX I, II y VI se encuentran en el citosol; PRX III está situada en la mitocondria; PRX IV está ubicado en el espacio extracelular, y PRX V se encuentra tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas. Desafortunadamente, un análisis de la cinética de reacción PRX a concentración fisiológica no ha reportado ninguna de las isoformas de PRX. Sin embargo, las eficiencias molares de PRXs son generalmente menores que GPX o CAT, por varias órdenes de magnitud. Por lo tanto, aunque PRXs puede defender contra el estrés oxidativo celular, la importancia de su papel antioxidante en las células de mamífero no está clara<sup>(10)</sup>.

### **2.5.2 Antioxidantes No Enzimáticos.-**

La segunda defensa antioxidante corresponde a los antioxidantes no enzimáticos que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales. Capturan los radicales libres impidiendo la reacción en cadena y otros reparan las células dañadas. Funcionan cuando los sistemas

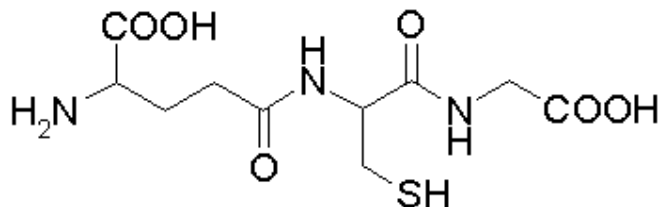
enzimáticos antioxidantes quedan desbordados; estos sistemas se denominan captadores de radicales libres y son capaces de frenar las reacciones de oxidación.

Estas sustancias ceden un electrón, previniendo así el daño oxidativo. Al hacer esto se consumen porque el antioxidante sufre una modificación química transformándose en un radical libre flojo o inactivo. Por lo tanto, a diferencia de las enzimas antioxidantes, estos compuestos antioxidantes deben ser reemplazados.

Existen antioxidantes no enzimáticos:

- De origen endógeno, Son aquellos que son sintetizados por el organismo como glutatión, urato, y ubiquinol.
- De origen exógeno, Los de origen exógeno, provenientes de la dieta, como vitamina C, vitamina E, carotenoides, polifenoles y flavonoides, al no ser sintetizados por las células, para ser reemplazados necesitan ser nuevamente ingeridos en la dieta. La vitamina E y el b-Caroteno protegen a las membranas celulares del daño de los radicales. La vitamina C trabaja en conjunto con la vitamina E para proteger tanto a las sustancias lipídicas como a las proteínas de las células del daño de los radicales.

### 2.5.2.1 Glutation (GSH).-



El glutati3n (GSH) es un trip3ptido y est3 compuesto de tres amino3cidos, 3cido glut3mico, glicina y ciste3na. Es el tiol no proteico m3s abundante en las c3lulas.

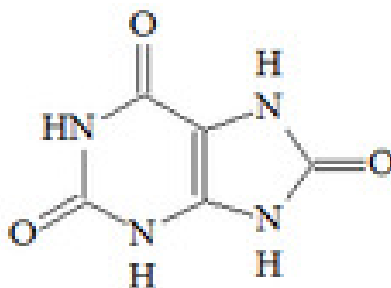
La habilidad de esta mol3cula est3 en donar un electr3n (hidr3geno), que hace posible su bioactividad. Su capacidad de donaci3n de electrones est3 ligada a su sulfhidrilo o grupo de azufre.

Este antioxidante es principalmente sintetizado en el h3gado y se transporta a los tejidos a trav3s de la circulaci3n. La concentraci3n de glutati3n en las c3lulas es en rango milimolar para la mayor3a de los tejidos, y el contenido de GSH var3a en los 3rganos de acuerdo a su funci3n <sup>(10)</sup>. Por ejemplo, los tejidos con alta exposici3n a los oxidantes (como el cristalino del ojo y el h3gado) contienen altos niveles de GSH.

Como antioxidante, GSH m3ltiples funciones en las c3lulas. En primer lugar, GSH puede reaccionar directamente con una variedad de radicales con la donaci3n de un 3tomo de hidr3geno <sup>(10)</sup>. En segundo lugar, una de las principales acciones antioxidantes de GSH es la de servir como sustrato para GPX para eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroper3xidos org3nicos. Por otra parte, GSH participa tambi3n en la reducci3n de otros antioxidantes en la c3lula, incluyendo las vitaminas E y C. Adem3s cumple la

función muy importante de protección antioxidante dentro de la célula, especialmente en el núcleo, donde se debe proteger el DNA y el RNA. .

#### 2.5.2.2 Ácido Úrico.-



Es uno de los mayores antioxidantes presentes en el suero. El ácido úrico es un subproducto del metabolismo de las purinas en los seres humanos y otros primates, y es potencialmente un importante antioxidante de bajo peso molecular en fluidos biológicos humanos. A pH fisiológico, casi todo el ácido úrico se convierte en urato. El papel antioxidante del ácido úrico / urato fue reportado por primera vez en 1960, y pruebas adicionales de sus propiedades antioxidantes se documentaron en la década de 1980 con experimentos que demuestran que el ácido úrico es un poderoso barredor de radicales peroxilo, radicales hidroxilo, y oxígeno singlete. Como antioxidante, ácido úrico es capaz de proteger contra el daño oxidativo, actuando como un donante de electrones. De urato también es capaz de formar quelatos con iones metálicos como el hierro y el cobre evitando que los radicales hidroxilo catalicen la reacción de Fenton<sup>(10)</sup>.

#### 2.5.2.3 Bilirrubina.-

La bilirrubina es el producto final del catabolismo de hemoproteínas. La hemoxigenasa rompe el anillo hemo para formar biliverdina; la biliverdina es reducida

entonces por la biliverdina reductasa para formar la bilirrubina. Aunque ambos biliverdina y bilirrubina son especies reducidas, la bilirrubina es considerada como el mejor antioxidante fisiológico. De hecho, la bilirrubina posee un fuerte potencial antioxidante contra los radicales peróxido y se ha demostrado que protege a las células de los niveles tóxicos de peróxido de hidrógeno. Se ha sugerido que la potente acción antioxidante fisiológica de la bilirrubina es resultado de un ciclo de amplificación de la bilirrubina por el cual actúa como un antioxidante, se oxida de nuevo a biliverdina y luego vuelve a la bilirrubina a través de la biliverdina reductasa <sup>(10)</sup>.

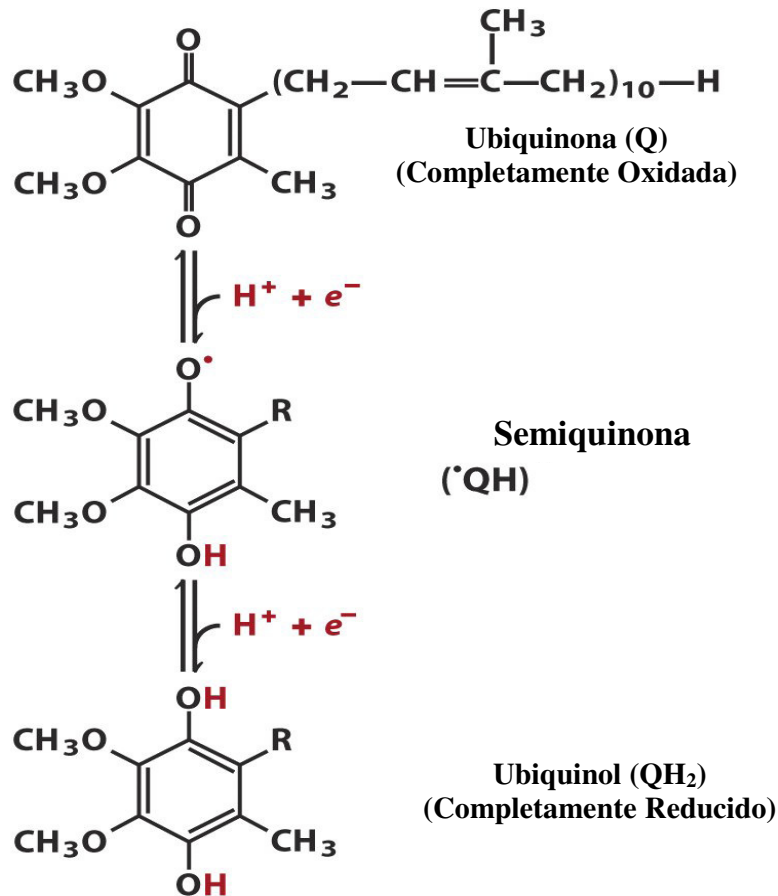
#### 2.5.2.4 Coenzima Q10.-

Otro antioxidante no enzimático digno de debate es la coenzima Q10. Derivado quinona con larga cadena isoprenoide, denominado también ubiquinona. Se sintetiza en las células y es esencial en el transporte de electrones a nivel mitocondrial y también se encuentra en las membranas celulares <sup>(10)</sup>.

Se le atribuirle propiedades importantes para la prevención y tratamiento de diversas patologías, estimula el sistema inmune, mejora el funcionamiento coronario, aumenta la energía celular y normaliza las constantes sanguíneas, entre otros efectos beneficiosos. Y todo ello sin efectos secundarios notables.

Aunque no es ni vitamina, ni mineral, ni aminoácido se la ha descrito como una sustancia que posee las propiedades de una vitamina, incluso, algunos expertos en nutrición la denominan "la vitamina 10" ya que se trata de un nutriente que el organismo necesita para alimentar las células y poder operar en un nivel óptimo. Es uno de los principales antioxidantes liposolubles.

In vitro, la coenzima Q10 puede funcionar como un antioxidante no enzimático eliminando los radicales RO<sub>2</sub> e inhibiendo la peroxidación lipídica. No obstante, la contribución de la coenzima Q10 en la defensa antioxidante in vivo, sigue siendo incierto.



La Q-10 es un antioxidante único en su género. Consigue penetrar en las mitocondrias. Para producir energía eficazmente la mitocondria necesita de la coenzima Q-10 ya que actúa como "chispa" que inicia y contribuye a hacer funcionar la cadena transportadora de electrones. Puede presentar tres estados de oxidación. Sus reacciones de transferencia de electrones están acopladas a la unión o liberación de protones: propiedad clave para transportar protones a través de la membrana, ya que al ser al

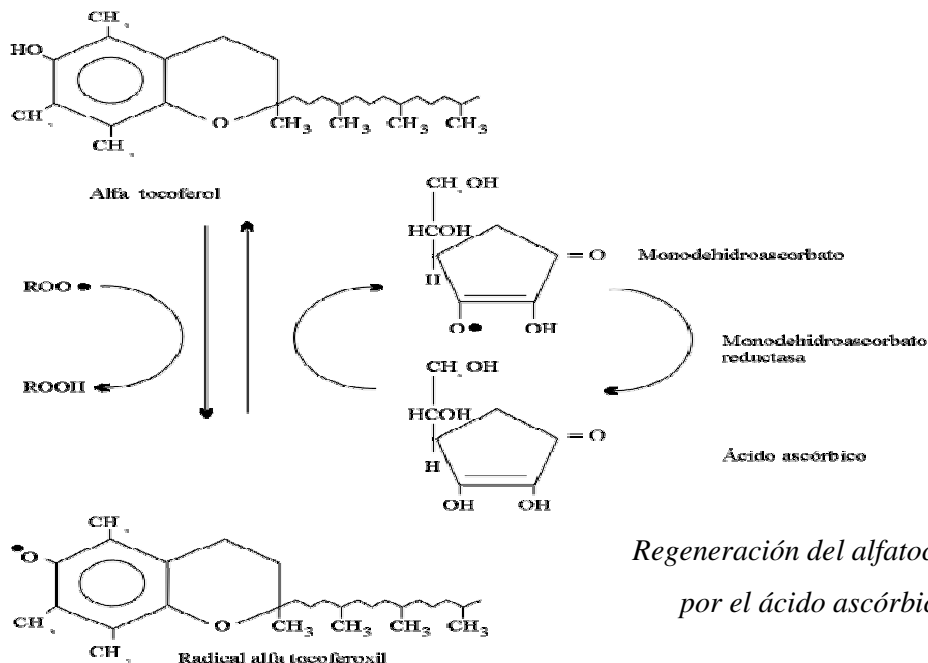


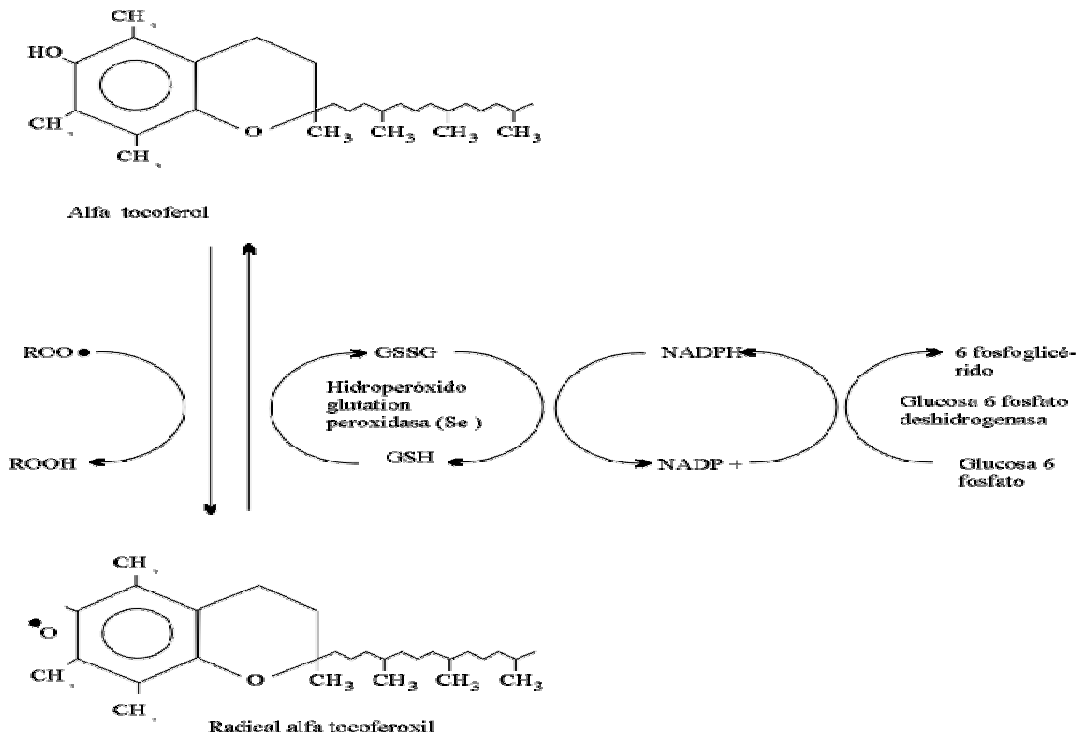


membranas. Su sitio activo se localiza en el grupo -OH en la posición 6 del anillo cromano.

Con respecto a la regeneración del tocoferol, dentro de los agentes reductores de la vitamina E se han descrito, principalmente, el ascorbato y el glutatión. Por análisis cinético y estudios de regeneración de tocoferol, en un sistema donde se produjo desnaturalización de las proteínas, se reveló que el ascorbato regenera la vitamina E por una vía no enzimática, mientras que el glutatión utiliza una vía enzimática. Se ha sugerido que la interacción con la vitamina C ocurre entre moléculas solubles en agua y lípidos de las membranas en la interfase membrana-citosol, lo cual pudiera funcionar también in vivo para la reparación de la vitamina E unida a la membrana.

El radical tocoferoxil puede ser reducido a tocoferol por reacción con el glutatión catalizado por una isoenzima específica de la membrana: la hidropéroxido glutatión peroxidasa selenio dependiente. Así el selenio, además de su papel como antioxidante en la eliminación de productos de la peroxidación de los lípidos, tiene un papel directo en el reciclaje de la vitamina E.





En las membranas mitocondriales el radical tocoferoxil puede también ser reducido por un sistema enzimático ligado a la cadena de transporte de electrones, en el cual el  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , succinato o citocromo c reducido se oxidan para dar TF.

La membrana del eritrocito contiene actividad NADH-citocromo c reductasa significativa, así como citocromo b5 que pudiera participar en el reciclaje de la vitamina E.

Se ha propuesto que además de su función antioxidante puede desempeñar una función fisicoquímica específica en el ordenamiento de las membranas lipídicas, especialmente de los fosfolípidos ricos en ácido araquidónico.

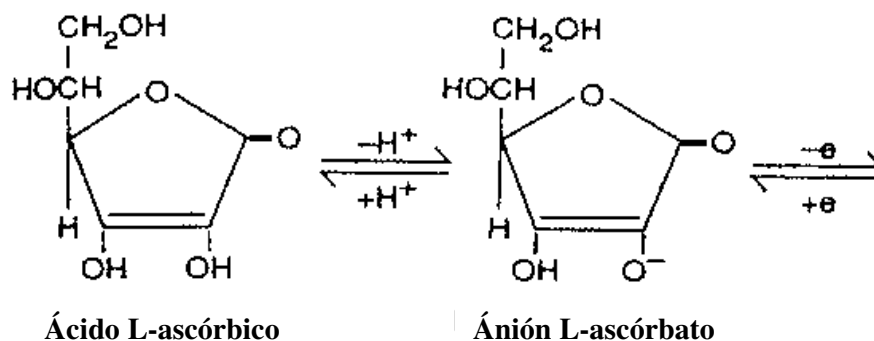
La cadena lateral fitil puede interactuar estrechamente con el doble enlace cis, interrumpido por metileno, del ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados

(AGPI) de cadena larga, estabilizando así la estructura de la membrana. Esto la protegería de la oxidación y minimizaría su susceptibilidad al ataque de la fosfolipasa; por lo tanto, el a TF preservaría la impermeabilidad de las membranas.

#### 2.5.2.6 Vitamina C.-

La vitamina C es un derivado de una hexosa, sintetizada por las plantas a partir de la glucosa y la galactosa. El ser humano y otros primates y algunas especies animales carecen de la enzima L-gulonolactona oxidasa que es capaz de catalizar la conversión de la glucosa en vitamina C, por lo que necesitan ingerirla en la dieta.

El ácido ascórbico (vitamina C) es un eficiente antioxidante citoplasmático soluble, reductor del radical superóxido, del peróxido de hidrógeno, del hipoclorito y del radical hidroxilo. También se ha demostrado que el ascorbato es el antioxidante que evita con mayor eficiencia la peroxidación de los lípidos. El ácido ascórbico puede reaccionar fácilmente con radicales libres actuando como antioxidante y pasando el mismo a ser un radical ascorbilo, que rápidamente se descompone para producir ácido ascórbico y ácido dehidroascórbido. Mediante estas reacciones, la vitamina C captura radicales libres potencialmente tóxicos como los radicales superóxido o hidroxilos y regenera el tocoferol a partir de los radicales tocoferilo



Además favorece la resistencia a las infecciones a través de la actividad inmunitaria de leucocitos, la producción de interferón, el proceso de reacción inflamatoria o la integridad de las mucosas. Regenera a la vitamina E. Una sobredosis puede provocar diarreas y otras complicaciones <sup>(21)</sup>.

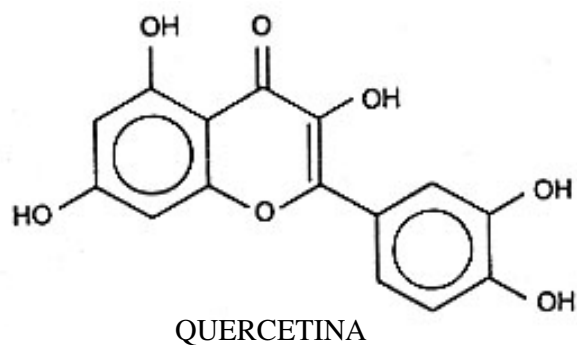
#### 2.5.2.7 Polifenoles.-

Los polifenoles son poderosos antioxidantes que protegen a las LDL del daño oxidativo, y su acción como antioxidante está relacionada no sólo con su estructura química sino también con su localización en la partícula. Pueden actuar como potentes inhibidores de la oxidación de las LDL por varios mecanismos:

- Como antioxidantes propiamente, actuando como atrapadores de radicales libres. Los diferentes polifenoles tienen distinta especificidad por las distintas especies oxidantes que se generan en el organismo.
- En forma indirecta, como agentes quelantes de iones de metales de transición, es decir, uniéndose a estos iones y reduciendo la capacidad de estos metales pesados de generar radicales libres.
- Por sus propiedades de solubilidad pueden localizarse sobre la superficie de la partícula de LDL, disminuyendo el consumo de los antioxidantes propios de las LDL como vitamina E y carotenoides, y en algunos casos regenerando vitamina E oxidada en la partícula de LDL.
- Por su capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo.

Los distintos polifenoles tienen cada uno actividades particulares. Por ejemplo, se ha observado que el consumo de catequina, quercetina y vino tinto preservan la

actividad de la paraoxonasa, enzima, asociada a las HDL, que puede hidrolizar y regenerar lípidos oxidados en las LDL. Otros polifenoles inhiben oxigenasas celulares y por tanto la producción de especies oxidantes del oxígeno y del nitrógeno dentro del cuerpo humano. Quercetina y sus glicosidos inhiben la oxidación de las LDL inducida por lipoxigenasa. Catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequin galato y epigallocatequin galato inhiben la producción de radicales libres por inhibición de la xantino oxidasa hepática.



Cada polifenol actuará por uno o más de estos mecanismos según sus propiedades particulares. En contraste con muchas frutas y verduras, cada una rica en uno o dos polifenoles en particular, en el vino hay muchos polifenoles diferentes. La gran variedad de polifenoles que posee el vino tinto y sus diversas características estructurales, posibilitan distintas propiedades de solubilidad y su acción como antioxidante para combatir distintos tipos de agentes oxidantes que se generan *in vivo*.

### III.- PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en 57 personas voluntarias, aparentemente sanas. Las características físicas de los sujetos en los tres grupos de estudio fueron: de 20 a 30 años de edad, estadísticamente homogéneos (ver tabla 1). Todos los sujetos mostraron una masa corporal normal para su altura, no poseen hábitos alimenticios inusuales y no estuvieron bajo ningún tratamiento médico. Luego de ser informados acerca del estudio y de los procedimientos de evaluación, y de los posibles riesgos e incomodidades que pudieran experimentar, los sujetos dieron su consentimiento escrito para participar en el estudio; la investigación estuvo de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975. Los voluntarios fueron clasificados de la siguiente manera:

Primer Grupo: Cada sujeto se sometió a un entrenamiento físico intenso de 2 horas, tres veces a la semana durante 2 meses. Durante el entrenamiento cada sujeto practicó disciplinas deportivas tales como fútbol, voleyball y basketball hasta agotamiento. Este entrenamiento fue monitorizado y registrado para cada sujeto.

Segundo Grupo: Personas sometidas a un entrenamiento moderado y continuo. Cada sujeto declaró practicar disciplinas deportivas tales como fútbol, voleyball y basketball, por lo menos 1 vez a la semana por más de un año.

Tercer Grupo: Grupo control constituido por personas sin entrenamiento físico.

**Tabla 1. Características de los sujetos de estudio**

	Grupo Control	Grupo Ejercicio Intenso	Grupo Ejercicio Moderado
Edad (años)	23.5	23.00	22.95
Talla (cm)	1.64	1.63	1.63
Masa Corporal (Kg)	62.81	61.24	61.63
Índice de Masa Corporal	23.11	23.10	23.23

### **3.1 EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.-**

Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena media cubital del antebrazo con el sistema vacutainer, utilizando como anticoagulante heparina. Se tomó 5mL de sangre de cada individuo en ayunas.

Se separó 1mL de muestra para las determinaciones de Hemoglobina y Hematocrito. El resto fue centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. Luego se procedió con el lavado de los eritrocitos por tres veces con cloruro de sodio al 0,9% para utilizarlos en las determinaciones de las enzimas antioxidantes y malondialdehído. Las muestras de sangre fueron mantenidas en hielo hasta la realización de los análisis. El hematócrito (Hto) fue medido el día de la toma de muestra.

#### **3.1.1 Equipos y Materiales.-**

##### **3.1.1.1 Equipo de Laboratorio.-**

- Espectrofotómetro Hewlett Packard UV/Vis

- Centrífuga IES
- Balanza Analítica
- Cocinilla
- Baño María

#### 3.1.1.2 Material de Laboratorio.-

- Pipeta Sahli
- Tubos de ensayo 10 x 75 mm
- Pipetas volumétricas y graduadas
- Micropipetas
- Termómetro
- Cronómetro
- Fiolas
- Beakers
- Gradillas

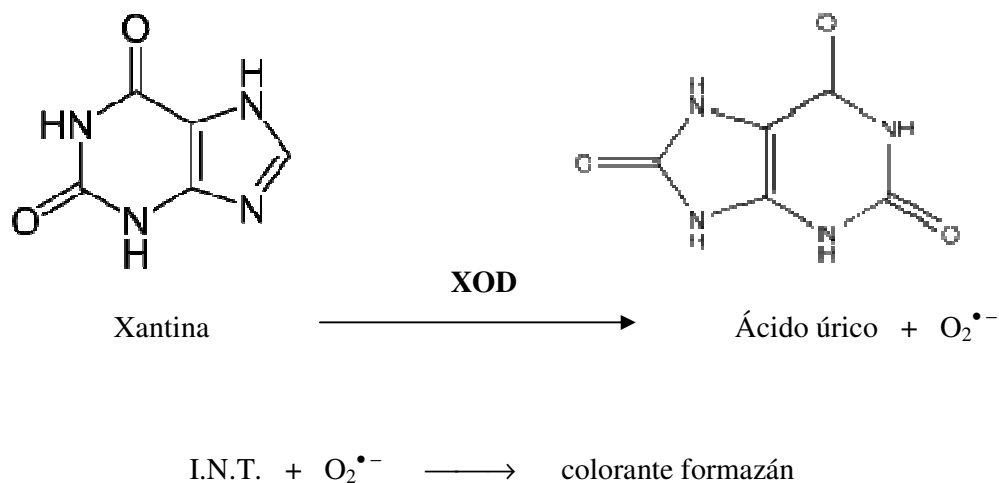
### **3.2 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD).-**

#### **3.2.1 Método.-**

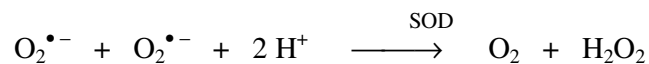
Se utilizó el kit de análisis RANSOD para determinación cuantitativa in vitro de SOD. El método empleado está basado en el estudio de Joe M. Mc Cord e Irwin Fridovich sobre la actividad enzimática de SOD que emplea el siguiente fundamento: La reacción de oxidación de xantina por la enzima xantina oxidasa



(XOD) produce radicales superóxido. Dicho radical reacciona con el reactivo cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo.



Cuando la enzima superóxido dismutasa (SOD) está presente, cataliza la dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular inhibiendo, de este modo, la formación del colorante formazán.



Se mide la actividad de la SOD por el grado de inhibición de dicha reacción.

### 3.2.2 Reactivos.-

- Sustrato mixto (Xantina 0,05mmol/L + I.N.T 0,025mmol/L.).
- Solución diluyente Buffer Fosfato 0,01 mol pH 7,0
- Solución Estándar (Patrón)

- Xantina Oxidasa (80U/L)

### 3.2.3 Procedimiento.-

Se tomó 10  $\mu$ L de eritrocitos lavados y se hemolizaron con 1 mL de agua bidestilada fría. Luego se toma 0,1 mL del lisado y se diluye con 2 mL de 0,01 mol/L buffer fosfato pH 7,0.

Utilizando la micropipeta se añadió lo correspondiente en la cubeta:

	<b>Blanco</b>	<b>Estándar</b>	<b>Muestra</b>
<b>Muestra*</b>	-	-	0,05 mL
<b>Estándar</b>	-	0,05 mL	-
<b>Diluyente</b>	0,05 mL	-	-
<b>Sustrato</b>	0,40 mL	0,40 mL	0,40 mL
Mezclar bien			
<b>Xantina Oxidasa</b>	0,06 mL	0,06 mL	0,06 mL

#### **\*Hemolizado**

Mezclar y leer la absorbancia al cabo de 30 segundos y empezar a cronometrar el tiempo simultáneamente. Se leyeron las absorbancias cada 30 segundos hasta cumplir los 3 minutos.

Las condiciones de trabajo fueron:

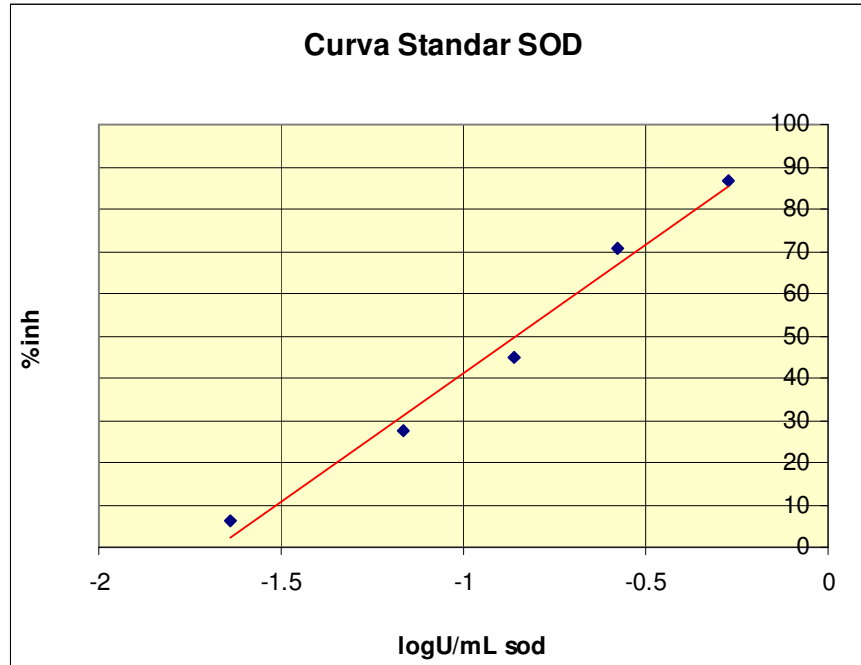
Longitud de onda: 505  $\eta$ m  
 Cubeta: 1 cm de espesor  
 Temperatura: 37 °C

### 3.2.3.1 Curva Patrón:

Se diluyó un vial de estándar patrón (S6) con 10 ml de agua bidestilada. Las diluciones subsecuentes de este estándar se preparan con la solución diluyente para producir una curva normal.

<b>Estándar</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen de Soluciones Patrón</b>	<b>Volumen de Solución Diluyente</b>
S <sub>6</sub>	0,53 U/mL	Patrón	-
S <sub>5</sub>	0,265 U/mL	5 mL de S <sub>6</sub>	5 mL
S <sub>4</sub>	0,1325 U/mL	5 mL de S <sub>5</sub>	5 mL
S <sub>3</sub>	0,06625 U/mL	5 mL de S <sub>4</sub>	5 mL
S <sub>2</sub>	0,02208 U/mL	3 mL de S <sub>3</sub>	6 mL
S <sub>1</sub>	0	-	5 mL

Por regresión lineal se obtuvo una curva que relaciona la concentración de la actividad de SOD (U/mL) y porcentaje de inhibición (%Inh). Con el fin de obtener una función lineal se trabaja con logU SOD/mL.



### 3.2.4 Cálculos.-

#### 3.2.4.1 Índice de Muestra ( $\Delta$ Abs/min).-

$$\frac{\text{Abs final} - \text{Abs inicial}}{\text{Abs final}} = \Delta \text{ Abs/min de estándar o de muestra}$$

3

$$\text{Índice del diluyente (Índice S1)} = \text{Índice de reacción sin inhibir} = 100\%$$

#### 3.2.4.2 Porcentaje de Inhibición (% Inb).-

Todos los índices ( $\Delta$  Abs/min), tanto de las muestras como de los estándares, deben ser convertidos en porcentaje del índice del blanco (reacción sin inhibir) y restados del 100% para obtener el porcentaje de inhibición.

Porcentaje de inhibición estándar o muestra:

$$100 - \frac{(\Delta \text{ Abs estándar o muestra/min} \times 100)}{\Delta \text{ Abs S1/min}}$$

$\Delta \text{ Abs S1/min}$

### **3.2.4.3 Unidades SOD por Mililitro (USOD/mL).**

A partir del porcentaje de inhibición de la muestra (%Inb) se obtienen las USOD/mL utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva patrón.

### **3.2.4.4 Conversión a Unidades de SOD / g de Hemoglobina:**

$$\frac{\text{U SOD / mL}}{\text{g Hb / mL}} = \text{U SOD / g Hb}$$

## **3.3 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA CATALASA (CAT):**

### **3.3.1 Método.**

Este método está basado en la investigación de Hugo Aebi, 1984<sup>(38)</sup>. Que se fundamenta en que la actividad específica es determinada mediante la descomposición del peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por la enzima catalasa (CAT) sigue un ritmo exponencial descrito por la constante de velocidad k.

### **3.3.2 Reactivos.**

- Buffer Fosfato 50 mM pH 7,0

- Solución de Peróxido de Hidrógeno 30 mM. Se diluye 0,34 mL de peróxido de hidrógeno al 30% con buffer fosfato para 100 mL

### 3.3.3 Procedimiento.

Se tomó 10 µL de eritrocitos lavados, que se hemolizaron con 2 mL de agua destilada. Luego se tomó 50 µL del lisado para el análisis. Que es trabajo como se indica a continuación:

	<b>Blanco</b>	<b>Muestra</b>
<b>Muestra diluida</b>	-	0,05 mL
<b>Agua bidestilada</b>	0,05 mL	-
<b>Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	3 mL	3 mL

Se leyó la absorbancia de la muestra procesada bajo las siguientes condiciones:

Longitud de onda: 240 nm  
 Cubeta: 1 cm de espesor  
 Temperatura: Ambiente (25 °C)

### 3.3.4 Cálculos.

$$K_{CAT}/g \text{ Hb} = \frac{2,3}{\Delta t} \times \frac{V_T}{V_R} \times \frac{1}{\text{Hb/L}} \times \log \left( \frac{A_1}{A_2} \right) \times 1000$$

Donde:

$K_{CAT}/g\text{ Hb}$ : Actividad de la enzima CAT expresada por gramo de hemoglobina

$\Delta t$  : Variación de tiempo

$g\text{ Hb/L}$  : gramos de hemoglobina por litro

$V_T$  : Volumen total

$V_R$  : Volumen del hemolizado (volumen real)

$A_1$  : Absorbancia a 240 nm en tiempo 0

$A_2$  : Absorbancia a 240 nm en tiempo 15 seg.

### **3.4 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MALONDIALDEHIDO (MDA).-**

#### **3.4.1 Método.-**

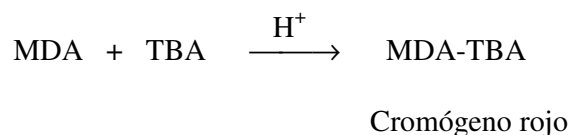
La determinación de MDA se basa en modificaciones descritas en el trabajo de Hong, Yeh, Chang y Hu <sup>(23)</sup>. Que se fundamenta en la medición espectrofotométrica de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico mediante los siguientes pasos:

- Hidrólisis Alcalina.- Adicionando NaOH para separar el MDA unido a las proteínas.
- Precipitación de Proteínas.- Añadiendo el reactivo ácido tricloroacético (TCA).

- Formación del Complejo con TBA.- Las sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico reaccionan formando un compuesto coloreado. Dichas sustancias fueron calculadas usando el coeficiente de extinción molar  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Para prevenir la polimerización del MDA, se somete la muestra a calentamiento en medio ácido.

Debido a la capacidad del TBA de reaccionar con peróxidos de ácidos grasos se adicionó el reactivo Butil hidroxi tolueno (BHT) para prevenir la autooxidación de ácidos grasos no saturados.

Dado que el MDA es un producto volátil de bajo peso molecular, el calentamiento se realizó en viales con tapa.



Reactivos.-

- Hidróxido de sodio 12,5 N
- Butil hidroxi tolueno (BHT) 0,2%
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) 18%
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%

**3.4.2 Procedimiento.-**

Se tomó 1 mL de eritrocitos lavados y se hemolizaron con 1 mL de agua bidestilada fría. Se dejó reposar en baño de hielo por 15 minutos. Luego se tomó



0,5 mL para la determinación de MDA. El resto del hemolizado se utilizó para determinar los gramos de hemoglobina por litro.

<b>Muestra (hemolizado)</b>	0.500 mL
<b>BHT 0.2%</b>	0,040 mL
<b>NaOH 12.5 N</b>	0,020 mL
Incubar por 30 min a 60° C	
<b>TCA 18%</b>	1.20 mL
Baño de hielo por 10 min	
Centrifugar (3500 rpm por 10 min)	
<b>Sobrenadante</b>	1 mL
<b>TBA 0.6%</b>	0.500 ml
Incubar por 30 min a 95°C	
Leer a 532 nm	

Se leyó la absorbancia de la muestra procesada bajo las siguientes condiciones:

Longitud de onda: 532 nm  
 Cubeta: 1 cm de espesor  
 Temperatura: 60°C y 95°C

### 3.4.3 Cálculos.-

$$\text{MDA} = \frac{\text{Abs}_{\text{SMP}} - \text{Abs}_{\text{BL}}}{\epsilon} \times \frac{1}{V_R} \times \frac{1}{g \text{ Hb/L}} \times 10^9 \text{ nmol}$$

Donde:

$\text{Abs}_{\text{SMP}}$  : Absorbancia de la muestra problema

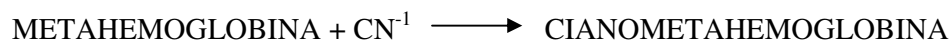
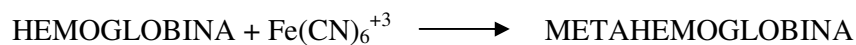
$\text{Abs}_{\text{BL}}$  : Absorbancia del blanco

$\epsilon$	:	Coefficiente de extinción de MDA ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
$V_R$	:	Volumen real
g Hb/L	:	gramos de hemoglobina por litro

### 3.5 DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA.-

#### 3.5.1 Método.-

Para la determinación de la hemoglobina se utilizó el método de la cianometahemoglobina. Se utilizó el kit Valtek para determinación cuantitativa en sangre. Este método se fundamenta en lo siguiente: Los eritrocitos son lisados por acción de un agente tensioactivo presente en el reactivo, liberando su contenido de hemoglobina en la solución. La hemoglobina liberada de los eritrocitos, es oxidada por el ferricianuro, produciendo metahemoglobina que reacciona con el cianuro, dando cianometahemoglobina, compuesto estable cuyo pico máximo de absorción es a 540 nm, siendo la intensidad de color obtenido directamente proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra.



Complejo Estable

### 3.5.2 Reactivos.-

- Solución estándar: Metahemoglobina disuelta en reactivo de Drabkin.
- Reactivo de Hemoglobina:
  - \* Ferricianuro de potasio
  - \* Cianuro de potasio
  - \* Sterox-SE
  - \* Buffer y estabilizantes no reactivos

### 3.5.3 Procedimiento.-

#### 3.5.3.1 Preparación del Reactivo:

Se diluyó el reactivo 1:10 con agua destilada antes de usarlo. La solución estándar se provee lista para su uso, se midió su absorbancia directamente contra el blanco reactivo.

#### 3.5.3.2 Preparación de Muestra:

Se colocó con *pipeta de Sahli* en tres tubos de lectura blanco, estándar y muestra problema. Se trabajó por duplicado y se colocó los siguiente:

	<b>Blanco</b>	<b>Estándar</b>	<b>MP</b>
<b>Sangre</b>	-	-	0,020 mL
<b>Estándar</b>	-	0,020 mL	-
<b>Reactivo</b>	5 mL	5 mL	5 mL

Se mezcló y se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente.

Se leyó las absorbancias 540 nm llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo.

#### 3.5.4 Cálculos.-

$$\text{Hemoglobina (g/dL)} = \text{Factor} \times \text{Absorbancia MP}$$

Donde:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración St}}{\text{Absorbancia St}}$$

#### IV.- RESULTADOS

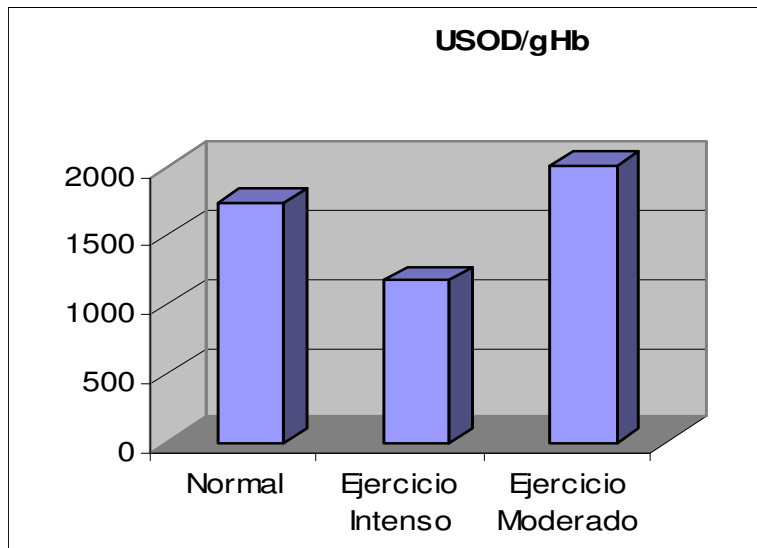
Del estudio de las enzimas antioxidantes eritrocitarias en los diferentes grupos estudio tanto de ejercicio y grupo control, se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 2. Promedio de Resultados**

	<b>Normal</b>	<b>Ejercicio Intenso</b>	<b>Ejercicio Moderado</b>
USOD/gHb	1731.76	1171.52(*)	1997.71
Kcat/gHb	0.6	0.51(**)	0.51(**)
ηmol MDA / g Hb	11.89	11.64	12.85

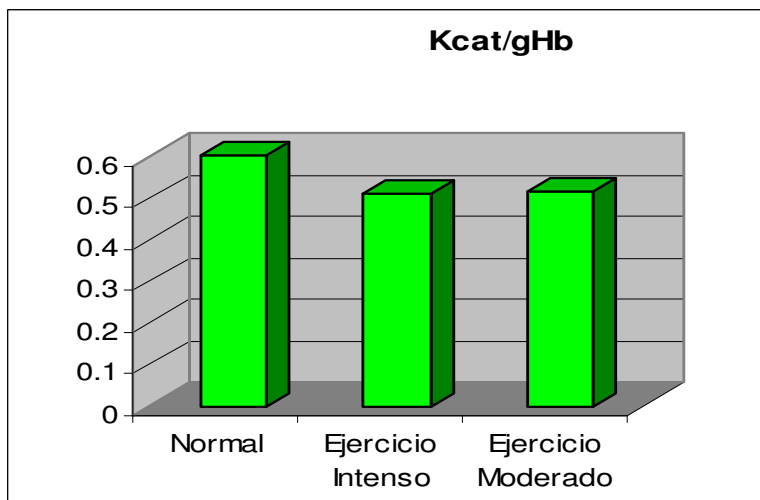
\*  $p < 0.05$ , Significativamente diferente del grupo normal.

\*\*  $p < 0.025$ , Significativamente diferente del grupo normal.



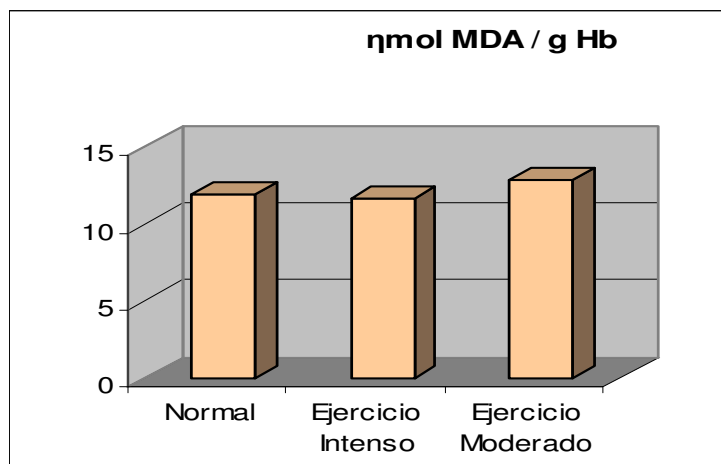
**Gráfico 1.**  
Actividad de SOD  
por grupo

Los valores medios de la enzima SOD en el grupo de ejercicio intenso (1171,52 U SOD / g Hb) fueron menores que en el grupo normal (1731,76 U SOD / g Hb), con diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ). Los valores medios de la enzima SOD en el grupo de ejercicio moderado (1997,71 U SOD / g Hb) fueron mayores que en el grupo normal (1731,76 U SOD / g Hb), sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).



**Gráfico 2.**  
Actividad de CAT  
por grupo

Los valores medios de la enzima CAT en el grupo de ejercicio intenso (0,51 k CAT / g Hb) fueron menores que en el grupo normal (0,60 k CAT / g Hb), con diferencia estadística significativa ( $p < 0,025$ ). Los valores medios de la enzima CAT en el grupo de ejercicio moderado (0,51 k CAT / g Hb) fueron menores que en el grupo normal (0,60 k CAT / g Hb), con una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,025$ ).



**Gráfico 3.**  
Niveles de MDA  
por grupo

Los valores medios de MAD en el grupo de ejercicio intenso (11,64 nmol MDA / g Hb) fueron menores que en el grupo normal (11,89 nmol MDA / g Hb). Los valores medios de la MDA en el grupo de ejercicio moderado (12,85 nmol MDA / g Hb) fueron mayores que en el grupo normal (11,89 nmol MDA / g Hb), sin diferencia estadísticamente significativa en ambos casos ( $p > 0,05$ ).

## V.- DISCUSIÓN

La principal dificultad para el estudio de los radicales libres en los sistemas biológicos es su muy fugaz vida útil (por lo general  $10^{-6}$ - $10^{-12}$  s) <sup>(1)(5)</sup>. Por otra parte, los productos de oxidación se presentan típicamente en niveles bajos en material biológico. Por tanto, no pueden proporcionar una fuerte evidencia de daño oxidativo en vivo <sup>(1)</sup>.

Por lo descrito anteriormente, en el presente estudio la situación oxidativa del organismo es evaluada por el estado de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa) y por las consecuencias de las acciones de las especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como la lipoperoxidación (MDA). Sin embargo, la respuesta de los diversos antioxidantes y mecanismos de reparación para el ejercicio parecen depender de muchos factores, incluyendo la duración del ejercicio, la intensidad del ejercicio, la exposición a ejercicio anterior, la especie evaluada, edad del sujeto, influencia de la genética y la técnica de análisis utilizados <sup>(18)(5)</sup>. Por ello el presente estudio se llevo cabo con sujetos de edad, talla y masa corporal similar.

Se evaluó el nivel de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) y malondialdehído (MDA) en eritrocitos. El eritrocito es un indicador sensible en la valoración del nivel del estrés oxidativo debido a que están expuestos a las especies reactivas de oxígeno (EROs) que se generan constantemente. Su función como transportador de gases y un alto contenido de ácidos grasos libres poliinsaturados de la membrana los torna particularmente susceptibles a la oxidación por los radicales libres dándose la posibilidad de ser objeto de daño oxidativo durante el ejercicio. De este modo los

eritrocitos se presentan como marcadores biológicos de agresiones oxidantes en diferentes órganos y sistemas<sup>(15)</sup>.

La disminución de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el grupo de ejercicio intenso nos revela una menor resistencia al estrés oxidativo. Es un indicador de estrés oxidativo inducido por el ejercicio y puede ser causada por la proteólisis estimulada por los radicales de oxígeno, lo cual modifica la actividad catalítica de las enzimas tales como SOD<sup>(15)(25)</sup>.

El aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el grupo de ejercicio moderado se corresponde con una mayor resistencia al estrés oxidativo<sup>(2)</sup>. Otros estudios reportan resultados similares para sujetos con actividades físicas análogas a las evaluadas en el presente estudio. Por ejemplo: Ortenblad y col. encontraron una mayor actividad de superóxido dismutasa en voleibolistas a comparación de sujetos no entrenados<sup>(42)</sup>. Similarmente Brites y col. reportaron un nivel superior de superóxido dismutasa (SOD) plasmática en jugadores de soccer a comparación de sujetos no entrenados<sup>(43)</sup>. Marzatico y col. adicionalmente encontraron un incremento de superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria en corredores de maratón<sup>(44)</sup>. Con respecto al tejido muscular, Deaton señala que la actividad de SOD ha mostrado un incremento en nadadores, ciclistas y voleibolistas<sup>(16)</sup>. En base a esta evidencia es que se señala que niveles mayores de SOD son más frecuentes en sujetos entrenados<sup>(2)</sup>. Esta resistencia mayor resistencia al estrés oxidativo puede estar relacionada con el incremento de las defensas antioxidantes por adaptación al ejercicio moderado de acuerdo con la teoría de la hormesis<sup>(20)</sup>. En el presente estudio la



respuesta más sensible al ejercicio por parte de superóxido dismutasa (SOD) en comparación con catalasa (CAT) está vinculada con el hecho de que SOD es la primera línea de defensa antioxidante enzimática.

La disminución de la actividad de la enzima catalasa en el grupo de ejercicio intenso se corresponde con el hecho de que la enzima superóxido dismutasa (SOD) tiene también más baja actividad en el mismo grupo. Si disminuye la actividad de la SOD, se acumulan cantidades de radical superóxido que a altas concentraciones inhibe a la enzima catalasa<sup>(26)</sup>.

La actividad disminuida de catalasa (CAT) en el grupo de ejercicio moderado nos indica que el ejercicio no ha influenciado en su actividad. Resultado similar a este fue reportado por Miyasaki y col. que luego de doce semanas de entrenamiento no encontraron diferencias significativas en la actividad de catalasa<sup>(39)</sup>. Análogamente Selman y col. no encontraron diferencia significativa en la actividad de catalasa entre un grupo control y un grupo de corredores<sup>(18)</sup>. Esto se relaciona a que la enzima catalasa mantiene sus niveles normales o disminuidos mientras los otros sistemas antioxidantes funcionen correctamente (Para el caso del grupo de ejercicio moderado la actividad de superóxido dismutasa se encuentra incrementada.)<sup>(29)</sup>. Esto es debido a que tiene una Km alta para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por tanto, su efecto es limitado y sólo puede ejercer su función cuando los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estén particularmente elevados<sup>(36)</sup>.

Los subproductos de la peroxidación de los lípidos son, de lejos, los marcadores más estudiados del daño oxidativo durante el ejercicio<sup>(16)(19)(26)</sup>. De forma similar a este

estudio la mayoría de los estudios han utilizado MDA como una medida del estrés oxidativo impuestas por el ejercicio<sup>(2)</sup>. El método para evaluar los cambios en el MDA con el ejercicio fue el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Dicho ensayo es el más comúnmente utilizado para la evaluación del estrés oxidativo generado por el ejercicio<sup>(2)</sup>. Los niveles de malondialdehído (MDA) en el grupo de ejercicio intenso fueron similares al del grupo control. Esto nos indica que la acción del sistema antioxidante es suficiente para prevenir el daño oxidativo a nivel de lípidos a largo plazo. Resultados similares fueron reportados por Niess y col. que no encontraron una diferencia significativa en los niveles de MDA de sujetos entrenados y no entrenados<sup>(40)</sup>.

Los niveles de malondialdehído (MDA) fueron superiores en grupo de ejercicio moderado que en el grupo normal. Esto nos indica que bajo las condiciones evaluadas el ejercicio moderado no produjo la reducción de radicales libres como adaptación al ejercicio<sup>(20)</sup>. Esto se relaciona con los resultados de Dufaux y col. que no reportaron cambios significativos en los niveles de MDA en sujetos con entrenamiento moderado<sup>(41)</sup>.

El presente estudio evalúa en todos los casos el efecto a largo plazo de la práctica de ejercicio y no el efecto inmediato del mismo. Por ello los resultados presentados se relacionan no solamente con la actividad física practicada sino también con el tiempo de entrenamiento.

Las desviaciones estándar de los valores de actividad de la enzima son altos si se comparan con los valores promedio en cada grupo. Otros trabajos han reportado altos valores de este indicador estadístico que se puede explicar por la gran variación que existe en la población sana en la actividad de esta enzima<sup>(26)</sup>.

## VI.- CONCLUSIÓN

Del estudio de las enzimas antioxidantes eritrocitarias superóxido dismutasa y catalasa así como la determinación de malondialdehído como indicador de la peroxidación lipídica en sujetos que practican ejercicio moderado, ejercicio intenso y grupo control, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. El grupo de ejercicio intenso presentó una menor actividad en el sistema antioxidante con respecto al grupo normal, tanto a nivel de superóxido dismutasa (SOD) como catalasa (CAT), debido a un mayor estrés oxidativo generado por la práctica inadecuada de un ejercicio intenso y discontinuo.
2. El grupo de ejercicio moderado presentó una mayor actividad en el sistema antioxidante con respecto al grupo normal a nivel de superóxido dismutasa (SOD), como respuesta adaptativa por la práctica de un ejercicio moderado y continuo.
3. En los grupos de estudio con los dos tipos de ejercicio se presentaron niveles similares al grupo normal. Esto nos indica que la peroxidación lipídica no se vio afectada por el entrenamiento.

## VII.- RECOMENDACIONES

Las investigaciones sobre EROs normalmente se han llevado a cabo en animales debido a los procedimientos invasivos que se requieren. Los estudios realizados en seres humanos se han centrado en jóvenes adultos de sexo masculino. El papel del ejercicio en relación con el estrés oxidativo potencial en los niños ha sido ignorado por completo <sup>(5)</sup>. Los estudios futuros deben extenderse a los niños, mujeres, y en adultos mayores.

Adicionalmente estudios posteriores deben evaluar el efecto del ejercicio en periodos mayores de tiempo y en ubicaciones geográficas diferentes.

## ANEXO No 1

### NIVELES DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN ERITROCITOS POR GRUPO DE ESTUDIO

	<b>Normal SOD U/gHb</b>	<b>Ejercicio Int. SOD U/gHb</b>	<b>Ejercicio Mod. SOD U/gHb</b>
<b>1</b>	3358.19	1571.47	487.59
<b>2</b>	289.16	345.82	2503.50
<b>3</b>	3183.13	1216.92	839.62
<b>4</b>	775.38	1444.75	322.25
<b>5</b>	680.47	1245.31	1523.83
<b>6</b>	3011.70	476.69	276.92
<b>7</b>	801.90	1757.19	984.86
<b>8</b>	1581.49	1225.37	4664.03
<b>9</b>	4425.87	1010.33	1309.56
<b>10</b>	1787.61	1400.57	2339.98
<b>11</b>	1050.28	997.81	2268.34
<b>12</b>	1992.46	1249.84	2064.29
<b>13</b>	4021.47	738.94	1792.91
<b>14</b>	489.51	396.33	762.80
<b>15</b>	2061.48	1051.99	1123.27
<b>16</b>	1147.04	1409.62	2920.12
<b>17</b>	1015.59	1940.45	4999.17
<b>18</b>	181.70	1383.07	4628.58
<b>19</b>	1048.95	1396.48	2144.90
<b>Prom</b>	<b>1731.76</b>	<b>1171.52</b>	<b>1997.71</b>
<b>DS</b>	2075.76	435.44	1493.40

El anexo 1 muestra los valores hallados para las enzima superóxido dismutasa (SOD) determinado en eritrocitos de sujetos que practicaron ejercicio moderado, ejercicio intenso y un grupo control.

## ANEXO No 2

### NIVELES DE LA ENZIMA CATALASA EN ERITROCITOS POR GRUPO DE ESTUDIO

	<b>Normal CAT k/gHb</b>	<b>Ejercicio Int. CAT k/gHb</b>	<b>Ejercicio Mod. CAT k/gHb</b>
<b>1</b>	0.29	0.42	0.49
<b>2</b>	0.75	0.44	0.51
<b>3</b>	0.86	0.46	0.51
<b>4</b>	0.64	0.45	0.47
<b>5</b>	0.46	0.37	0.51
<b>6</b>	0.50	0.50	0.51
<b>7</b>	0.56	0.58	0.58
<b>8</b>	0.50	0.69	0.50
<b>9</b>	0.42	0.50	0.53
<b>10</b>	0.37	0.82	0.58
<b>11</b>	0.63	0.42	0.48
<b>12</b>	0.51	0.52	0.59
<b>13</b>	0.71	0.56	0.29
<b>14</b>	0.60	0.42	0.56
<b>15</b>	0.52	0.72	0.52
<b>16</b>	0.69	0.44	0.59
<b>17</b>	0.62	0.48	0.70
<b>18</b>	0.92	0.43	0.71
<b>19</b>	0.83	0.55	1.09
<b>Prom</b>	<b>0.60</b>	<b>0.51</b>	<b>0.51</b>
<b>DS</b>	<b>0.16</b>	<b>0.12</b>	<b>0,07</b>

El anexo 2 muestra los valores hallados para las enzima catalasa (CAT) determinada en eritrocitos de sujetos en eritrocitos de sujetos que practicaron ejercicio moderado, ejercicio intenso y un grupo control.

### ANEXO 3

#### NIVELES DE MDA EN ERITROCITOS POR GRUPO DE ESTUDIO

	<b>Normal MDA (nMol/gHb)</b>	<b>Ejercicio Int. MDA (nMol/gHb)</b>	<b>Ejercicio Mod. MDA (nMol/gHb)</b>
<b>1</b>	6.66	5.49	9.17
<b>2</b>	7.27	38.49	6.19
<b>3</b>	5.59	20.24	7.62
<b>4</b>	18.75	13.23	14.45
<b>5</b>	14.11	6.55	28.33
<b>6</b>	12.62	10.41	9.61
<b>7</b>	11.82	14.06	29.43
<b>8</b>	7.23	7.83	11.67
<b>9</b>	9.58	6.46	12.78
<b>10</b>	15.43	13.98	13.09
<b>11</b>	24.85	7.90	9.06
<b>12</b>	12.22	9.77	8.78
<b>13</b>	16.05	7.85	11.14
<b>14</b>	12.60	9.39	9.36
<b>15</b>	11.63	8.15	9.94
<b>16</b>	6.83	11.14	8.10
<b>17</b>	12.96	12.25	2.82
<b>18</b>	8.93	11.98	22.13
<b>19</b>	10.81	5.96	20.51
<b>Prom</b>	<b>11.89</b>	<b>11.64</b>	<b>12.85</b>
<b>DS</b>	4.86	7.44	7.22

El anexo 3 muestra los valores de Malondialdehído como indicador de la peroxidación lipídica en eritrocitos de sujetos que practicaron ejercicio moderado, ejercicio intenso y un grupo control.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Leeuwenburgh C, Heinecke J. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Current Medicinal Chemistry* 2001. Volume 8. Page 829 – 838.
- (2) Urso M, Clarkson P. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189 Pag: 41 – 54. 2003.
- (3) Atalay M, Laaksonen D. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sports Science and Medicine*. 2002. volume 1. Pag 1 – 14.
- (4) Cemek M, Dede S, Bayiroglu F. Relationship between antioxidant capacity and oxidativestress in children with acute hepatitis A. *World Journal of Gastroenterology*. Volume 12. 6212 – 6215. 2006.
- (5) Jenkins R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002.
- (6) Del Castillo V. Antioxidantes, Radicales Libres y Ejercicio. EF y deportes *Revista Digital*. Buenos Aires N° 23. Julio 2000.
- (7) Powers S. Ejercicio, Antioxidantes, y Protección Cardíaca. *Sports Science Exchange* 85. Febrero 2002.
- (8) Gomez CC. Papel de los radicales libres en el ejercicio físico agotador y Efecto de la administración de antioxidantes. *Facultad CC. Actividad Física y Deportes*. Universidad de Aragón. 2004.
- (9) García P. Oxidantes y Antioxidantes. *El rincón del entrenador*. Volumen 31. *Gatorade Sports Science Institute*. Caracas 2002.
- (10) Powers S, Jackson M. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews* 88:1243-1276, 2008.

- (11) Rios de Molina M. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*. Volumen 2, Número 1. 2003
- (12) Córdova F. *Estrés Oxidativo*. Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública. Universidad de Huelva. 2007
- (13) Vicedo T, Vicedo O. Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de las proteínas. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. Volumen 19(3), 206-12. 2000.
- (14) Velasquez P, Prieto G, Contreras P. El envejecimiento y los radicales libres. Universidad Nacional Autónoma de México. 2004.
- (15) Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E. Antioxidant response to oxidative stress induced by exercise. *Physiology & Behavior*. Volume 84, 1-7. 2005.
- (16) Deaton C, Marlin D. Exercise –Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol 2, N° 3, 278-291. 2003
- (17) Aslan, Sekeroglu M, Tarakcioglu M. Effect of acute and regular exercise on antioxidative enzymes, tissue damage markers and membran lipid peroxidation of erythrocytes in sedentary students.
- (18) Selman C, McLaren J, Collins A. Voluntary exercise has only limited effects on activity of antioxidant enzymes and does not cause oxidative damage in small mammal. *The journal of nutrition* 132. 2002.
- (19) Li L. Oxidative Stress during Exercise: Implication of Antioxidant Nutrients. *Free Radical Biology & Medicine*. Volume 18. 1079-1086. 1995
- (20) Radak Z, Chung H, Koltai E. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews*. Volume 7, 34-42. 2008
- (21) Rafa R. *Netter. Farmacología ilustrada*. Editorial Elsevier. España, 2008.

- (22) Smith D, Carr L, Dorozynski C. Lifestyle physical activity intervention: limited inflammation and antioxidant capacity efficacy in overweight adults. *J Appl Physiol* (November 13, 2008).
- (23) Hong Y, Yeh S, Chang C. Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clinical Biochemistry*. Volume 33, N° 8. 619 -625. 2000.
- (24) Oré R, Valdivieso R, Suárez S. Marcadores de estrés oxidativo en hipertensión leve. *Anales de la Facultad de Medicina UNMSM*. Volumen 68 (4). 351 – 355. 2007.
- (25) Sumer-Gur E, Erdinc A, Serdar Z. Influence of acute exercise on oxidative stress in chronic smokers. *Journal of Sports Science and Medicine*. Volumen 2. Pag 98-105. 2003
- (26) Clapés S, Armas D, Marquetti A. Disminución de la capacidad antioxidante en niños y adolescentes diabéticos. *Rev Cubana Invest Biomed* 2006;25(2)
- (27) Giménez A. Púrpura de Schölein-Henoch y estrés oxidativo. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
- (28) Jammes Y, Guillaume S, Brégeon F. The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. Volume 144, 81 – 90. 2004
- (29) Adriazola MA, Olivera PL. Enzimas Antioxidantes en sujetos de Altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2005.
- (30) Berrocal N, Valdez A. Niveles Plasmáticos de MDA como indicador de la Peroxidación Lipídica en cobayos de Altura. Tesis para optar el título de

Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2002.

- (31) McCord J, Fridovich I. Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 244, N° 22. 6049 – 6055. 1969.
- (32) Pajuelo M, Yamada L. Enzimas Antioxidantes en cerebros de cobayos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2003.
- (33) Perales M, Torres C. Niveles de MDA y Catalasa en tejidos de cobayos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2002.
- (34) Tanabe K, Masuda K, Ajisaka R. Relationships between age, daily physical activity, antioxidant capacity and oxidative stress among middle-aged and elderly people. *International Journal of Sport and health science*. Volume 4. 515-527. 2006.
- (35) Vicente M, Miñano M. Determinación de algunos antioxidantes en sujetos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2002.
- (36) Tiskow G. Radicales Libres en Biología y Medicina: Una breve revisión. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 1996; Año 2 (1): 44 – 57.
- (37) Venditti P, Masullo P, Meo S. Effect of Training on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Release by Mitochondria from Rat Skeletal Muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Volume 372, Issue 2, 15 December 1999, Pages 315-320.

- (38) Mueller S, Riedel H, Stremmel W. Direct Evidence for Catalase as the Predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Removing Enzyme in Human Erythrocytes. The American Society of Hematology. Blood, Vol 90, No 12, 1997: pp 4973-4978
- (39) Miyasaki H, Oh-ishi S, Ookarawa T. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur J. Appl Physiol (2001) 84: 1-6.
- (40) Niess AM, Hartmann A, Grünert-Fuchs M. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. Int J Sports Med. 1996 Aug;17(6):397-403.
- (41) Dufaux B, Heine O, Kothe A. Blood glutathione status following distance running. Int J Sports Med. 1997 Feb;18(2):89-93.
- (42) Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus MS. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. Am J Physiol. 1997.
- (43) Brites F, Evelson P, Christiansen M. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. Clinical Science (1999) **96**, 381–385
- (44) Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. J Sports Med Phys Fitness. 1997 Dec;37(4):235-9.