



**CAMBIOS CON EL ENVEJECIMIENTO EN PARÁMETROS DE ESTRÉS  
OXIDATIVO EN CÉLULAS SANGUÍNEAS DE HOMBRES Y MUJERES.  
AGE-RELATED CHANGES IN OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN BLOOD  
CELLS FROM MEN AND WOMEN.**

**Muñoz Montero, Alicia.**

Dpto. de Fisiología Animal II, Facultad de CC. Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. 28040, Madrid, España. [mondela@ucm.es](mailto:mondela@ucm.es)

**RESUMEN**

El envejecimiento supone una situación de estrés oxidativo crónico. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en antioxidantes, oxidantes y daño oxidativo, en células sanguíneas humanas, a diferentes edades. En las células de sangre periférica obtenidas de 95 mujeres y 85 hombres, de distintos grupos de edad: jóvenes-(20-29 años), adultos-(30-49), maduros-(50-69), mayores-(70-89) y longevos-( $\geq 90$ ), se valoraron: la actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GR), los niveles de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG) y total (GT), y del marcador de daño a lípidos malondialdehído (MDA). En general, en ambos sexos, al envejecer, tiene lugar una disminución de la actividad CAT y GR y de los niveles de GSH y GT, y un aumento de los de GSSG y MDA y del cociente GSSG/GSH, hecho muy marcado en los maduros y que no ocurre en los longevos, los cuales se asemejan a los jóvenes.

**Palabras clave:** Envejecimiento, estrés oxidativo, células sanguíneas, hombres y mujeres.

## ABSTRACT

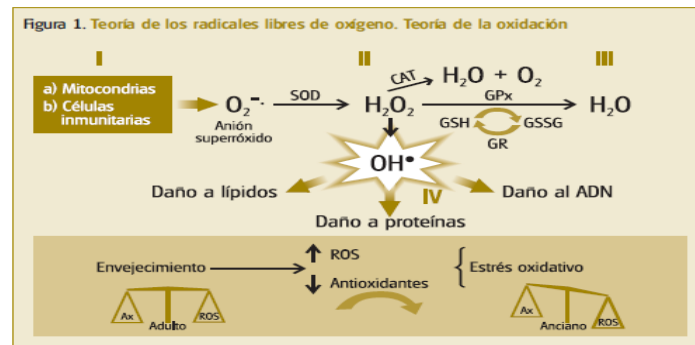
Aging underlying to a chronic oxidative situation. The aim of this work was to study the age-related changes in antioxidants, oxidants and oxidative damage in human blood cells. In peripheral blood cells obtained from 95 women and 85 men, who were divided into different age groups: young-(20-29 years), adults-(30-49), mature-(50-69), older-(70-89) and long-lived-( $\geq 90$ ), the activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GR) were evaluated, as well as the levels of reduced (GSH), oxidized (GSSG) and total (TG) glutathione, and the levels of malondialdehyde (MDA), a marker of oxidative damage to lipids. In general, in both sexes, an age-related decreased in CAT and GR activities and in the GSH and GT levels, as well as increased levels of GSSG and MDA and of the GSSG/GSH coefficient, were observed. These alterations were more marked in mature, whereas the long-lived subjects showed similar values to young.

**Key words:** Aging, oxidative stress, oxidant, antioxidant, blood cells.

## INTRODUCCIÓN

En el envejecimiento subyace una situación de estrés oxidativo crónico que afecta a todos los sistemas fisiológicos del organismo y que da lugar a la pérdida progresiva de la homeostasis y de la salud (De la Fuente y Miquel, 2009). Así, acorde con la teoría de la oxidación del envejecimiento, es el aumento de la producción de oxidantes y/o la disminución de los sistemas de defensas antioxidantes, que da como resultado un aumento del daño oxidativo en las biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN), lo que explicaría el deterioro de la funcionalidad celular asociado al avance de la edad (Figura 1). Por otro lado, es importante destacar que una de las características más importantes del envejecimiento es su gran heterogeneidad, por lo que surge la necesidad de establecer parámetros (Ej. estrés oxidativo, etc.) que puedan ser buenos predictores de edad biológica (velocidad a la que envejece cada individuo) y de longevidad (De la Fuente, 2014).

Son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto un aumento del estrés en tejidos y células de animales de experimentación a lo largo de la edad, habiéndose relacionado el mismo con su esperanza de vida. Además, también se ha descrito que los animales longevos presentan un menor estado de oxidación (más semejante al de adultos) que los viejos, al igual que las hembras lo tienen en relación a los machos, lo que explica su mayor longevidad (De la Fuente y Miquel, 2009).



**Figura 1.** Como consecuencia del metabolismo celular, tiene lugar la producción de radicales libres derivados del oxígeno, como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el cual se transforma en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la acción de la superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  (una especie reactiva de oxígeno: ROS, siguiendo las siglas en inglés), puede ser convertido en  $H_2O$  por las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx). Esta última, junto con la glutatión reductasa (GR) intervienen en el ciclo del glutatión (GSH y GSSG). Al envejecer se pierde el equilibrio entre compuestos oxidantes y defensas antioxidantes de los adultos sanos, dando lugar a una situación de estrés oxidativo (desequilibrio por mayores niveles de ROS que de defensas antioxidantes) que causa daño oxidativo a las principales biomoléculas celulares (lípidos, proteínas, ADN), contribuyendo así al daño celular y tisular.

Aunque los trabajos en humanos son más limitados, éstos también han descrito un aumento del estrés oxidativo en leucocitos y eritrocitos a lo largo del envejecimiento (Rowiński *et al.*, 2013; De la Fuente, 2014). Sin embargo, la mayoría de estudios se han llevado a cabo en ambos tipos celulares por separado, siendo muy pocos los que se han realizado usando las células sanguíneas totales, situación en la que se encuentran *in vivo*. También, en humanos son muy pocos los estudios realizados diferenciando hombres y mujeres. Por todo ello, el objetivo de este trabajo ha sido analizar en células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos) de hombres y mujeres de diferentes edades, incluyendo un grupo de longevos, los cambios en toda una serie de defensas antioxidantes, de compuestos oxidantes y de daño a lípidos, comparando los cambios por edad y en función del sexo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en 181 individuos voluntarios sanos (95 mujeres; 86 hombres) de edades comprendidas entre 20-99 años. Todos ellos procedían de distintas clínicas vinculadas al Laboratorio de “Inmunología y Gerontología Experimental” del Dpto. de Fisiología Animal II de la UCM. Los participantes se distribuyeron en 5 grupos

experimentales en función de su edad y fueron subdivididos según el sexo: “jóvenes” (20-29 años; n=21-22 mujeres-hombres, respectivamente), “adultos” (30-49 años; n=13-12), “maduros” (50-69 años; n=25-26), mayores (70-89 años; n=17-14) y longevos ( $\geq 90$  años; n=19-12). Se obtuvieron muestras de sangre periférica en tubos con citrato sódico y se aislaron, por centrifugación, las células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos). En ellas se valoraron los siguientes parámetros: la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GR), así como los niveles de los antioxidantes glutatión total (GT) y reducido (GSH), y del oxidante glutatión oxidado (GSSG) mediante el uso de métodos colorimétricos y fluorimétricos, calculándose además el coeficiente GSSG/GSH. El daño oxidativo a lípidos se valoró mediante la cuantificación de los niveles de malondialdehído (MDA) con un kit comercial (Biovision). La cantidad de proteínas de cada muestra se determinó por un kit comercial de BCA (Sigma). El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 21.0. Los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar. Se analizó la normalidad (test Kolmogorov-Smirnov), la homogeneidad de varianzas (test Levene) y la comparación de medias entre los grupos mediante una “*t*” de Student para muestras independientes. El nivel de significación se estableció en  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

En ambos sexos se observó una disminución con la edad en la actividad CAT y GR (Figura 2A-2C) (adultos y maduros vs. jóvenes). Por el contrario, la actividad GPx (Figura 2B) aumentó de forma significativa con la edad, observándose dicho aumento desde la edad adulta, y siendo muy marcado en las mujeres mayores. En hombres y mujeres se observó una disminución de los niveles de GT y GSH (Figura 2D-2E), y un aumento de los niveles de GSSG y del coeficiente GSSG/GSH (Figura 2F-2G) a lo largo de la edad (maduros y mayores vs. jóvenes y/o adultos). En cuanto al daño a lípidos, se observó un aumento de los niveles de MDA al avanzar la edad (todos los grupos vs. jóvenes), que fue significativo en el caso de las mujeres ( $P < 0,01$ ) (Figura 2H).

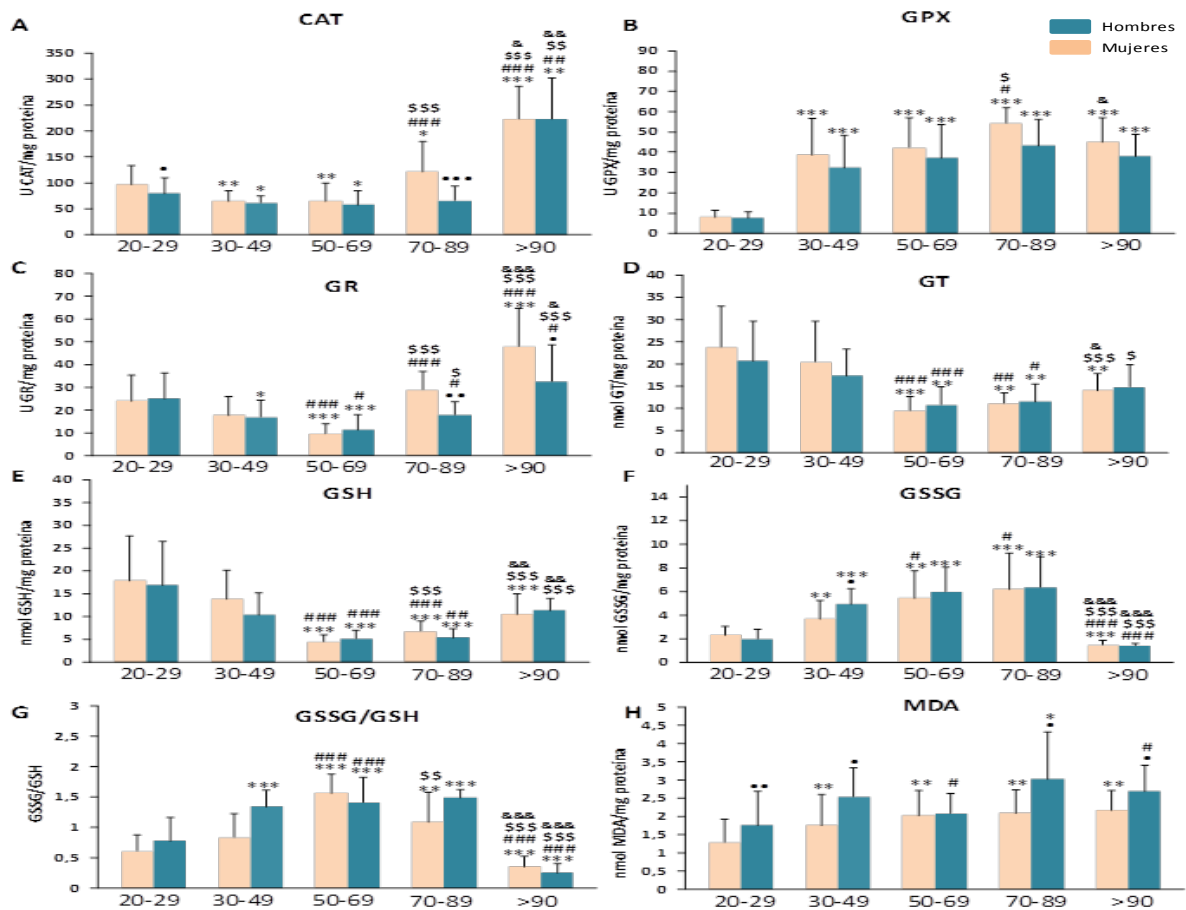


Figura 2. Actividad (U/mg proteína) de catalasa (CAT) (A), glutatión peroxidasa (GPx) (B) y glutatión reductasa (GR) (C); niveles (nmol/mg proteína) de glutatión total (GT) (D), glutatión reducido (GSH) (E) y glutatión oxidado (GSSG) (F); coeficiente GSSG/GSH (G) y niveles (nmol/mg proteína) de malondialdehído (MDA) (H), en células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos) de mujeres y hombres de distintos grupos de edad: 20-29 años, 30-49 años, 50-69 años, 70-79 años y  $\geq$  90 años. Cada columna muestra la media  $\pm$  desviación estándar de 12-26 valores correspondientes al número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*P<0,05, \*\*P<0,01,\*\*\*P<0,001 con respecto a 20-29 años; # P<0,05, ## P<0,01, ### P<0,001 con respecto a 30-49 años; \$ P<0,05, \$\$ P<0,01, \$\$\$ P<0,001 con respecto a 50-69 años; & P<0,05, && P<0,01, &&& P<0,001 con respecto a 70-89 años; • P<0,05, •• P<0,01, ••• P<0,001 con respecto a mujeres.

Los longevos mostraron un aumento muy marcado de las actividades CAT y GR (vs. todos los grupos de edad), así como de la actividad GPx (vs. jóvenes). Además, éstos también mostraron altos niveles de GSH (vs. maduros y mayores), así como bajos niveles de GSSG y un bajo coeficiente GSSG/GSH (vs. todos los grupos). Por otro lado, los hombres presentaron una menor actividad CAT (jóvenes y mayores) y GR (mayores y longevos) y unos mayores niveles de GSSG (en adultos) y de MDA (todos los grupos excepto maduros) que las mujeres.

## DISCUSIÓN

En ambos sexos, en general al avanzar la edad, tiene lugar un aumento del estrés y del daño oxidativo en las células sanguíneas. Así, se observó una disminución de las defensas antioxidantes (CAT, GR, GSH y GT) y un aumento de oxidantes (GSSG) y del cociente GSSG/GSH, lo que indica un estrés oxidativo, que explicarían el aumento del daño a lípidos (MDA). Hay que destacar que todas estas alteraciones son muy marcadas en la vejez (sobre todo en los maduros y/o mayores), mientras que los longevos mostraron un estado redox bien preservado, con valores similares a los jóvenes. Esto podría contribuir a la buena funcionalidad que estos individuos presentan en sus sistemas homeostáticos, lo que explicaría que alcancen esa edad tan avanzada. En general, todos los resultados mencionados anteriormente estarían en consonancia con otros estudios llevados a cabo en neutrófilos y linfocitos humanos, así como en leucocitos peritoneales de ratón (Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011), mientras que difieren de otros estudios descritos en eritrocitos, donde no se observaron diferencias con la edad al algunos de los parámetros estudiados (Rowiński *et al.*, 2013). Por lo tanto, hay que destacar la importancia tanto del tipo celular, como de los grupos de edad establecidos y del sexo, a la hora de realizar distintos estudios. Por otro lado, hay que destacar que los eritrocitos (células más abundantes en la sangre) al transportar el oxígeno y estar muy expuestos a oxidación, tienen un efectivo sistema protector antioxidante (Jacob *et al.*, 2013). Esto podría explicar el aumento de GPx observado al avanzar la edad. En cuanto a las diferencias de sexo, los hombres presentaron un mayor grado de estrés oxidativo (menor actividad CAT y GR y altos niveles de GSSG) que las mujeres, lo que explicaría los mayores niveles de MDA en relación a las mismas. Esto coincide con el mayor estado de oxidación observado en plasma, células inmunitarias y tejidos de hombres y roedores machos, en relación con las mujeres y las hembras, lo que ha sido atribuido al papel antioxidantes de los estrógenos (De la Fuente y Miquel, 2009).

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto un aumento del estrés y daño oxidativo en las células sanguíneas de hombres y mujeres al avanzar la edad, siendo muy marcado en la vejez, lo cual no ocurre en los longevos. Además, los hombres muestran un mayor estrés oxidativo y daño a lípidos que las mujeres. Todo ello sugiere que los marcadores estudiados podrían ser marcadores de edad biológica y predictores de longevidad.

**AGRADECIMIENTOS:** a MINECO (BFU2011-30336); FIS (PI15/01787)-FEDER y RETICEF (RD12/0043/0018)-ISCIII-FEDER por la financiación de este trabajo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Alonso-Fernandez, P y De la Fuente, M 2011. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci*, 4 (2):78-100.
- De la Fuente, M 2014. The Immune System, a Marker and Modulator of the Rate of Aging. En: Massoud, A. & Rezaei, N, Eds. *Immunology of Aging*. págs: 3-23. Springer-Verlag. Berlin.
- De la Fuente, M & Miquel, J 2009. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des*, 15:3003-3026.
- Jacob, KD, Hooten, NN, Trzeciak, AR & Evans, MK 2013. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev*, 134:139-157.
- Rowiński, R, Kozakiewicz, M, Kędziora-Kornatowska, K., Hübner-Woźniak, E y Kędziora, J 2013. Markers of oxidative stress and erythrocyte antioxidant enzyme activity in older men and women with differing physical activity. *Experimental Gerontology*, 48:1141-1146.