

Revista Biomédica

<http://revistabiomedica.mx>

Artículo original

Actividad de enzimas antioxidantes eritrocitarias en una muestra de adultos jóvenes y mayores del Valle Central, Costa Rica

Jiménez-Mora, Jenny Paola ¹, Rodríguez-Romero, Walter ²

¹Laboratorios Sáenz Renault, ²Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, CIHATA, Universidad de Costa Rica.

ABSTRACT

Erythrocyte antioxidant enzymes in costa rica

introduction. The oxidative damage caused by free oxygen radicals is related to the aging process, some pathologies and people's lifestyle. However, in the human body there are antioxidant enzymatic defenses that give us an adequate protection.

Objective. To determine the enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), catalase (CAT) and NADH methemoglobin reductase (NADH-MR), in a Costa Rican population of younger and older adults, in order to establish the reference range and to evaluate the effect of some conditions where oxidative damage occurs.

Materials and methods. The enzyme activity in a population of 110 individuals aged 19-95 years old was determined using the method proposed by Ernest Beutler. The population reference range was established and the effect of age, background pathologies and smoking were evaluated, using descriptive statistics.

Results. As age advances the enzyme NADH-MR and CAT decreased erythrocyte activity and G6PD presented no significant changes. Evidence of a significant change in the enzyme activity, with respect to the smoking habit and the pathological conditions, was not found.

Conclusions. It is necessary to carry out more research in terms of lifestyle and environmental factors, that influence the antioxidant enzyme activity. The size of populations, the absence of standardized methods and the conditions of the test can affect results and their degree of significance. For which methodologies should be standardized, so that in future projects the results can be evaluated according to these conditions.

Historial del artículo

Recibido: 23 jun 2017

Aceptado: 29 sep 2017

Disponible online: 1 ene 2018

Palabras clave

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADH metahemoglobina reductasa, Catalasa

Keywords

Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADH methemoglobin reductase, catalase

Copyright © 2018 por autores y Revista Biomédica.

Está trabajo esta licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Editor:

Fernando I. Puerto Manzano, Centro de investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Universidad Autónoma de Yucatán

*Autor para correspondencia:

Walter Enrique Rodríguez Romero, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, CIHATA, Universidad de Costa Rica.

correo electrónico:

walter.rodriguezromero@ucr.ac.cr

<http://revistabiomedica.mx>.

RESUMEN

Introducción. El daño oxidativo provocado por los radicales libres de oxígeno, está relacionado con el proceso de envejecimiento, con diversas patologías y con el estilo de vida de las personas pero, en el organismo, existen defensas enzimáticas antioxidantes que confieren una debida protección.

Objetivo. Determinar la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la catalasa (CAT) y la NADH metahemoglobina reductasa (NADH-MR) en una población costarricense de adultos jóvenes y mayores, para establecer el intervalo de referencia y evaluar el efecto de algunas condiciones donde se presenta daño oxidativo.

Materiales y métodos. Se determinó la actividad enzimática en una población de 110 individuos de entre 19 y 95 años de edad, utilizando el método propuesto por Ernest Beutler. Se estableció el intervalo de referencia de la población y se evaluó el efecto de la edad, patologías de fondo y el fumado, mediante estadística descriptiva.

Resultados. Conforme avanza la edad, las enzimas NADH-MR y la CAT disminuyeron su actividad eritrocitaria y la G6PD no presentó cambios significativos. No se encontró evidencia de cambio significativo en la actividad enzimática con respecto al hábito de fumado y las condiciones patológicas estudiadas.

Conclusiones. Es necesario realizar más investigación en factores ambientales y estilo de vida que influyen en la actividad enzimática antioxidante. El tamaño de las poblaciones, la ausencia de métodos estandarizados y las condiciones del ensayo pueden afectar los resultados y su grado de significancia. Por lo tanto, deben estandarizarse las metodologías, de manera que en futuros proyectos se evalúen los resultados de acuerdo con estas condiciones.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos aerobios se ven perjudicados si se exponen a concentraciones de oxígeno más elevadas de lo normal. El oxígeno (O₂) es un gas tóxico, y los organismos logran sobrevivir por contar con sistemas de defensa antioxidantes para neutralizar las especies reactivas del oxígeno

(“ROS”, por sus siglas en inglés), que causan daño a diferentes moléculas, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), los lípidos y las proteínas (1).

En personas saludables la producción de ROS está en equilibrio con los sistemas naturales de defensa antioxidante. Sin embargo, este balance no es perfecto, ya que la protección antioxidante está más dirigida a controlar los niveles de ROS que a eliminarlos (2). Por tanto, ese daño oxidativo es continuo y puede aumentar por distintas causas, como el envejecimiento, el fumado, una mala dieta, y la falta de ejercicio y, con el paso del tiempo, se podría relacionar con muchos desórdenes celulares y el desarrollo de padecimientos. Se han citado, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, inflamación crónica y enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson, como patologías asociadas a procesos oxidativos (3).

En respuesta al aumento de ROS, las células emplean mecanismos. Una maquinaria enzimática, que consiste en superóxido dismutasas, reductasas, catalasas, peroxiredoxinas, glutaredoxinas, y glutatión transferasas, se utiliza para mantener el equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes (4). Además de las enzimas, existen otras moléculas producidas por el organismo (albúmina, bilirrubina, glutatión) o tomadas del ambiente (tocoferoles, vitaminas, carotenoides), que pueden prevenir o retardar la oxidación de los sustratos intracelulares (4, 5).

Los compuestos antioxidantes han sido estudiados, ya que si el daño oxidativo se implica en el origen de una enfermedad, una terapia antioxidante podría evitar o retrasar su comienzo (6). El objeto de este trabajo es determinar la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la catalasa (CAT) y la NADH metahemoglobina reductasa (NADH-MR), presentes en el eritrocito, en una población costarricense de adultos jóvenes y mayores del Valle Central, a efecto de establecer el intervalo de referencia y evaluar el efecto de ciertas condiciones en las que se presenta daño oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La población costarricense, de 60 adultos jóvenes, se seleccionó entre los estudiantes de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, utilizando como criterio una edad comprendida entre los 18 y los 35 años. Además, se seleccionaron 50 adultos mayores de 60 años por facilidad de acceso, entre los residentes del Hogar Nuestra Señora de los Ángeles, ubicado en San Isidro de Heredia, y del Hogar Diurno Montelimar, ubicado en Guadalupe, Goicoechea.

Los sujetos participaron voluntariamente y completaron una fórmula de Consentimiento Informado. A cada uno de ellos se le preguntó mediante un cuestionario la edad, la frecuencia de fumado de tabaco y si presentaba o no alguna patología de fondo.

Se procedió a extraer una muestra de sangre por punción venosa en un tubo de vacutainer de 5 ml con anticoagulante EDTA. No era necesario que los participantes estuvieran en ayuno para

recolectar esta muestra. La muestra de sangre total se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta que se realizó la respectiva determinación enzimática. En dichas condiciones la estabilidad de la muestra es de aproximadamente 20 días, con una pérdida menor al 10 % en la actividad enzimática (7). En la separación de leucocitos y eritrocitos se implementó el método de Beutler modificado por Sáenz y Moreira (8). La preparación del hemolizado y determinación de hemoglobina se basó en el método de Beutler modificado por Sáenz y Moreira (8).

La determinación de actividad de las siguientes enzimas antioxidantes eritrocitarias: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, catalasa y NADH metahemoglobina reductasa, fue mediante cinética enzimática. Para la determinación de la actividad enzimática de la G6PD se utilizó el método de Beutler modificado por Sáenz y Moreira (8), en cambio para la CAT y la NADH-MR se utilizó el método de Beutler (7). La información se tabuló en el programa

Cuadro 1
Características de la población estudiada de adultos jóvenes y mayores.

		Adultos Jóvenes (n=60)	Adultos Mayores (n=50)	Valor de p*
Edad, años (promedio± DS)		23,4 ± 2,9 (19-34)	77,4 ± 9,5 (57-95)	<0,001
Género (%)	Hombres	23,3	34	0,303
	Mujeres	76,7	66	0,303
Frecuencia de fumado (%)	Nunca ha fumado	83,3	82	0,941
	Fuma diariamente en la actualidad	1,7	6	0,492
	Fuma ocasionalmente en la actualidad	6,7	4	0,842
	Fumó diariamente en el pasado	3,3	6	0,848
	Fumó ocasionalmente en el pasado	0	2	0,927
Enfermedades de los sujetos (%)	No presenta enfermedades	100	22,2	<0,001
	Enfermedad cardiovascular	0	16,7	0,003
	Diabetes Mellitus	0	19,4	0,001
	Enfermedad neurodegenerativa	0	6,9	0,129
	Trastorno cognitivo	0	25	<0,001
	Otras	0	9,7	0,776

n= número de participantes;

DS= Desviación estándar;

(mínimo-máximo) = valor mínimo y valor máximo del grupo;

*= Significativo si p<0.05 (prueba de ANOVA para variables continuas y prueba de Chi-cuadrado para proporciones)

Cuadro 2
Promedio (\pm DS) de la actividad enzimática de la G6PD, NADH-MR y CAT en la población de adultos jóvenes y mayores.

	Adultos Jóvenes (n=60)	Adultos mayores (n=50)	Valor de p*
Actividad enzimática NADH-MR(UI/gHb)	11,91 \pm 2,20 (7,20-18,31)	10,80 \pm 1,85 (6,79-13,76)	0,006
Actividad enzimática G6PD (UI/gHb)	6,94 \pm 2,18 (2,91-11,36)	7,13 \pm 1,52 (4,55-11,64)	0,604
Actividad enzimática CAT (UI/gHb)	13,14x10 ⁴ \pm 3,00x10 ⁴ (5,72x10 ⁴ -19,70x10 ⁴)	11,67x10 ⁴ \pm 2,67x10 ⁴ (7,54x10 ⁴ -17,58x10 ⁴)	0,008

n= número de participantes

DS= Desviación estándar; (mínimo-máximo) = valor mínimo y valor máximo del grupo

UI/gHb= Unidades Internacionales por gramo de Hemoglobina

*= Significativo si p<0,05 (prueba de ANOVA para variables continuas)

G6PD= glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

NADH-MR= NADH metahemoglobina reductasa

CAT= catalasa.

estadístico SPSS versión 20.0 para Windows. Se aplicó estadística descriptiva y se realizaron pruebas de χ^2 para comparar proporciones y ANOVA para las variables continuas. Se tomaron como significativos aquellos valores con una p< 0,05.

RESULTADOS

La edad promedio de la población de adultos jóvenes estudiada fue de 23,4 años (Edad mínima: 19-Edad máxima: 34) y la de adultos mayores fue de 77,4 años (Edad mínima: 57-Edad máxima: 95). El 23,3% de los jóvenes eran varones, y el 76,7%

mujeres. Entre los adultos mayores el 34% eran varones, y el 66% mujeres. De la población en estudio un 83,3% de adultos jóvenes y un 82% de los adultos mayores aseguraron no haber fumado nunca, mientras que sólo un 1,7% de jóvenes y un 6% de los mayores relataron tener el hábito de fumar diariamente en la actualidad. El resto de los participantes refirió haber fumado de manera ocasional o diaria en el pasado (**Cuadro 1**)

La población de adultos jóvenes no refirió ninguna enfermedad, mientras que entre los adultos mayores las enfermedades más comunes encontradas fueron

Cuadro 3
Promedio (\pm DS) de la actividad enzimática de la G6PD, NADH-MR y CAT según el género de los adultos jóvenes.

	Mujeres (n=45)	Hombres (n=14)	Valor de p*
Actividad enzimática NADH-MR(UI/gHb)	11,91 \pm 2,17 (8,08-18,31)	11,90 \pm 2,40 (7,20-16,12)	0,988
Actividad enzimática G6PD (UI/gHb)	7,12 \pm 2,11 (3,00-11,36)	6,37 \pm 2,38 (2,91-10,86)	0,264
Actividad enzimática CAT (UI/gHb)	13,28x10 ⁴ \pm 3,20x10 ⁴ (5,72x10 ⁴ -19,70x10 ⁴)	12,71x10 ⁴ \pm 2,32x10 ⁴ (9,29x10 ⁴ -18,52x10 ⁴)	0,540

n= número de participantes

DS= Desviación estándar

(mínimo-máximo) = valor mínimo y valor máximo del grupo

UI/gHb= Unidades Internacionales por gramo de Hemoglobina

*= Significativo si p<0,05 (prueba de ANOVA para variables continuas)

G6PD= glucosa-6-

Cuadro 3
Promedio (± DS) de la actividad enzimática de la G6PD, NADH-MR y CAT según el género de los adultos mayores.

	Mujeres (n=33)	Hombres (n=17)	
Actividad enzimática NADH-MR(UI/gHb)	10,87 ± 2,00 (6,79-13,76)	10,67 ± 1,59 (8,64-13,69)	0,722
Actividad enzimática G6PD (UI/gHb)	7,26 ± 1,66 (4,55-11,64)	6,84 ± 1,17 (5,34-9,77)	1,358
Actividad enzimática CAT (UI/gHb)	11,33x10 ⁴ ± 2,68x10 ⁴ (7,54x10 ⁴ -17,40x10 ⁴)	12,33x10 ⁴ ± 2,60x10 ⁴ (8,95x10 ⁴ -17,58x10 ⁴)	0,213

n= número de participantes

DS= Desviación estándar

(mínimo-máximo) = valor mínimo y valor máximo del grupo

UI/gHb= Unidades Internacionales por gramo de Hemoglobina

*= Significativo si p<0,05 (prueba de ANOVA para variables continuas)

G6PD= glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

NADH-MR= NADH metahemoglobina reductasa

; CAT= catalasa.

los trastornos cognitivos (25%), la diabetes mellitus (19,4%) y las enfermedades cardiovasculares (16,7%) (**Cuadro 1**)

Al comparar las actividades enzimáticas entre la población de adultos jóvenes y los mayores se encontró diferencia significativa en la NADH-MR (11,91 ± 2,20 UI/gHb vs 10,80 ± 1,85 UI/gHb; p=0,006) y la CAT (13,14x10⁴ ± 3,00x10⁴ UI/gHb vs 11,67x10⁴ ± 2,67x10⁴ UI/gHb; p=0,008) respectivamente. En la actividad enzimática de la

G6PD no se observó diferencia significativa entre ambos grupos (**Cuadro 2**). Asimismo, no se observó ninguna diferencia significativa al comparar las actividades enzimáticas según el género de los adultos jóvenes y mayores. (**Cuadros 3 y 4**)

El **Cuadro 5** muestra los promedios de la actividad enzimática de la NADH-MR, G6PD y CAT según los cuartiles de edad de la población total estudiada. De acuerdo con los resultados, existe una disminución significativa en la NADH-MR conforme avanza

Cuadro 5
Promedio (± DS) de la actividad enzimática de la G6PD, NADH-MR y CAT según los cuartiles de edad de la población total estudiada.

	Edad (años)				Valor de p*
	19-23 (n=32)	24-34 (n=27)	57-79 (n=26)	80-95 (n=24)	
Actividad enzimática NADH-MR(UI/gHb)	12,48 ± 2,13 (9,17-18,31)	11,21 ± 2,13 (7,20-16,12)	10,72 ± 1,87 (6,79-13,68)	10,89 ± 1,88 (7,43-13,76)	0,006
Actividad enzimática G6PD (UI/gHb)	7,43 ± 2,23 (3,00-10,86)	6,37 ± 2,00 (2,91-11,36)	7,21 ± 1,42 (4,97-9,77)	7,04 ± 1,65 (4,55-11,64)	0,178
Actividad enzimática CAT (UI/gHb)	13,45x10 ⁴ ± 3,58x10 ⁴ (5,72x10 ⁴ -19,70x10 ⁴)	12,78x10 ⁴ ± 2,18x10 ⁴ (8,95x10 ⁴ -17,33x10 ⁴)	11,62x10 ⁴ ± 2,75x10 ⁴ (7,54x10 ⁴ -17,58x10 ⁴)	11,72x10 ⁴ ± 2,63x10 ⁴ (8,36x10 ⁴ -17,23x10 ⁴)	0,053

n= número de participantes

DS= Desviación estándar

(mínimo-máximo) = valor mínimo y valor máximo del grupo

UI/gHb= Unidades Internacionales por gramo de Hemoglobina

*= Significativo si p<0,05 (prueba de ANOVA para variables continuas)

G6PD= glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

NADH-MR= NADH metahemoglobina reductasa

CAT= catalasa.

Cuadro 6
Promedio (± DS) de la actividad enzimática de la G6PD, NADH-MR y CAT según la frecuencia de fumado de la población total estudiada.

	Nunca ha fumado (n=90)	Fuma diariamente en la actualidad (n=4)	Fuma ocasionalmente en la actualidad (n=6)	Fumó diariamente en el pasado (n=6)	Valor de p*
Actividad enzimática NADH-MR(UI/gHb)	11,32 ± 2,17 (6,79-18,31)	10,91 ± 1,24 (10,23-12,77)	12,80 ± 2,03 (10,16-16,12)	10,78 ± 1,16 (9,62-12,74)	0,328
Actividad enzimática G6PD (UI/gHb)	6,89 ± 1,92 (2,91-11,64)	7,36 ± 1,82 (5,94-9,77)	8,08 ± 2,50 (3,99-10,61)	7,74 ± 1,17 (6,46-9,40)	0,365
Actividad enzimática CAT (UI/gHb)	12,40x10 ⁴ ±3,07x10 ⁴ (5,72x10 ⁴ -19,70x10 ⁴)	11,25x10 ⁴ ±2,13x10 ⁴ (8,95x10 ⁴ -13,98x10 ⁴)	13,75x10 ⁴ ±2,68x10 ⁴ (10,33x10 ⁴ -17,58x10 ⁴)	13,17x10 ⁴ ±1,75x10 ⁴ (10,17x10 ⁴ -14,94x10 ⁴)	0,542

n= número de participantes

DS= Desviación estándar

(mínimo-máximo) = valor mínimo y valor máximo del grupo

UI/gHb= Unidades Internacionales por gramo de Hemoglobina

*= Significativo si p<0,05 (prueba de ANOVA para variables continuas)

G6PD= glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

NADH-MR= NADH metahemoglobina reductasa

CAT= catalasa.

Cuadro 7
Promedio (± DS) de la actividad enzimática de la G6PD, NADH-MR y CAT según las enfermedades reportadas en la población de adultos mayores.

	No presenta enfermedades (n=16)	Enfermedad cardiovascular (n=12)	Diabetes mellitus (n=14)	Enfermedad eurodegenerativa (n=5)	Trastornos cognitivos (n=18)	Otras (n=7)	Valor de p*
Actividad enzimática NADH-MR(UI/gHb)	10,73 ± 2,15 (6,79-13,74)	10,70 ± 1,26 (8,21-12,73)	10,37 ± 1,93 (7,43-13,76)	11,03 ± 0,80 (10,05-11,83)	11,07 ± 1,88 (7,43-13,69)	11,22 ± 1,62 (8,95-13,69)	0,883
Actividad enzimática G6PD (UI/gHb)	7,16 ± 1,49 (4,55-9,24)	6,35 ± 1,39 (4,83-9,77)	7,80 ± 1,71 (5,68-11,64)	5,99 ± 0,85 (4,97-6,88)	7,34 ± 1,90 (4,83-11,64)	6,72 ± 0,96 (5,34-7,77)	0,130
Actividad enzimática CAT (UI/gHb)	10,83x10 ⁴ ±2,91x10 ⁴ (7,54x10 ⁴ -17,58x10 ⁴)	11,30x10 ⁴ ±2,08x10 ⁴ (8,38x10 ⁴ -15,21x10 ⁴)	12,24x10 ⁴ ±2,51x10 ⁴ (8,38x10 ⁴ -17,40x10 ⁴)	11,17x10 ⁴ ±1,77x10 ⁴ (8,95x10 ⁴ -12,83x10 ⁴)	12,14x10 ⁴ ±2,81x10 ⁴ (8,64x10 ⁴ -17,40x10 ⁴)	12,32x10 ⁴ ±3,04x10 ⁴ (8,95x10 ⁴ -17,23x10 ⁴)	0,597

n= número de participantes

DS= Desviación estándar; (mínimo-máximo) = valor mínimo y valor máximo del grupo

UI/gHb= Unidades Internacionales por gramo de Hemoglobina

*= Significativo si p<0,05 (prueba de ANOVA para variables continuas)

G6PD= glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

NADH-MR= NADH metahemoglobina reductasa

CAT= catalasa.

la edad ($p=0,006$), mientras que en la G6PD no se observaron diferencias significativas. En el caso de la CAT no se obtuvo una diferencia significativa, aunque el valor de p fue limítrofe a la significancia ($p=0,053$)

Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman entre las variables estudiadas, y al comparar la actividad enzimática de la CAT con la edad de los participantes la correlación es inversa y significativa al nivel de 0,05 ($r = -0,223$; $p < 0,05$), mientras que al realizar lo mismo con la NADH-MR la correlación fue inversa y significativa al nivel de 0,01 ($r = -0,272$; $p < 0,01$). Ambas enzimas disminuyen significativamente su actividad conforme avanza la edad.

No se observó diferencia significativa en las actividades enzimáticas al compararlas con la frecuencia de fumado de la población de adultos jóvenes y mayores, así como al compararlas según las enfermedades que presentaban los adultos mayores (**Cuadros 6 y 7**).

Finalmente, se determinó el intervalo de referencia de la actividad de cada una de las enzimas en ambas poblaciones estudiadas, con los siguientes resultados: En la población de adultos jóvenes se estableció un intervalo para la NADH-MR de 7,60 a 16,22 UI/gHb (P2,5 y P97,5) (**Figura 1**), para la G6PD de 2,67 a 11,21 UI/gHb (P2,5 y P97,5) (**Figura 2**) y para la CAT de $7,26 \times 10^4$ a $19,02 \times 10^4$ UI/gHb (P2,5 y P97,5) (**Figura 3**). Mientras que en la población de adultos mayores se estableció un intervalo de referencia para la NADH-MR de 7,17 a 14,43 UI/gHb (P2,5 y P97,5) (**Figura 4**), para la G6PD de 4,15 a 10,11 UI/gHb (P2,5 y P97,5) (**Figura 5**) y para la CAT de $6,47 \times 10^4$ a $16,93 \times 10^4$ UI/gHb (P2,5 y P97,5) (**Figura 6**).

DISCUSIÓN

Diversos estudios explican el comportamiento de las enzimas antioxidantes durante el proceso de envejecimiento. En eritrocitos expuestos a mucho estrés oxidativo existe un aumento en el nivel de metahemoglobina, la cual es una forma de la hemoglobina en la que el hierro ha sido oxidado, pasando de su estado ferroso (Fe^{+2}) al férrico

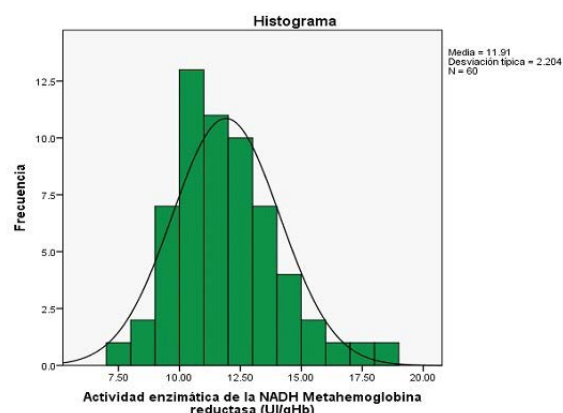


Figura 1. Histograma de la actividad enzimática de la NADH-MR (UI/gHb) de la población de adultos jóvenes estudiada.

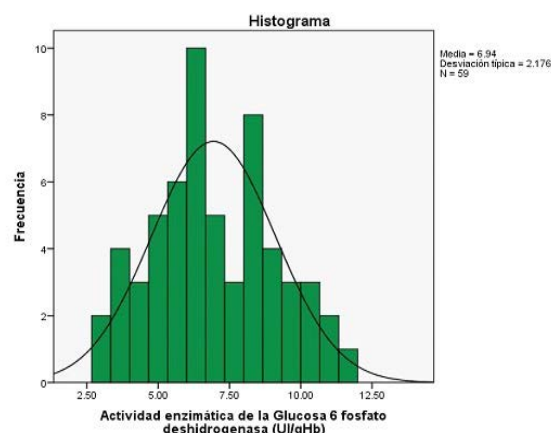


Figura 2. Histograma de la actividad enzimática de la G6PD (UI/gHb) de la población de adultos jóvenes estudiada.

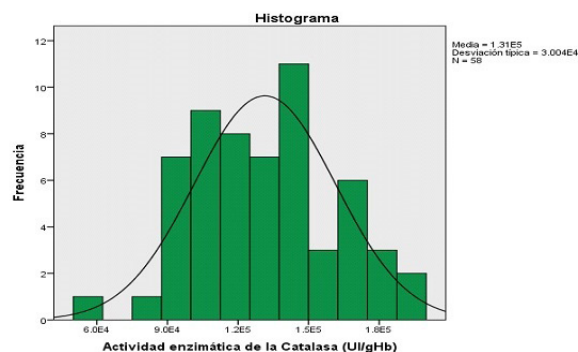


Figura 3. Histograma de la actividad enzimática de la CAT (UI/gHb) de la población de adultos jóvenes estudiada.

(Fe+3), aunque gracias a la acción de la enzima NADH-MR se reduce este compuesto. Además, la metahemoglobina puede reducirla en menor grado la enzima NADPH-metahemoglobina reductasa (9). Ambas enzimas tienen tanto una forma citoplasmática como unida a la membrana del glóbulo rojo (10).

Lukyanenko y colaboradores (10) realizaron un estudio en el que aislaron eritrocitos humanos, los expusieron a diferentes concentraciones de sustancias oxidantes *in vitro*, simulando el proceso de envejecimiento, y a partir de ello determinaron el estado físico de las membranas lipídicas y la actividad de la enzima NADH-MR unida a membrana.

Dicho estudio sugiere que la actividad enzimática de la NADH-MR se inhibe en paralelo con un cambio en el estado físico de las membranas lipídicas de los eritrocitos expuestos a estrés oxidativo y entre mayor fuera la concentración de sustancias oxidantes menor era la actividad enzimática (10). Estos resultados respaldan el comportamiento observado en nuestro estudio con respecto a la NADH-MR, que disminuyó su actividad de un 11,91 UI/gHb en los adultos jóvenes, a un 10,80 UI/gHb en los adultos mayores.

Otra de las enzimas evaluadas en este trabajo fue la CAT, que presentó una disminución de un $13,14 \times 10^4$ UI/gHb en los adultos jóvenes, a un $11,67 \times 10^4$ UI/gHb en los adultos mayores, aunque no significativamente pero limítrofe. Probablemente si el tamaño de la muestra hubiera sido mayor, y cada cuartil analizado presentara datos más robustos esta diferencia probablemente hubiera resultado significativa. Esta enzima forma parte del principal sistema de defensa antioxidante de todas las células aeróbicas y, junto con la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR), confieren protección al convertir los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en especies menos reactivas (11, 12).

Diversos trabajos han mostrado discrepancias respecto a la actividad enzimática de la CAT en poblaciones de edad avanzada. Algunos han manifestado un incremento (13, 14), mientras que

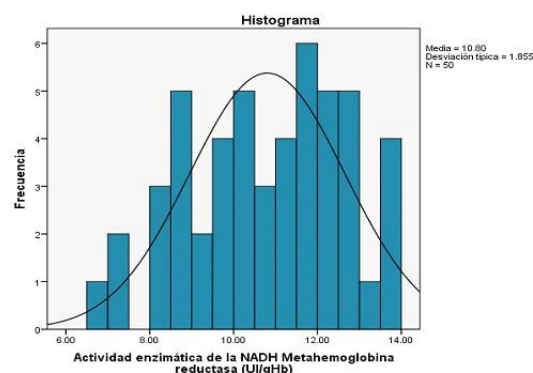


Figura 4. Histograma de la actividad enzimática de la NADH-MR (UI/gHb) de la población de adultos mayores estudiada.

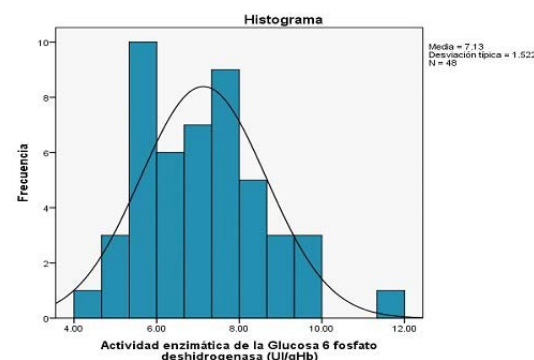


Figura 5. Histograma de la actividad enzimática de la G6PD (UI/gHb) de la población de adultos mayores estudiada.

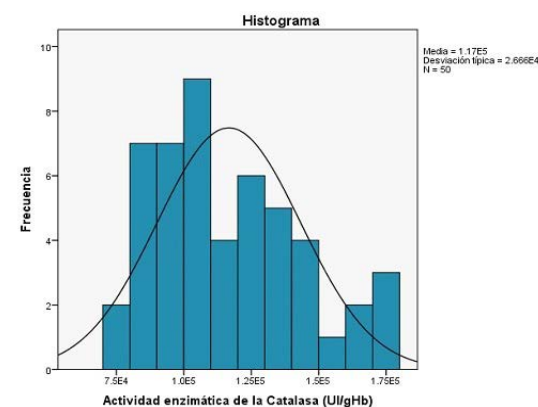


Figura 6. Histograma de la actividad enzimática de la CAT (UI/gHb) de la población de adultos mayores estudiada.

Cuadro 8

Intervalo de referencia de la actividad enzimática de la G6PD, NADH-MR y CAT en la población de adultos jóvenes y mayores estudiada e intervalos reportados por Ernest Beutler (37).

	Adultos Jóvenes (n=6)	Adultos mayores (n=50)	Intervalos reportado por E. Beutle
Actividad enzimática NADH-MR(UI/gHb)	7,60 – 16,22	7,17 – 14,43	15,36-23,06
Actividad enzimática G6PD (UI/gHb)	2,67 – 11,21	4,15 – 10,11	6,75-9,93
Actividad enzimática CAT (UI/gHb)	7,26 x10 ⁴ – 19,02 x10 ⁴	6,47 x10 ⁴ – 16,93 x10 ⁴	12,92-17,70 x10 ⁴

n= número de participantes

UI/gHb= Unidades Internacionales por gramo de Hemoglobina

G6PD= glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

NADH-MR= NADH metahemoglobina reductasa

CAT= catalasa.

otros, por el contrario, han reportado una disminución o un cambio no significativo (15- 17). Los autores explican estas diferencias por la diversidad de métodos utilizados en su determinación, ya que existen múltiples condiciones que pueden afectar la medición, la sensibilidad ante pequeños cambios puede ser distinta entre técnicas y no hay un método estándar para cuantificar la actividad enzimática.

La disminución de la CAT observada en este estudio concuerda con la teoría de Harmann, que afirma que el proceso de envejecimiento lo causa un aumento en la producción de radicales libres y un descenso en la actividad de los principales sistemas de defensa antioxidante (18), y en este caso sustenta que entre menor sea la actividad de la CAT y GPx mayor será el H₂O₂ que cause daño a los tejidos.

La tercera enzima estudiada en esta investigación es la G6PD, que cataliza la primera reacción en la vía de las pentosas fosfato, y gracias a este paso la célula se abastece de poder reductor a partir del NADPH producido y mantiene el almacén de glutatión reducido (GSH). La G6PD se considera una enzima antioxidante secundaria, ya que no interactúa directamente con las ROS, sino que colabora con la función de la GPx. (19)

La inducción de la G6PD en diferentes tejidos por una variedad de agentes ha demostrado la capacidad del gen de responder rápidamente ante

la necesidad de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para mantener el estado redox celular (20). En condiciones en que se acelera la oxidación de NADPH, la derivación de la glucosa a través de la vía de las pentosas aumenta al menos diez veces (21), por lo que se esperaría que aumente su actividad en estados de estrés oxidativo la G6PD. En este trabajo se encontró una elevación mínima de la G6PD de un valor promedio de 6,94 UI/gHb en adultos jóvenes a uno de 7,13 UI/gHb en adultos mayores, pero no representa una diferencia y un aumento significativo.

Al comparar los intervalos de referencia de la actividad enzimática de nuestras poblaciones (**Cuadro 8**) con los reportados por Ernest Beutler (7), se determinaron algunas diferencias, a pesar de haber utilizado el mismo método en caso de la CAT y NADH-MR y uno modificado en el caso de la G6PD. Aunque se reportan valores similares, es importante hacer notar que existe variabilidad y que los intervalos reportados por Beutler son más estrechos, y en el caso de la NADH-MR son un tanto más amplios.

Es sabido que las enzimas antioxidantes presentan variaciones interindividuales dependiendo de ciertos factores ambientales. Por ejemplo, algunos elementos como la dieta y el gasto energético total (como indicador del metabolismo del oxígeno y

producción de ROS) que, sin duda, contribuyen a esta variación *in vivo* de la actividad antioxidante (15). Otros factores como el tamaño de la población y características de los sujetos considerados al realizar los estudios, como su historia clínica y estilo de vida, también pueden influir de gran manera la hora de calcular intervalos de referencia.

Por ello resulta de gran importancia considerar dichos elementos al analizar los resultados de esta investigación y compararlos con los de otros autores, ya que no se conocen más características de la población analizada por Beutler para determinar el intervalo. El tipo y el tamaño de las poblaciones estudiadas, la ausencia de métodos estandarizados y las diferencias en las condiciones del ensayo (sustratos y precisión), también pueden afectar los resultados y su grado de significancia. Asimismo, es difícil comparar los intervalos obtenidos en este trabajo con los de otros autores diferentes de Beutler, debido a que son distintas las técnicas utilizadas y las unidades de medida, además de que el enfoque se da en las principales enzimas antioxidantes, como la CAT, SOD y GPx, dejando de lado la importancia de otras, como la G6PD y NADH-MR.

El fumado de tabaco es una de las variables que pueden alterar las defensas antioxidantes. El humo de cigarro contiene sustancias oxidantes entre sus múltiples constituyentes, así como potentes antioxidantes, como los polifenoles. En los fumadores existe un alto número de fagocitos activados que pueden generar gran cantidad de ROS, además de que el óxido nítrico abundante en el humo de cigarro puede contribuir a reacciones oxidativas (22).

Sin embargo, en este estudio no se observó diferencia significativa en la actividad de las enzimas determinadas de acuerdo con la frecuencia de fumado de los sujetos, probablemente porque no fue suficiente el tamaño de la población de fumadores analizada en la investigación. Se sugiere escoger una población estrictamente fumadora y una no fumadora para un estudio de este tipo, de manera que se pueda evaluar adecuadamente el efecto de este hábito en ambas muestras, y no haya diferencias significativas de tamaño.

Este mismo fenómeno se observó al evaluar el efecto de distintas enfermedades sobre la actividad enzimática antioxidante. No se encontró ninguna diferencia significativa en la actividad de las enzimas con respecto a los sujetos que refirieron no presentar enfermedades.

Diversos autores han investigado la relación entre diversas patologías y la actividad enzimática en distintos tejidos del cuerpo. Por ejemplo, Dieterich y colaboradores (23) demostraron que en el fallo cardíaco existe un aumento de la actividad de la CAT como factor protector compensatorio del incremento en el daño oxidativo y, por el contrario, enzimas como la GPx y la SOD no se ven afectadas. Por otra parte, Shull y otros investigadores demuestran que entre las células del epitelio pulmonar existe una inducción selectiva de enzimas antioxidantes, como la CAT, SOD y GPx, dependiente del tipo de sustancia oxidante que cause el daño y su concentración (24).

Las diferencias en las actividades enzimáticas observadas en la mayoría de los estudios pueden constituir la etiología de la enfermedad, ser resultado de dicho padecimiento o más bien ser un efecto del tratamiento con drogas (17, 25). Del mismo modo, las actividades encontradas en los tejidos no representan necesariamente el estado antioxidante de los eritrocitos ni mucho menos de todo el organismo (17).

El hecho de que en nuestra población no se encontraran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las enfermedades citadas, no quiere decir que éstas no tengan alguna influencia sobre la actividad antioxidante de los eritrocitos. Por el contrario, esto motiva a seguir investigando en este campo y realizar ensayos de mayor magnitud que consideren factores, como los medicamentos utilizados para el tratamiento, enfermedades secundarias que hayan padecido los sujetos o aspectos de su estilo de vida.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo es parte del proyecto 807 B2 318, Universidad de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación, Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines, CIHATA

Agradecimiento a la Dra. Ileana Holst Schumacher, Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Departamento de Análisis Clínicos, por su ayuda en la parte estadística.

REFERENCIAS

- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 June; 141(2): 312-22. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc T.* 2007 Oct; 35(5): 1147-50. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- González E, Vaillant F, Rojas G, Pérez A. Novel semiautomated method for assessing in vitro cellular antioxidant activity using the light-scattering properties of human erythrocytes. *J Agr Food Chem.* 2010 Jan; 58(3): 1455-61. <https://doi.org/10.1021/jf903467x>
- Amari F, Fettouche A, Samra MA, Kefalas P, Kampranis SC, Makris AM. Antioxidant small molecules confer variable protection against oxidative damage in yeast mutants. *J Agr Food Chem.* 2008 Feb; 56(24): 11740-51. <https://doi.org/10.1021/jf802829r>
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vasc Pharmacol.* 2015 Aug; 71: 40-56. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brit J Pharmacol.* 2004 May; 142(2): 231-55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Beutler E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.* New York, USA: Grune and Stratton; 1984.
- Sáenz GF, Moreira J. *Laboratorio Hemoglobinopatías: Manual Latinoamericano.* San José, Costa Rica: Ministerio de Salud Pública; 1980.
- Kennett EC, Ogawa E, Agar NS, Godwin IR, Bubb WA, Kuchel PW. Investigation of methaemoglobin reduction by extracellular NADH in mammalian erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Jul; 37(7): 1438-45. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.001>
- Lukyanenko LM, Kozlova NM, Slobozhanina EI. Activity of membrane-bound NADH-methemoglobin reductase and physical state of lipids in erythrocyte membranes. *Bioelectrochemistry.* 2004 May; 62(2): 191-93. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.09.005>
- Bridges KR & Pearson HA. *Anemias and other red cell disorders.* USA: McGraw-Hill Companies; 2008. <https://doi.org/10.1036/0071419403>
- Pandey KB & Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2010 Feb; 3(1): 2-12. <http://dx.doi.org/10.4161/oxim.3.1.10476>
- Kasapoglu M & Özben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol.* 2001 Feb; 36(2): 209-20. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00198-4)
- Jozwiak Z & Jasnowska B. Changes in oxygen-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. *Mech Ageing Dev.* 1985 Oct; 32(1): 77-83. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(85\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0047-6374(85)90037-5)
- Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* 1991 Nov; 37(11): 1932-37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1934468>
- Barnett YA & King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res-DNAGing.* 1995 Oct; 338(1-6): 115-28. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(95\)00017-Z](https://doi.org/10.1016/0921-8734(95)00017-Z)
- Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem.* 1997 Apr; 43(4): 562-68. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105255>
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul; 11(3): 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Öztürk O & Gümüslü S. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, copper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. *Exp Gerontol.* 2004 Feb; 39(2): 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.10.015>
- Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* 1994 Feb; 8(2): 174-81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119488>
- Acosta-Sánchez T, Núñez D, Suárez-Luengo M. Anemia hemolítica por deficiencia de G6PD y estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2003 Sep; 22(3): 186-91. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000300007
- Cross CE, van der Vliet A, Eiserich JP. Cigarette smokers and oxidant stress: a continuing mystery. *Am J Clin Nutr.* 1998 Feb; 67(2): 184-5. <http://ajcn.nutrition.org/content/67/2/184.extract>
- Dieterich S, Bielick U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation.* 2000 Jan; 101(1): 33-39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>
- Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, et al. Differential regulation of antioxidant

- enzymes in response to oxidants. J Biol Chem. 1991 Dec; 266(36): 24398-403. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1761541>
25. Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. Comp Biochem Phys C. 2002 Dec; 133(4): 493-505. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00120-5)