

Posibles mecanismos por los que las mujeres viven más que los varones

J. Viña, J. Sastre, F.V. Pallardó y C. Borrás

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. Valencia. España.

RESUMEN

Nuestro grupo ha estudiado el estrés oxidativo mitocondrial en machos y hembras para tratar de dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales las hembras son más longevas que los machos. Las mitocondrias son la fuente principal generadora de radicales libres en las células. Las mitocondrias aisladas de ratas hembra producen aproximadamente la mitad de peróxidos en comparación con las mitocondrias aisladas de sus congéneres machos. Sin embargo, la ovariectomía de las ratas conduce a una producción de peróxidos comparable a la obtenida en los machos. La terapia sustitutiva con estrógenos previene el efecto causado por la ovariectomía. Además, los valores de glutatión son mayores en mitocondrias aisladas de ratas hembra en comparación con los valores obtenidos en los machos. Una vez más, la ovariectomía disminuye los valores de este antioxidante, y el reemplazo con estrógenos previene esta disminución. Todas estas diferencias se deben a una mayor expresión de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y Mn-superóxido dismutasa en las ratas hembra respecto a los machos. Las hembras se comportan como dobles transgénicos y sobreexpresan estas 2 enzimas antioxidantes, lo que les confiere una protección extra frente al estrés oxidativo asociado al envejecimiento.

Determinamos, también, la expresión de un marcador de envejecimiento relacionado, a su vez, con el estrés oxidativo, como la subunidad 16S del ARN ribosomal, y observamos que su expresión está disminuida en los machos; por tanto, con la misma edad cronológica es como si los machos tuvieran una mayor edad biológica.

En conclusión, hay datos experimentales que apoyan la existencia de una base biológica para las diferencias de longevidad halladas entre machos y hembras, y no sólo las diferencias sociológicas subyacen tras ellas.

Palabras clave

Mecanismos. Hombres. Mujeres. Género. Estrés oxidativo. Longevidad. Genes antioxidantes. Estrógenos.

Possible mechanisms through which women live longer than men

ABSTRACT

To elucidate the molecular mechanisms enabling females to live longer than males, we investigated differences in mitochondrial oxidative stress between both sexes. Mitochondria are a major source of free radicals in cells. Those from female rats generate half the amount of peroxides than those from males. This does not occur in ovariectomized animals. Oestrogen replacement therapy prevents the effect of ovariectomy. Mitochondria from females have higher levels of reduced glutathione than those from males. Again, those from ovariectomized rats have similar levels to males, while oestrogen therapy prevents the fall in glutathione levels that occurs in ovariectomized animals. All these differences are due to greater expression of the antioxidant enzymes Mn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in females than in males. Females behave as double transgenics overexpressing superoxide dismutase and glutathione peroxidase, conferring protection against free radical mediated damage in ageing. We also determined 16S rRNA expression, a marker of ageing associated with oxidative stress, and found that it was higher in mitochondria from females than in those from males of the same chronological age. Thus, it is as if males have a greater biological age than females of the same chronological age. In conclusion, experimental data support the existence of a biological basis for the differences in longevity found between males and females. These differences cannot entirely be explained by sociological factors.

Key words

Mechanisms. Men. Women. Gender. Oxidative stress. Longevity. Antioxidant genes. Estrogens.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores logros del siglo xx es el aumento de la esperanza de vida en nuestra especie, que en Europa se ha duplicado entre 1900 y 1992¹. En todos los casos, la esperanza de vida de las mujeres supera a la de los varones. Es más, el porcentaje de diferencia de longevidad entre ambos sexos es mayor en las épocas en las que la mortalidad es debida fundamentalmente a enfermedades asociadas al envejecimiento. De hecho, en España, en 1900, la esperanza de vida para los varones era de 33,7 años y para las mujeres de 35,1, es decir, un 3,8% superior. En 1992, la esperanza de vida de los varones era de

Correspondencia: Dr. J. Viña.
Departamento de Fisiología. Universidad de Valencia.
Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia. España.
Correo electrónico: jose.vina@uv.es

Recibido el 15-3-04; aceptado el 30-6-04.

73,7 años, mientras que la de las mujeres, de 83,8, lo que supone un 9,9% más en las mujeres que en los varones.

La base de la diferencia de esperanza de vida entre varones y mujeres está aún por esclarecer. Este fenómeno no es atribuible exclusivamente a diferencias sociológicas, puesto que también se reproduce en otras especies. En nuestro laboratorio, las ratas Wistar hembras muestran una vida media un 16% superior que los machos, sometidos a las mismas condiciones de vida (fig. 1).

En el presente estudio demostramos que las diferencias de longevidad entre los machos y las hembras tienen una base biológica: los estrógenos suponen una ventaja para la supervivencia de las hembras, puesto que inducen la expresión de enzimas antioxidantes, y ello las protege frente al estrés oxidativo y, por tanto, les confiere una mayor longevidad.

Los estrógenos poseen un efecto cardioprotector², actúan como antioxidantes *in vitro*³ y se postula que podrían ser posibles agentes protectores frente a la enfermedad de Alzheimer⁴. Sin embargo, aunque existen muchos estudios sobre el papel de los estrógenos en la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, el mecanismo del efecto de los estrógenos en los procesos de envejecimiento todavía no se ha investigado.

Hay muchas teorías sobre el envejecimiento⁵. Una de las más relevantes es la de los radicales libres⁶, que propone que los radicales libres están implicados en el daño celular que acompaña al envejecimiento y a enfermedades relacionadas con éste. Esta teoría se encuentra fuertemente reforzada por los experimentos que muestran que la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa prolonga la vida de la mosca *Drosophila melanogaster*⁷. Además, existe una relación entre la producción mitocondrial de peróxidos y la longevidad de los mamíferos^{8,9}.

Las mitocondrias son la fuente principal de radicales libres de las células. Los daños producidos por los radi-

cales libres asociados al envejecimiento se centran fundamentalmente en los componentes mitocondriales¹⁰⁻¹⁴. El estrés oxidativo mitocondrial encontrado en los machos es superior al de las hembras. Se ha determinado la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas y cerebrales (sinápticas y no sinápticas) aisladas de machos y hembras y se observa que las procedentes de los machos producen una cantidad significativamente superior de peróxido de hidrógeno. Asimismo, los valores del antioxidante endógeno glutatión reducido son mayores en las mitocondrias procedentes de las hembras que en las de los machos.

El ADN mitocondrial sufre daño oxidativo durante el envejecimiento. Nuestro grupo ha mostrado recientemente que la oxidación del glutatión mitocondrial que ocurre en el envejecimiento y en la apoptosis está relacionada con el daño oxidativo al ADN mitocondrial^{13,15}. Determinamos este daño por medio de la medida del valor de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-oxodG). A consecuencia del mayor estrés oxidativo en los machos, su ADN mitocondrial está hasta 4 veces más oxidado que el de las hembras. El aumento de este parámetro, como se ha señalado anteriormente, está asociado a una menor longevidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas Wistar de entre 4 y 6 meses de edad. Los animales se estabularon bajo condiciones de humedad y temperatura constantes y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se alimentaron con dieta estándar de laboratorio (que contiene 590 g de hidratos de carbono, 30 g de lípidos y 160 g de proteínas por kilogramo de dieta) y agua del grifo *ad libitum*. Los animales se trataron de acuerdo con los Principios de la Declaración de Helsinki sobre el buen cuidado de los animales.

Aislamiento de mitocondrias

Tras sacrificar los animales por dislocación cervical, se extrajo el hígado rápidamente. Las mitocondrias hepáticas se obtuvieron por centrifugación diferencial, según la descripción de Rickwood et al¹⁶.

Tasa de producción de peróxido de hidrógeno

Se determinó en las mitocondrias aisladas mediante una modificación del método fluorimétrico desarrollado por Barja¹⁷.

Determinación de actividades enzimáticas

La actividad de la glutatión peroxidasa se determinó según describen Flohe et al¹⁸, en 1984, y la de la superóxido dismutasa también según estos mismos autores¹⁹.

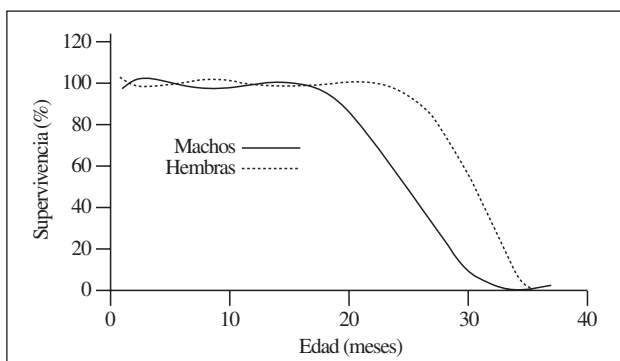


Figura 1. Curva de supervivencia de ratas Wistar machos y hembras. Las ratas hembras viven más que los machos. Ambos sexos fueron estabulados bajo condiciones estándar en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR)

El ARN se aisló del hígado utilizando el *kit* QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech). La RT-PCR se realizó utilizando el *kit* Titan™ One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim). La expresión del ARNm se estudió mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos para: glutatión peroxidasa, GACATCAGGA-GAATGGCAAG y CATCACCAAGCCAATACCAG; Mn-superóxido dismutasa, CGTGCTCCCACACATCAATC y TGAACGTCACCGAGGAGAAG; *16S ARNr*, GACGAGAA-GACCCTATGGAG y AGAAACCGACCTGGATTGC.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó en 2 pasos: primero se realizó el análisis de la varianza. La hipótesis nula se aceptó para los resultados cuya F fue no significativa con $p \leq 0,05$. En segundo lugar, los resultados cuya F fue significativa fueron analizados mediante la prueba de la t de Student, con $p \leq 0,05$ como criterio de mínima diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Como se comprueba en la figura 2, la ovariectomía en ratas conduce a un incremento de la producción de peróxidos por las mitocondrias hepáticas, hasta alcanzar los valores producidos por las mitocondrias de las ratas macho. El tratamiento de las ratas ovariectomizadas con 1 mg/kg/día de estradiol revierte los valores de peróxidos a los producidos por las ratas hembras controles.

Asimismo, los valores de glutatión reducido en mitocondrias hepáticas disminuyen después de la ovariectomía, y regresan a los valores de las hembras controles cuando se les administra terapia de sustitución hormonal con estrógenos.

Así, la terapia hormonal con estrógenos disminuye la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno y aumenta los valores de glutatión reducido. Los estrógenos desempeñan un papel protector muy importante frente al daño oxidativo mitocondrial asociado al envejecimiento.

La cantidad de estrógenos empleada en las terapias sustitutivas de estrógenos es probablemente insuficiente para que los estrógenos actúen como antioxidantes *per se*. Por ejemplo, en seres humanos, se recomienda una dosis diaria de 50 μ g de estrógenos, mientras que se requieren 400 mg de vitamina E para que sea efectiva como antioxidante, es decir, una dosis 8.000 veces mayor que de estrógenos. Por ello, nos planteamos que los estrógenos actúan como antioxidantes de modo indirecto, por medio de la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes. Así, estudiamos las enzimas antioxidantes

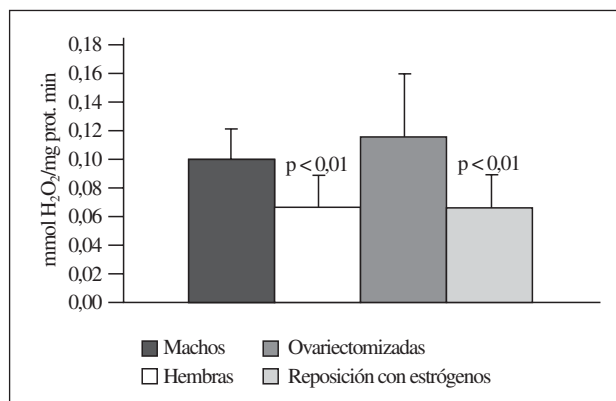


Figura 2. Producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno en hígado de machos y hembras. Efecto de la ovariectomía y de la reposición hormonal con estrógenos. La generación de peróxido de hidrógeno es mayor en mitocondrias hepáticas en machos que en hembras. La ovariectomía aumenta la producción de peróxido de hidrógeno, y ésta se revierte por la reposición con estrógenos.

Mn-superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. La expresión génica y la actividad de estas enzimas son mayores en mitocondrias hepáticas de hembras frente a machos de la misma edad (fig. 3), lo que puede explicar la menor tasa de producción de peróxidos por la mayor actividad de las enzimas antioxidantes.

DISCUSIÓN

Trabajos anteriores demuestran que la sobreexpresión de superóxido dismutasa o catalasa solas no aumenta la vida media, pero sí lo consigue la sobreexpresión de ambas enzimas de forma conjunta⁷.

Por tanto, la mayor longevidad de las hembras con respecto a los machos se puede explicar porque las hembras se comportan como dobles transgénicos, que sobreexpresan las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y Mn-superóxido dismutasa.

Otro parámetro relacionado con la longevidad que determinamos es la actividad telomerasa que, además, posee un elemento de respuesta a los estrógenos; se observa que las hembras poseen una actividad telomerasa superior en comparación con los machos.

La expresión del gen *16S ARNr* mitocondrial disminuye significativamente con la edad, y esta disminución se correlaciona con la curva de supervivencia de la mosca *Drosophila*²⁰. Además, el estrés oxidativo también causa la disminución de la expresión del *16S ARNr*²¹. La expresión de este marcador de envejecimiento está disminuida en los machos en comparación con las hembras, lo que supone que, con una misma edad cronológica, las hembras poseen una edad biológica menor que los machos, es decir, las hembras son biológicamente más jóvenes que los machos.

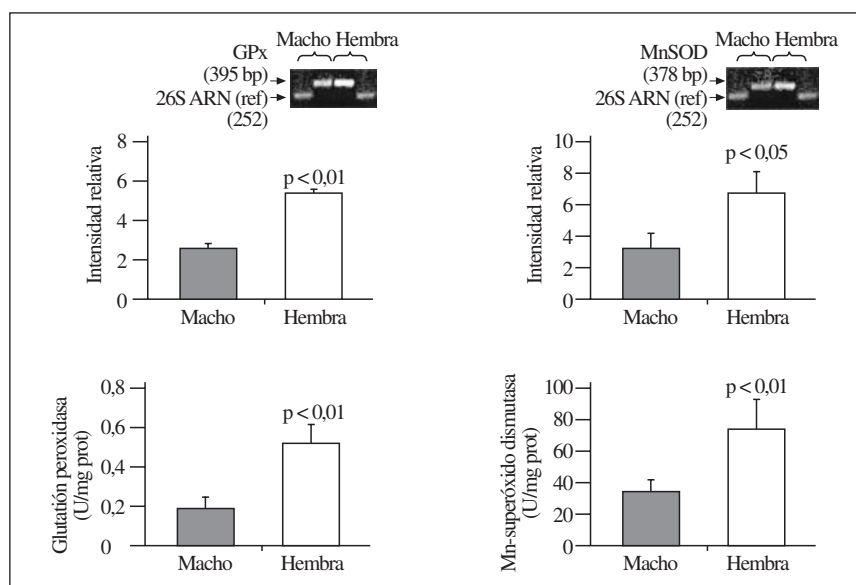


Figura 3. Expresión y actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) en hígado de ratas machos y hembras. La defensa antioxidante de las ratas hembras es superior a la de los machos.

La genisteína, el fitoestrógeno más abundante presente en la soja, mimetiza los efectos antioxidantes del estradiol. La importancia de este hecho recae en que la genisteína puede emplearse en el tratamiento de varios síntomas desagradables asociados a la menopausia. En efecto, estudios en curso en nuestro laboratorio demuestran que los fitoestrógenos poseen muchas de las propiedades beneficiosas de los estrógenos, en lo que se refiere a su capacidad para inducir genes de longevidad. Por tanto, se abre una interesante posibilidad de utilizar estos compuestos, en lugar de los estrógenos, para intentar paliar efectos desagradables asociados al envejecimiento, que sabemos que están mediados por la acción deletérea de los radicales libres.

BIBLIOGRAFÍA

- Fernández Ballesteros R, Díez-Nicolas J, Ruiz-Torres A. Spain. En: Schrots J, Fernández-Ballesteros R, Rudinger G, editors. Aging in Europe. Amsterdam: IOS Press, 1999; p. 107-21.
- Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP, et al. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4108-13.
- Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martín C, Martínez R, Lacort M. Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol* 1997;53:225-30.
- Henderson VW, Paganini-Hill A, Miller BL, Eble RJ, Reyes PF, Shoupe D, et al. Estrogen for Alzheimer's disease in women. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 2000;54:295-301.
- Medvedev Z. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1990;65:375-98.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
- Orr WC, Sohal R. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in drosophila melanogaster. *Science* 1994; 263:1128-30.
- Ku H, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydroperoxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med* 1993;15:621-7.
- Lopez Torres M, Perez Campo R, Fojas C, Cadenas S, Barja G. Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H_2O_2 and basal and maximum aerobic capacity. *Mech Aging Dev* 1993;70:177-9.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15:575-91.
- Sastre J, Pallardó FV, Plá R, Pellín A, Juan G, O'Connor E, et al. Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 1996;24:1199-205.
- Hagen TM, Yowe DL, Bartholomew JC, Wehr CM, Do KL, Park JY, et al. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: Membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3064-9.
- García de la Asunción J, Millán A, Plá R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardó FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996;10: 333-8.
- Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J* 2000;14:312-8.
- Esteve JM, Mompó J, García de la Asunción J, Sastre J, Boix J, Viña JR, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999;13:1055-64.
- Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar VM. Isolation and characteristics of intact mitochondria. En: Darley-Usmar VM, Wilson MT, Rickwood D, editors. *Mitochondria: a practical approach*. Oxford: IRL publisher Press Limited, 1987; p. 1-16.
- Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J Bioenergetics Biomembranes*, 1999;31:347-66.
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
- Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104.
- Calleja M, Peña P, Ugalde C, Ferreiro C, Marco R, Garesse R. Mitochondrial DNA remains intact during Drosophila aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced. *J Biol Chem* 1993;268: 18891-7.
- Crawford DR, Wang Y, Schools GP, Kochheiser J, Davies KJA. Down regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1997;22:551-9.