

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA – DEPARTAMENTO DE
INORGÁNICA

IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
DIFERENCIA DE LONGEVIDAD ENTRE MACHOS Y
HEMBRAS

CONSUELO BORRÁS BLASCO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de Novembre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. Fernando Bonilla Musoles
- D. Federico V. Pallardó Calatayud
- D. Jesús A. Fernández Tresguerres
- D^a. Carmen Rodríguez Sánchez
- D. Giovanni E. Mann

Va ser dirigida per:

D. José Viña Ribes

D. Joaquín Borrás Tortonda

©Copyright: Servei de Publicacions
Consuelo Borrás Blasco

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5825-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO
EN LA DIFERENCIA DE LONGEVIDAD
ENTRE MACHOS Y HEMBRAS

Presentada por:

Consuelo Borrás Blasco

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. D. Joaquín Borrás Tortonda



FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Prof. D. **José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. D. **Joaquín Borrás Tortonda**, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Consuelo Borrás Blasco, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada

**“IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
DIFERENCIA DE LONGEVIDAD ENTRE MACHOS Y
HEMBRAS”**

para la obtención del título de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 21 de Julio de 2003

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

Fdo. Prof. D. Joaquín Borrás Tortonda

AGRADECIMIENTOS

Durante el período de realización de la presente tesis, ha habido muchas personas que me han ayudado dándome su apoyo, cariño y consejos. Sin ellas no habría podido realizarlo. Este es el momento de plasmar lo agradecida que estoy a todas ellas. Es difícil reflejar con palabras aquello que uno siente, pero ahí va un intento.

Con todo mi cariño, gracias a:

Dr. José Viña por ayudarme a dar mis primeros pasos en la investigación, guiándome y enseñándome con tus consejos. Gracias por haber compartido conmigo tus conocimientos. Gracias también por toda la ayuda y el apoyo que siempre me has brindado.

Dr. Juan Sastre por haber estado siempre ahí, porque me iniciaste en el laboratorio de Fisiología, y porque en todo momento has estado dispuesto a ayudarme con tus consejos y tu apoyo.

Dr. Federico Pallardó por tus constantes palabras de ánimo, por tu calidad humana y por tus sabios consejos científicos.

Dr. Giovanni Mann, porque desde que te conocí no has dejado de ayudarme, por tus valiosos consejos y apoyo, estoy sumamente agradecida, “thank you!”.

Dr. Juan Viña, porque siempre te acuerdas de mí cuando un artículo puede interesarme.

Dra. Ana Lloret, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntas, por tu cariño, ayuda y porque siempre has sido un gran apoyo para mí en todos los sentidos.

Carmen Gómez, debo dar gracias por haberte conocido, me siento muy afortunada de haber compartido contigo tantos ratos dentro y fuera del laboratorio.

Dolores Royo, porque tu ayuda ha sido inestimable para la realización de esta tesis, y porque tu cariño y alegría en el laboratorio hacen que el trabajo sea mucho más agradable.

David García, Diana Rus, Jelena Markovik, Juan Gambini, Javi Pereda, Julián Carretero, Ángel Ortega, Amparo Buenestado, Juamba Miñana, Rafa Aranda, Laia, Lele, Gaetano Serviddio, Luis Gómez, Rafa Márquez, Juan Esteve, gracias a todos vosotros por vuestra ayuda, por vuestros consejos, por hacerme ameno el trabajo en el laboratorio, por vuestras sonrisas, y por mostrarme vuestro cariño en tantas ocasiones.

Juana Belloch, que me enseñaste el día a día en el trabajo de laboratorio, por tu valiosa colaboración.

Asun, sin tu colaboración no hubiera podido realizar esta tesis, muchas gracias por ayudarme tanto con los animales, especialmente esos ratoncillos... gracias también por tu cariño y alegría.

Concha García y Rosa Zaragoza, gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme, por vuestras palabras de ánimo y por los momentos que hemos compartido.

Emilio, porque me hiciste sentir como en casa, Chari y Kaori por los buenos ratos en Londres.

Elenita, Eva y Elena, por ayudarme con el “papeleo”, por vuestro cariño.

A los miembros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, en especial al Prof. José Luis Ríos.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

A los miembros de la Unidad Central de Investigación.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología.

A mis amigas Silvia, Nuria, Ángela, María, Lourdes, Elena N., Elena A. porque siempre habéis estado a mi lado apoyándome y por haber compartido tantos momentos conmigo.

He dejado para el final, pero son los primeros en mi corazón, a mi familia, mis padres y hermanos. Papá, gracias por ayudarme tanto, por tus consejos científicos, por tu cariño, por todo. Mami, gracias por todo tu apoyo, sin ti no lo hubiera conseguido. Kino y Lourdes, Eli y Sergio, muchísimas gracias por vuestros consejos, vuestras palabras de ánimo y por apoyarme siempre. A ti también Doppler...

A MI FAMILIA

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1-134
1. RADICALES LIBRES.....	3- 36
1.1. Concepto de radical libre.....	3- 6
1.2. El oxígeno.....	6-9
1.3. Clases de radicales libres.....	9-20
1.4. Génesis de radicales libres.....	20-32
1.4.1. Fuentes exógenas generadoras de radicales libres	
1.4.2. Fuentes endógenas generadoras de radicales libres	
1.4.2.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial	
1.4.2.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss	

1.4.2.3.	El sistema hipoxantina/xantina oxidasa	
1.4.2.4.	Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico	
1.4.2.5.	Fagocitos activados	
1.4.2.6.	Microsomas o peroxisomas	
1.4.2.7.	Diversas enzimas	
1.4.2.8.	Oxidación de moléculas por el oxígeno	
1.5.	Radicales libres y señalización celular	33-36
2.	ESTRÉS OXIDATIVO.....	37- 56
2.1.	Concepto de estrés oxidativo.....	37- 38
2.2.	Estrés oxidativo y daño a moléculas..	38- 51
2.2.1.	Daño oxidativo a lípidos.....	38-41
2.2.2.	Daño oxidativo a proteínas.....	42-45
2.2.3.	Daño oxidativo al DNA.....	45-50
2.2.4.	Daño oxidativo a glúcidos.....	50-51
2.3.	Indicadores de estrés oxidativo.....	52- 56
2.3.1.	Indicadores de daño oxidativo en citosol	52- 53

2.3.1.1.	Cociente GSH/GSSG	
2.3.2.	Indicadores de daño oxidativo	
	a lípidos.....	53-54
2.3.2.1.	Malondialdehído e hidroxinonal	
2.3.2.2.	Pentano y etano	
2.3.3.	Indicadores de daño oxidativo	
	al DNA.....	54-55
2.3.3.1.	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina	
2.3.4.	Indicadores de daño oxidativo	
	a proteínas.....	55-56
2.3.4.1.	Grupos carbonilo en proteínas	
2.3.4.2.	2-oxohistidina	
3.	ANTIOXIDANTES FISIOLÓGICOS.....	57- 78
3.1.	Concepto de antioxidante.....	57-59
3.2.	Antioxidantes enzimáticos.....	59-65
3.2.1.	Superóxido dismutasa.....	59-63
3.2.1.1.	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc	
3.2.1.2.	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso	
3.2.2.	Glutatión peroxidasa.....	63-64
3.2.3.	Catalasa.....	64-65

3.3.	Antioxidantes no enzimáticos.....	65-78
3.3.1.	Glutación.....	65-71
3.3.2.	Otros antioxidantes.....	71-78
3.3.2.1.	Vitamina C	
3.3.2.2.	Vitamina E	
3.3.2.3.	Carotenoides	
3.3.2.4.	Flavonoides	
4.	ESTRÓGENOS.....	79-113
4.1.	Propiedades químicas.....	79
4.2.	Biosíntesis.....	79-82
4.3.	Metabolismo del estradiol.....	83
4.4.	Acciones de los estrógenos.....	84
4.5.	Efectos metabólicos de los estrógenos.....	84-88
4.5.1.	Efectos de los estrógenos sobre los minerales.....	85-86
4.5.2.	Efectos de los estrógenos sobre los lípidos.....	86-87
4.5.3.	Efectos de los estrógenos sobre los carbohidratos.....	87
4.5.4.	Efectos de los estrógenos	

	sobre las proteínas.....	87-88
4.6.	Mecanismo de acción.....	88-99
	4.6.1. Receptores estrogénicos.....	89-99
	4.6.1.1. Receptores estrogénicos	
	nucleares.....	90-93
	4.6.1.2. Receptores estrogénicos	
	de membrana.....	93-99
	4.6.1.2.1. Efectos no-genómicos	
	mediados por el receptor de	
	estrógeno de membrana	
4.7.	La doble cara de los estrógenos: efectos	
	beneficiosos y perjudiciales.....	99-104
4.8.	SERMs- Moduladores Selectivos	
	del Receptor de estrógenos.....	104-112
4.9.	Conclusiones.....	112-113
5.	EL PROCESO DE	
	ENVEJECIMIENTO.....	114-130
5.1.	Concepto de envejecimiento.....	114-115
5.2.	Consecuencias del envejecimiento...	115-116
5.3.	Longevidad.....	116-117

5.4.	Teorías del envejecimiento.....	117-129
5.4.1.	Teorías orgánicas.....	118-119
5.4.1.1.	Teoría inmunológica	
5.4.1.2.	Teoría neuroendocrina	
5.4.2.	Teorías celulares.....	119-120
5.4.2.1.	Teoría del límite de la duplicación celular	
5.4.3.	Teorías del envejecimiento programado.....	121
5.4.3.1.	Programa genético del envejecimiento	
5.4.4.	Teorías evolutivas.....	121-122
5.4.5.	Teorías moleculares.....	122-129
5.4.5.1.	Teoría de la acumulación de productos de desecho	
5.4.5.2.	Teoría de los entrecruzamientos	
5.4.5.3.	Teoría de las mutaciones somáticas y teoría de los errores catastróficos	
5.4.5.4.	Teoría de los radicales libres	

5.5. Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento.....	129-130
6. ENVEJECIMIENTO Y GÉNERO.....	131-134
II. OBJETIVOS.....	135-138
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	139-206
1. MATERIALES.....	141-145
1.1. Animales de experimentación.....	141
1.1.1. Sacrificio de los animales.....	141
1.2. Aparatos.....	142-144
1.3. Reactivos.....	144-145
2. MÉTODOS.....	145-206
2.1. Aislamiento de mitocondrias.....	145-150
2.1.1. Mitocondrias hepáticas.....	145-147

2.1.2. Mitochondrias de cerebro:	
sinápticas y no sinápticas.....	147-150
2.2. Citometría de flujo.....	151-152
2.2.1. Características de la citometría	
de flujo.....	151
2.2.2. Funcionamiento de un citómetro	
de flujo.....	151-152
2.3. Determinación del tamaño y complejidad	
mitocondrial por citometría de flujo.....	153
2.3.1. Tamaño mitocondrial.....	153
2.3.2. Complejidad mitocondrial.....	153
2.4. Determinación de la tasa de producción	
mitocondrial de peróxido de	
hidrógeno.....	153-158
2.5. Determinación de los niveles de	
GSH mitocondrial.....	158-159
2.6. Determinación de la concentración	
de proteínas.....	160-161
2.7. Aislamiento de DNA mitocondrial	
de hígado de rata.....	161-164
2.8. Determinación del daño oxidativo	

al DNAm.....	164-166
2.9. Determinación de la actividad	
superóxido dismutasa.....	167-169
2.10. Determinación de la actividad	
glutación peroxidasa.....	170-172
2.11. Aislamiento de RNA	
a partir de tejido.....	172-175
2.12. RT-PCR.....	175-178
2.12.1. Fundamento.....	175-177
2.12.2. Sondas.....	178
2.12.3. Condiciones de amplificación.....	178-179
2.13. RT-PCR Semicuantitativa.....	180-182
2.14. RT-PCR Cuantitativa.....	182-188
2.15. Determinación cuantitativa de la	
actividad telomerasa.....	188-195
2.16. Cultivos celulares.....	196-204
2.17. Determinación de los niveles de	
peróxido de hidrógeno en	
células MCF-7.....	204-206
2.18. Análisis estadístico de los resultados.....	206

IV.	RESULTADOS.....	207-251
1.	CURVA DE SUPERVIVENCIA DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS.....	209-211
2.	TAMAÑO Y COMPLEJIDAD DE MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO Y CEREBRO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS.....	211-216
3.	CONSUMO DE OXÍGENO POR MITOCONDRIAS HEPÁTICAS AISLADAS DE MACHOS Y HEMBRAS.....	216-218
4.	TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS.....	219-221
5.	TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS CEREBRALES DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS.....	222-225
6.	TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO	

	DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATONES MACHOS Y HEMBRAS.....	226-227
7.	NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE MACHOS Y HEMBRAS.....	228-229
8.	NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN HOMOGENADOS HEPÁTICOS DE MACHOS Y HEMBRAS.....	230
9.	DAÑO OXIDATIVO AL DNA MITOCONDRIAL DE HÍGADO DE MACHOS Y HEMBRAS.....	231-232
10.	EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN HÍGADO DE MACHOS Y HEMBRAS.....	233-235
11.	EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MANGANESO SUPERÓXIDO DISMUTASA EN HÍGADO DE MACHOS Y HEMBRAS.....	236-238
12.	EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE	

- ENVEJECIMIENTO 16S rRNA EN HÍGADO
DE MACHOS Y HEMBRAS..... 239-240
13. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA
TELOMERASA EN HÍGADO DE MACHOS Y
HEMBRAS..... 241-242
14. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE
ESTRADIOL EN LOS NIVELES DE
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN
CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA
MAMARIA (MCF-7)..... 243-244
15. DEPENDENCIA DEL TIEMPO EN EL
EFECTO DEL ESTRADIOL EN LOS
NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO
EN CÉLULAS TUMORALES DE
GLÁNDULA MAMARIA (MCF-7)..... 245
16. EFECTO DEL ESTRADIOL A BAJAS
CONCENTRACIONES EN LOS NIVELES DE
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN
CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA

	MAMARIA (MCF-7) INCUBADAS DURANTE 48H.....	246-247
17.	PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL...	248-249
18.	EFECTO ANTIOXIDANTE DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA. PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS.....	250-251
V.	DISCUSIÓN.....	252-275
1.	LONGEVIDAD Y SEXO.....	254-257
2.	TEORÍA DEL ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES. IMPORTANCIA EN LA LONGEVIDAD.....	258-260
3.	PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES. IMPORTANCIA EN LA LONGEVIDAD MEDIA Y MÁXIMA.....	261-263
4.	EL PAPEL ANTIOXIDANTE DE	

LOS ESTRÓGENOS.....	264-267
5. PARÁMETROS BIOLÓGICOS DE ENVEJECIMIENTO.....	268-269
6. TELOMERASA. SU FUNCIÓN MÁS ALLÁ DE LA ELONGACIÓN DE LOS TELÓMEROS.....	270-272
7. FITOESTRÓGENOS. IMPORTANCIA EN LA LONGEVIDAD.....	273-275
VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION.....	276-295
1. DIFFERENT LIFE EXPECTANCY BETWEEN MALES AND FEMALES OF VARIOUS SPECIES.....	278-279
2. OXIDANT PRODUCTION BY MITOCHONDRIA FROM MALES AND FEMALES.....	280
3. MITOCHONDRIA FROM POST-MITOTIC TISSUES PRODUCE MORE HYDROGEN	

PEROXIDES THAN THOSE FROM MITOTIC TISSUES.....	281-282
4. MITOCHONDRIAL GSH, BUT NOT TOTAL CELLULAR GLUTATHIONE IS HIGHER IN FEMALES THAN IN MALES.....	283-284
5. MITOCHONDRIAL DNA OXIDATIVE DAMAGE IS MUCH HIGHER IN MALES THAN IN FEMALES.....	285-286
6. ESTRADIOL INCREASES THE EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT, LONGEVITY GENES.....	287-290
7. BIOLOGICAL MARKERS OF AGEING INDICATE THAT FEMALES ARE YOUNGER THAN MALES OF THE SAME CHRONOLOGICAL AGE.....	291-292
8. TELOMERASE. ITS FUNCTION BEYOND THE TELOMERE ELONGATION.....	293-294
9. CONCLUDING REMARKS.....	295

VII.	CONCLUSIONES.....	296-299
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	300-346

ÍNDICE FIGURAS

ÍNDICE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura I. 1.- Estructura electrónica del oxígeno molecular.....	7
Figura I. 2.- Estados excitados del oxígeno molecular.....	8
Figura I. 3.- Estructura electrónica del oxígeno molecular.....	18
Figura I. 4.- Representación de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	22
Figura I. 5.- Control respiratorio mitocondrial.....	24
Figura I. 6.- Reacciones de Fenton y de Haber-Weiss.....	29
Figura I. 7.- Sistema hipoxantina/xantina oxidasa.....	30
Figura I. 8.- Cascadas de señalización activadas por ROS.....	35
Figura I. 9.- Cascadas de señalización más importantes activadas por ROS.....	36
Figura I. 10.- Mecanismo de peroxidación lipídica.....	41
Figura I. 11.- Estructura química del GSH: γ -glutamil cistein glicina	66
Figura I. 12.- Ciclo del γ -glutamilo.....	68
Figura I. 13.- Ciclo redox del glutati3n.....	71
Figura I. 14.- Estructura de la vitamina C: 3cido asc3rbico.....	72
Figura I. 15.- Estructura qu3mica de la vitamina E: tocoferol.....	74

Figura I. 16.- Ruta biosintética de los estrógenos.....82

Figura I. 17.- Distribución de receptores estrogénicos.....89

Figura I. 18.- Activación génica por los dímeros de receptor de estrógenos.....91

Figura I. 19.- Efectos “no genómicos” del receptor de estrógeno de membrana.....95

Figura I. 20.- Receptor de estrógeno de membrana en células MCF796

Figura I. 21.- Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos.....102

Figura I. 22.- Mecanismo de acción del Tamoxifeno107

Figura I. 23.- Similitud entre las estructuras del 17β -estradiol y la genisteína.....110

Figura I. 24.- Número de mujeres y de hombres según su edad a partir de los 55 años en España.....111

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura III. 1.- Imagen de los productos de amplificación obtenidos en función del nº de ciclos de amplificación180

Figura III. 2.- Curvas de amplificación obtenidas mediante PCR en tiempo real.....183

Figura III. 3.- Curvas de amplificación tras trnasformar el eje de ordenadas en logarítmico.....184

Figura III. 4.- Fundamento del kit Telo TAGGG Telomerase PCR
 ELISA^{PLUS}.....190

Figura III. 5.- Expresión de receptores estrogénicos en células
 tumorales de glándula mamaria MCF-7.....197

IV. RESULTADOS

Figura IV. 1.- Curva de supervivencia de ratas macho y hembra
209

Figura IV. 2.- Imagen representativa de la población mitocondrial
 hepática212

Figura IV. 3.- Imagen representativa del tamaño de las mitocondrias
 aisladas de hígado de machos y de hembras.....214

Figura IV. 4.- Imagen representativa de la complejidad de las
 mitocondrias aisladas de hígado de machos y de
 hembras.....216

Figura IV. 5.- Consumo de oxígeno mitocondrial en estado IV de
 mitocondrias hepáticas de machos y de hembras
 suministrando sustratos que donan sus electrones al
 complejo II (A: succinato) o al complejo I (B:
 piruvato-malato) de la cadena de transporte
 electrónico mitocondrial.....218

Figura IV. 6.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en
 mitocondrias hepáticas de machos y hembras,
 suministrando donantes de electrones del complejo II
 (A) Succinato y del complejo I (B) Piruvato-malato de
 la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....220

Figura IV. 7A.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias cerebrales no sinápticas suministrando piruvato-malato a la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	223
Figura IV. 7B.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias cerebrales sinápticas suministrando succinato a la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	224
Figura IV. 8.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos y hembras jóvenes.....	227
Figura IV. 9.- Niveles de GSH en mitocondrias hepáticas de machos y hembras.....	229
Figura IV. 10.- Niveles de GSH en homogenados hepáticos de machos y hembras.....	230
Figura IV. 11.- Daño oxidativo al DNA mitocondrial de hígado.....	232
Figura IV. 12.- Expresión (A) y actividad (B) de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa en hígado de machos y de hembras.....	234-235
Figura IV. 13.- Expresión (A) y actividad (B) de la enzima antioxidante Mn-superóxido dismutasa en hígado de machos y de hembras.....	237-238
Figura IV. 14.- Expresión de la subunidad 16S rRNA mitocondrial en hígado de machos y de hembras.....	240
Figura IV. 15.- Actividad enzimática de la telomerasa en hígado de machos y de hembras.....	242

Figura IV. 16.- Efecto de la concentración de estradiol en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria MCF-7.....	244
Figura IV. 17.- Dependencia del tiempo en el efecto del estradiol en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria MCF-7.....	245
Figura IV. 18.- Efecto del estradiol a bajas concentraciones en los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 incubadas durante 48 h.....	247
Figura IV. 19.- Efecto del estradiol y el tamoxifeno en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7).....	249
Figura IV. 20.- Efecto del fitoestrógeno genisteína y del tamoxifeno en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria MCF-7.....	251

V. DISCUSIÓN

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Figure VI. 1.- Survival curve of Wistar rats.....	279
Figure VI. 2.- Oxidant production by hepatic mitochondria from males and females.....	280
Figure VI. 3.- Oxidant production by non-synaptic and synaptic mitochondria.....	282
Figure VI. 4.- Higher rate of hydrogen peroxide production in synaptic mt than in hepatic mt.....	282

Figure VI. 5.- Glutathione levels by hepatic mitochondria from males and females.....284

Figure VI. 6.- Mitochondrial DNA damage in liver from males and females.....285

Figure VI. 7.- Hydrogen peroxide levels in mammary gland tumour cells (MCF-7) treated with estradiol and /or tamoxifen.....288

Figure VI. 8.- Expression and activity of Glutathione peroxidase and Mn-Superoxide dismutase in liver from male and female rats.....290

Figure VI. 9.- Expression of the biological marker 16S rRNA in liver from male and female rats.....292

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE TABLAS

ÍNDICE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla I. 1.- Vida media de distintos radicales libres celulares.....	3
Tabla I. 2.- Papel de los radicales librs en el origen y evolución de la vida.....	4
Tabla I. 3.- Especies activadas de oxígeno y nitrógeno.....	9
Tabla I. 4.- Concentración de radicales libres en estado estacionario.....	20
Tabla I. 5.- Sistemas más importantes que catalizan la oxidación de proteínas.....	43
Tabla I. 6.- Tipos de superóxido dismutasa y localización celular mayoritaria.....	60
Tabla I. 7.- Diferentes localizaciones celulares de la Cu-Zn SOD.....	62
Tabla I. 8.- Resumen de algunas acciones antioxidantes de los fitoestrógenos existentes en la blibliografía.....	111

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III. 1.- Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.....	157
---	-----

Tabla III. 2.- Efecto de estrógenos y fitoestrógenos en
GSH/GSSG, GPx, GCS, GST, Mn-SOD en células
MCF-7.....198-199

IV. RESULTADOS

Tabla IV. 1.- Tamaño de mitocondrias aisladas de hígado y de
cerebro de ratas machos y hembras213

Tabla IV. 2.- Estructura o complejidad de mitocondrias aisladas de
hígado de ratas machos y hembras.....215

V. DISCUSIÓN

Tabla V. 1.- Esperanza de vida en la población española durante el
siglo XX.....255

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Table VI. 1.- Life expectancy in Spain between 1900-2020.....278

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

¹O₂: Oxígeno singlete.

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato.

BSA: Suero bovino albúmina

Cu,Zn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.

DES: Dietilestilbestrol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido ácido

E2: 17β-estradiol

EDTA: Ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetracético.

EGTA: Etileno glicol-bis (aminoetil eter)- N,N,N',N'- ácido tetracético.

ERE: Elementos de reacción a estrógenos (*Estrogen Responsive Elements*)

Erk1/2^{MAPK}: Kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2. etanosulfónico).

FAD: Flavín adenín dinocluótido.

FSH: Hormona estimulante del folículo

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfatodeshidrogenasa

GCS: γ-glutamilmisteína sintetasa

GGT: γ-Glutamil-transpeptidasa.

GNRH: Hormona liberadora de gonadotropina

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

GSSG: Glutación oxidado.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCl: Ácido clorhídrico

HEPES: N-(2-hidroxi-etil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HSP90: Heat shock protein 90

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico.

IL-2: Interleukina 2

JNK^{MAPK}: c-Jun NH₂-Terminal Kinasa.

KOH: Hidróxido potásico.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LH: Hormona luteinizante

MAPK: Proteín kinasas activadas por mitógenos.

MDA: Malondialdehido

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

MOPS: Ácido propano sulfónico.

NAD: Nictotinamida adenín dinucleótido

NADH: Nicotiamida adenín dinucleótido

NADPH: Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato

NF-κB: Factor Nuclear kappa B.

NO•: Óxido nítrico.

NO₂Cl: Cloro nitrilo.

NOS: Óxido nítrico sintasa (e-NOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal)

O₂^{•-}: Anión superóxido.

OH•: Radical hidroxilo.

ONOO-: Peroxinitrito.

Oxo8dG: 8-hidroxi-2'desoxi guanosina

p38^{MAPK}: Proteín kinasa activada por estrés.

PBS: Fosfato tampón salino.

PCA: Ácido perclórico

RE: Receptor de estrógenos

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

ROO•: Radical peroxilo.

ROS: Especies reactivas del oxígeno

RT-PCR: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS: Dodecil sulfato sódico

SERM: Modulador de los receptores de estrógenos

SOD: Superóxido dismutasa

TBARS: Especies reactivas del tiobarbitúrico

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

TSH: Terapia de sustitución hormonal

UI: Unidades internacionales.

UV: Ultravioleta

El envejecimiento es un proceso que tiene importantes connotaciones socioeconómicas, psicológicas, morfológicas, celulares y moleculares, siendo por tanto difícil dar una definición precisa del fenómeno en conjunto. Desde un punto de vista biológico, podemos caracterizar la senescencia como la progresiva incapacidad de mantener la constancia del medio interno frente a las notables variaciones ambientales.

El envejecimiento de la población está adquiriendo en los últimos años una especial atención social por diversas razones:

Por un lado, el elevado porcentaje de personas mayores de 65 años y el aumento espectacular de individuos que superan los 80 años en países desarrollados. Ambos grupos conjuntamente representarán en un futuro próximo el 20% de la población mundial.

Por otro lado, la calidad de vida del citado colectivo, pues si bien se ha ganado en expectativa de vida gracias a los avances en los campos de la medicina y la nutrición, ha aumentado la incidencia de enfermedades crónicas como Alzheimer, Parkinson, diabetes o cáncer, todas ellas relacionadas con la edad.

El afán por encontrar la causa y el remedio contra el envejecimiento ha proporcionado una gran cantidad de teorías. Entre las cerca de 300 catalogadas, una de las más aceptadas actualmente es la teoría del estrés oxidativo donde la mitocondria ocupa un papel primordial por ser uno de los orgánulos más afectados durante el proceso de envejecimiento, siendo los efectos deletéreos causados por las especies reactivas del oxígeno (procedentes principalmente de

la mitocondria) los responsables del deterioro funcional asociado a la senescencia.

La evidencia experimental producida en los últimos años de investigación indica que los oxidantes son determinantes en el envejecimiento de las especies.

I. INTRODUCCIÓN

1. RADICALES LIBRES

1.1. Concepto de radical libre

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia. La presencia de electrones desapareados hace que los radicales libres sean muy reactivos. Debido a su gran reactividad, se caracterizan por tener una vida media del orden de milisegundos, aunque varía según el tipo de radical libre (Simic y cols., 1988). La Tabla I. 1 resume algunos ejemplos de vida media de radicales libres.

Radical	Sustrato	Concentración	Vida media (37°C)
$\text{OH}\cdot$	LH	1 M	▪ 10^{-9} segundos
$\text{RO}\cdot$	LH	100 mM	▪ 10^{-6} segundos
$\text{ROO}\cdot$	LH	1 mM	▪ 7 segundos
$\text{L}\cdot$	O_2	20 μM	▪ 10^{-8} segundos
$\text{Q}\cdot^-$	-		▪ Días

Tabla I. 1.- Vida media de distintos radicales libres celulares.

En la naturaleza los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS).

Antigüedad en años	Principales acontecimientos
3500 millones	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formación de la química básica de la vida por reacciones de radicales libres originadas esencialmente por radiación ionizante del sol. ▪ Origen de la vida, se desarrollan los procesos de reparación por escisión y recombinación. ▪ Aparece la ferredoxina: $RH \text{ ó } H_2S + CO_2 \text{ ----> (hg)---->CH}$
2600 millones	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Surgen las algas verdes $2 H_2O \text{ ----> (hg)---->4 H + O}_2$
1300 millones	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El oxígeno atmosférico alcanza el 1% del valor actual. ▪ Desaparecen los procariotas anaerobios y los eucariotes se transforman en las células dominantes. ▪ Los eucariotas más las algas verdes dan origen a las plantas de hojas verdes. ▪ Los eucariotas más un procariota con capacidad de reducir el O₂ a H₂O generan el reino animal. ▪ Aparecen los organismos multicelulares y las plantas. ▪ Se desarrolla la meiosis.
500 millones	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El oxígeno atmosférico alcanza el 10% de su valor actual. Se constituye la barrera de ozono que permite a las especies salir del mar e invadir la tierra.
65 millones	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aparecen los primates
5 millones	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aparece el humano

Tabla I. 2.- Papel de los radicales libres en el origen y evolución de la vida (Harman, 2001).

Las reacciones por radicales libres son abundantes en los sistemas vivos. Una explicación razonable sobre la presencia de esta clase de reacciones químicas surge de los estudios sobre el origen y evolución de la vida (Harman, 2001) (ver Tabla I. 2)

Parece ser que la vida se originó espontáneamente hace 3.500 millones de años a partir de los aminoácidos, nucleótidos y otras sustancias químicas básicas. Estas moléculas fueron el producto de componentes simples reducidos de la atmósfera primitiva, sometidos a reacciones por radicales libres, iniciadas esencialmente por la intensa radiación ionizante del sol.

Debido a que los organismos se desarrollan en presencia de oxígeno, están expuestos a la generación de ROS. Éstos son responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas (Sies y cols., 1983; Halliwell y cols., 1989; Halliwell y cols., 1996). Así pues, participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, como algunos cánceres, diabetes (Takada y cols., 1982; Okamoto y cols., 1985), patologías cardiovasculares (Byers, 1993), procesos reumáticos (Wolf y cols., 1986), patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares (Slade y cols., 1993) o procesos neurodegenerativos.

También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Pacifi y cols., 1991), el daño causado por el ejercicio físico agotador (Davies y cols., 1982; Sastre y cols., 1992; Helain y cols., 1993) y otros. El papel de los radicales libres en el envejecimiento será ampliamente desarrollado en la presente tesis por su relación directa con el tema de la misma.

Asimismo, existen también radicales libres nitrogenados o especies reactivas de nitrógeno (RNS), cuya importancia ha crecido considerablemente en los últimos tiempos.

1.2. El oxígeno

Como hemos señalado en la sección anterior, la mayoría de los radicales libres derivan del oxígeno, por ello dedicaremos esta sección a detallar algunas de sus propiedades.

En la naturaleza, el oxígeno como tal aparece mayoritariamente en forma molecular o diatómica (O_2). El oxígeno molecular contiene 16 electrones, distribuidos en los orbitales moleculares como se indica en la Figura I. 1. En total tiene 10 electrones enlazantes y 6 electrones antienlazantes (Whitten y cols., 1992) de acuerdo con la Teoría del Orbital Molecular (TOM), la cual sostiene que cuando dos átomos se enlazan combinan sus orbitales electrónicos, dando lugar a dos orbitales moleculares. Uno de ellos es el orbital molecular enlazante, que se caracteriza por tener una energía inferior a aquéllos de los que proviene, y el otro es el denominado orbital molecular antienlazante, cuya energía es superior a la de los orbitales atómicos originales. Los electrones que forman los orbitales π antienlazantes (π^*) poseen espines paralelos, que es la estructura electrónica termodinámicamente más estable.

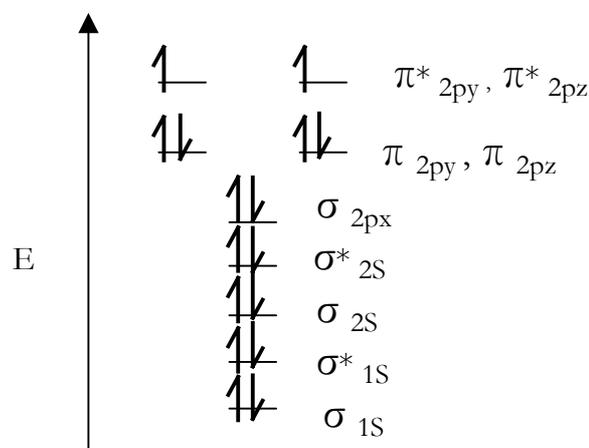


Figura I. 1.- Estructura electrónica del oxígeno molecular.

La molécula de oxígeno en estado basal tiene dos electrones desapareados en dos orbitales diferentes. Por ello, algunos autores le consideran una especie radicalaria. Esta estructura electrónica le capacita para reaccionar eficazmente con radicales libres, pero su velocidad de reacción con especies no radicalarias suele ser baja (Cheeseman y Slater, 1993).

La Figura I. 1 representa el estado basal del oxígeno molecular, que recibe el nombre de triplete, puesto que contiene electrones desapareados con espines paralelos. Esta molécula puede presentarse además con otras configuraciones electrónicas en sus últimos orbitales antienlazantes, según la disposición de los dos electrones que contienen. Una de ellas es la del oxígeno singlete (1O_2), que es una forma excitada del oxígeno en la que los dos electrones desapareados se configuran con espines opuestos. Esta molécula puede aparecer con dos configuraciones en estado excitado (ver Figura I. 2). Sólo una de ellas, la configuración a), posee una vida

media lo bastante larga como para poder participar en reacciones químicas, ya que la configuración b) pierde rápidamente su excitación emitiendo radiación electromagnética (Cotton y cols., 1987).



Figura I. 2.- Estados excitados del O₂.

El oxígeno diatómico es una forma muy abundante en la naturaleza debido a que es una molécula estable. Sin embargo, existe un gran número de especies derivadas del oxígeno que, o bien son muy reactivas, o bien son capaces de dar lugar a especies reactivas (ver Tabla I. 3). Algunas de estas especies son auténticos radicales libres derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo. Otras como el peróxido de hidrógeno, no son en realidad radicales.

Especie	Símbolo
Radical superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$
Radical hidropéroxido	$\text{HO}_2\cdot$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$
Radical alcóxido	$\text{RO}\cdot$
Radical peróxido	$\text{ROO}\cdot$
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$

Tabla I. 3.- Especies activadas de oxígeno y nitrógeno.

Tal y como veremos a continuación, las especies clave en la fisiopatología del oxígeno y de los radicales libres son el mismo oxígeno, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, los iones de metales de transición y el radical hidroxilo. Éste último es producto de formación de una multitud de reacciones en las que participan los cuatro primeros compuestos mencionados.

1.3. Clases de Radicales libres

Existe una gran cantidad de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del nitrógeno, los de mayor relevancia se resumen a continuación:

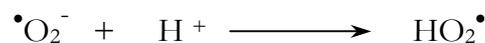
✦ Anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$)

El radical ión superóxido $\bullet\text{O}_2^-$ procede de la reducción univalente del oxígeno molecular. A diferencia de otros radicales libres, caracterizados por su gran reactividad, el ión superóxido sólo es capaz de reaccionar eficazmente con un grupo reducido de moléculas (Halliwell, 1996). Puede iniciar y propagar la oxidación por radicales libres de catecolaminas, tetrahidropterinas y otros compuestos relacionados. No ataca de manera significativa a lípidos poliinsaturados o al DNA (Fridovich, 1997). Sin embargo es muy importante en fisiopatología porque se genera en gran cantidad (Ames y cols., 1993), y sufre una conversión significativa hacia otras especies reactivas derivadas del oxígeno que son muy reactivas y dañinas, tales como el radical hidroxilo (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997).

El superóxido se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno, por ejemplo a través de una dismutación:



Por otro lado, el superóxido puede actuar como una base de Brønsted, captando un electrón y dando lugar al radical perhidroxilo o hidroperóxido ($\text{HO}_2\bullet$), mucho más reactivo que el $\bullet\text{O}_2^-$ (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997). No obstante, a pH fisiológico menos del 1% del superóxido estará en forma de hidroperóxido (Cheeseman y Slater, 1993):



Por otro lado, el ión superóxido se origina como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como las reacciones que implican a las deshidrogenasas flavoproteínicas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc.) (Behar y cols., 1979; Korycka-Dahi y cols., 1981), oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.). Otra fuente de origen son las reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña y cols., 1983) o la rivo flavina (Barton y cols., 1970).

Cabe destacar además como fuente generadora de anión superóxido la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se calcula que entre el 1 y el 2% de los electrones transportados por la cadena respiratoria mitocondrial en estado 4 no llega al complejo IV, sino que da lugar a $\bullet\text{O}_2^-$ y su producto de dismutación, H_2O_2 (Boveris y cols., 1972).

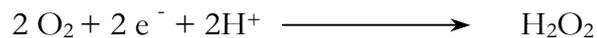
Se ha estimado que en una célula del cuerpo humano se producen del orden de 10^{10} moléculas de $\bullet\text{O}_2^-$ por día (Ames y cols., 1993).

✦ **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos reactiva de las especies reactivas de oxígeno. Su importancia recae en el hecho de que participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres. Además, atraviesa con suma facilidad las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción.

Se puede originar a partir de diversas fuentes:

- Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997).



- Por dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$ (Cheeseman y Slater, 1993; Frei, 1994)
- Como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) (Fridovich y cols., 1986).
- Por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahi y cols., 1981).

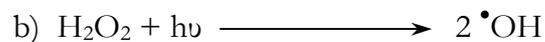
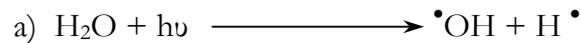
La detoxificación del peróxido de hidrógeno se lleva a cabo por acción de la catalasa (con formación de agua), un proceso que determina su vida media.

Por otro lado, parece que el H_2O_2 está implicado en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través del $\text{NF}\kappa\text{B}$ y AP-1. Ambos son factores de transcripción capaces de inducir la transcripción de genes tales como el de la manganeso-superóxido dismutasa (Yi MJ y cols, 2002), interleukina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos. (Schreck y Baeuerle, 1994).

✦ Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

Se obtiene cuando el oxígeno molecular es reducido por tres electrones. Es la especie derivada de oxígeno más reactiva y una de las especies químicas más reactivas que se conocen. Su vida media estimada es de alrededor de 10^{-9} s (Liochev y Fridovich, 1994), de modo que reacciona muy cerca de su lugar de formación con la mayoría de las biomoléculas (Cheeseman y Slater, 1993). Este radical se genera a través de procesos muy variados:

- Lisis del agua o del peróxido de hidrógeno por acción de las radiaciones ionizantes (Cheeseman y Slater, 1993; Breen y Murphy, 1995).



Así pues, puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal (a). La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo (b).

- Reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición (Sawyer, 1988; Frei, 1994)

El proceso más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada Reacción de Fenton en la que intervienen compuestos metálicos (Fenton, 1894):



- También puede generarse a partir de peróxido de hidrógeno y de radical superóxido, por la Reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1934):



Aunque la velocidad de esta reacción es demasiado baja para ser de importancia fisiológica, los metales de transición como el hierro o el cobre pueden actuar como catalizadores de la misma, acelerando la velocidad de la reacción (Halliwell y Gutteridge, 1989).

⊕ **Radical peroxilo (ROO[•])**

Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos por ejemplo lípidos, o ROOH por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga (segundos) (ver Tabla I. 1).

⊕ **Oxígeno singlete (¹O₂)**

Como hemos señalado en el apartado 1.2 de la presente tesis, el oxígeno singlete es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre como tal, pero al ser una forma excitada reacciona fácilmente con otras moléculas. Se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. También puede formarse en reacciones de oxidación de diversas especies o en el transcurso de algunas reacciones enzimáticas. Su vida media es alrededor de 10⁻⁶ segundos. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas.

✦ **Óxido nítrico (NO[•])**

El óxido nítrico ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como producto NO[•] en numerosos tipos celulares (Moncada y cols., 1991; Bush y cols. 1992). Dicha enzima presenta tres isoformas. La neuronal nNOS (tipo I) y la endotelial eNOS (tipo III) se expresan constitutivamente y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio (Bredt y cols. 1991; Lamas y cols. 1992). La inducible iNOS (tipo II) la expresan los macrófagos cuando son estimulados por citokinas, lipopolisacáridos u otras sustancias inmunológicas, siendo su expresión regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, en lo cual participan factores de transcripción sensibles al estado redox como el NF-κB o las MAPKinasas (MacMicking y cols. 1997).

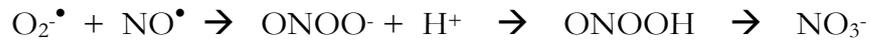
El óxido nítrico juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos. Entre ellos, actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neurotransmisor, siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa (Moncada y cols., 1986; Czapski y Goldstein, 1995).

Otro efecto del NO^\bullet reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del DNA, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.

El NO^\bullet posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble efecto Grisham y cols. (Grisham y cols. 1999) proponen que los efectos reguladores y antiinflamatorios del óxido nítrico ocurren cuando éste tiene efectos directos sobre una molécula biológica, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la producción de NO^\bullet es baja. Sin embargo, cuando las concentraciones de NO^\bullet aumentan, el NO^\bullet tiene efectos indirectos, a través de los metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación.

Así pues, un exceso de óxido nítrico es citotóxico. Parte de su citotoxicidad se cree que es debida al $^\bullet\text{O}_2$, con el que reacciona para dar lugar a anión peroxinitrito (ONOO^-), que no es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (Janssen y cols., 1993; Lipton y cols., 1993). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas e interferir con la señalización celular por nitración de residuos de tirosina en proteínas.

El óxido nítrico genera anión peroxinitrito (ONOO^-) al reaccionar con el anión superóxido (Gryglewsi y cols. 1986; Miles y cols. 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



El peroxinitrito está en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles o tiéteres, capaz de nitrar residuos de tirosina, de nitrar y oxidar guanosina, de degradar carbohidratos, de iniciar peroxidación lipídica y de fragmentar ADN (Beckman y cols. 1994; Beckman y cols. 1996).

La producción de O_2^{\bullet} y NO^{\bullet} *in vivo* espaciotemporalmente es diferente, y se solapa escasamente, con lo que la producción de peroxinitrito ocurre siempre con exceso de uno o de otro (Grisham, Jourdeuil y cols. 1999). Algunos autores establecen que tanto las reacciones de oxidación como de nitración mediadas por el peroxinitrito están influenciadas en gran medida por el flujo de producción relativo de O_2^{\bullet} y NO^{\bullet} (Jourdeuil y cols. 2001). Dichos autores establecen que las más altas tasas de oxidación se producen con exceso de NO^{\bullet} , produciéndose la oxidación a través de del $\bullet\text{OH}$ y del $\bullet\text{NO}_2$ formados a partir del peroxinitrito. Sin embargo, la reacción del peroxinitrito con el CO_2 es la vía más importante por la que se descompone el peroxinitrito *in vivo* (Lymar y cols. 1995), formando al final N_2O_3 , que es un potente agente nitrante.

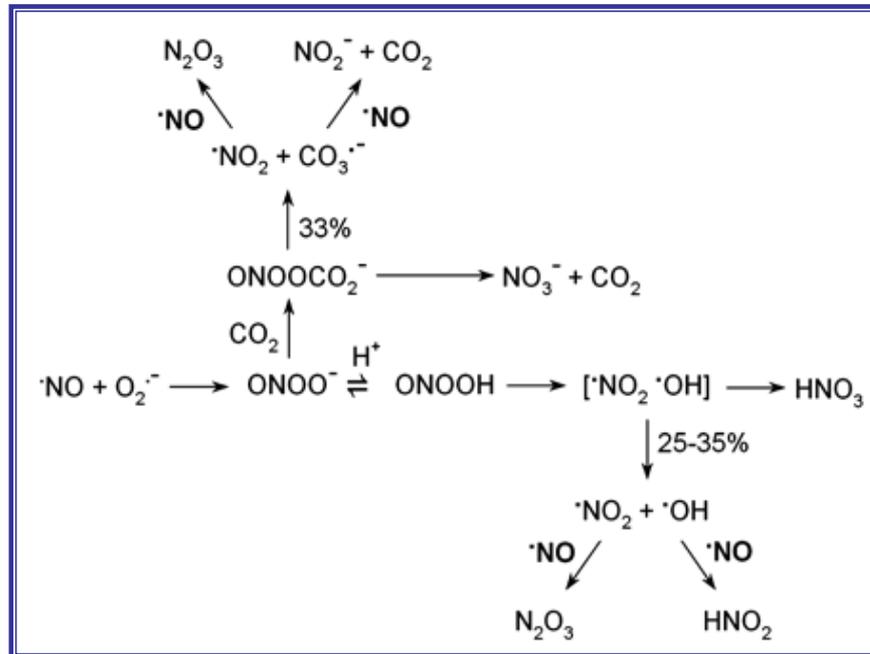


Figura I. 3.- Mecanismos de inhibición del peroxinitrito en situación de exceso de NO. (Adaptado de Jourdeuil, 2001).

Además de las reacciones de oxidación, el peroxinitrito tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina (Goldstein y cols. 2000). Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el •NO para formar 3-nitrotirosina. La nitración mediada por peroxinitrito in vivo podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de O₂^{•-}, debido a la competencia entre éste y el NO• por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de O₂^{•-} superara la de NO• (Goldstein y cols. 2000; Goldstein, Czapski y cols. 2000). Asimismo,

algunos autores han presentado la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de O_2^\bullet sin la consiguiente formación de H_2O_2 , lo cual supone un efecto detoxificante y antiinflamatorio (Granger y cols. 1996; Wink y cols. 1998).

✦ **Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet)**

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO^\bullet atmosférico (Postlethwait, 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Halliwell, 1994).

✦ **Radicales de átomos derivados de carbono (R^\bullet)**

Los radicales centrados en un átomo de carbono (R^\bullet) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno (H^\bullet) de un grupo metileno situado entre dos enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un radical peróxido (ROO^\bullet). A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones radicalarias y generar otras especies radicales (Frei, 1994).

✦ **Radicales de átomos derivados de azufre (RS^\bullet)**

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre (RS^\bullet) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo (Estrela y cols., 1983; Sparrow y Olszewki, 1993).

La Tabla I. 4. resume las concentraciones basales de diversos radicales libres presentes en hígado y en mitocondrias hepáticas.

Radical	Mitocondrias hepáticas	Hígado
$\cdot\text{O}_2^-$	0.1 nM	0.02 nM
H_2O_2	0.05 μM	0.1 μM
$\text{OH}\cdot$	0.06 aM	0.06 aM
$\text{R}\cdot$	6 aM	6 aM
$\text{ROO}\cdot$	2 nM	2 nM
$^1\text{O}_2$	0.1 fM	0.1 fM

Tabla I. 4.- Concentración de radicales libres en estado estacionario.

1.4. Génesis de radicales libres

Los radicales libres pueden ser de origen endógeno o exógeno (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994). Los descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena. Surgen como “accidentes químicos”, es decir, como reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas. Otras, se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O_2 y H_2O_2 (Halliwell, 1996).

El organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas. La dieta supone la ingesta de muchos compuestos de naturaleza prooxidante, como el humo del tabaco, la contaminación ambiental, el ozono, etc. (Ames, 1983).

1.4.1. Fuentes exógenas generadoras de radicales libres

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son las siguientes:

- Muchos agentes antineoplásicos (Deno y cols. 1982), tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshow y cols. 1982) que dependen de grupos quinoídes o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielsky y cols. 1977).
- Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, 1982).

1.4.2. Fuentes endógenas generadoras de radicales libres

1.4.2.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en interior de la célula (ver Figura I. 4).

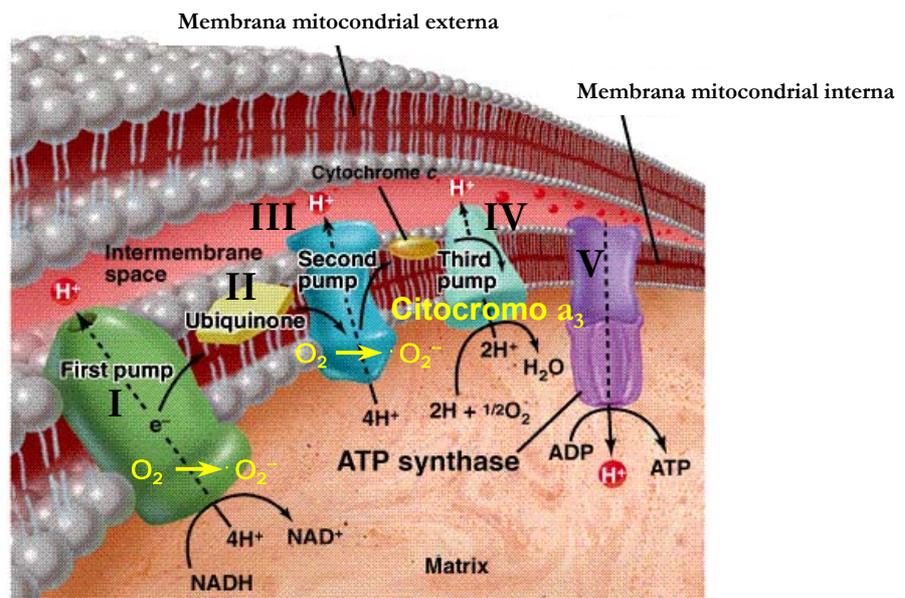


Figura I. 4.- Representación de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Se calcula que entre el 1 y el 2 % de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial

en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Boveris y cols., 1973; Cadenas y cols., 1977; Frei y cols., 1994). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital π antienlazante.

El citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O_2 y con ello la formación de H_2O (Benzi y Moretti, 1995). Por tanto, la citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa.

Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O_2 , pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi y Moretti, 1995).

Así pues, se produce $\bullet O_2^-$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris y cols., 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris y cols. 1975).

Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de $\bullet\text{O}_2^-$ por célula y por día (Ames y cols., 1993).

Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio.

Utilizando mitocondrias aisladas se puede determinar experimentalmente el consumo de oxígeno por la mitocondria, fenómeno denominado Control Respiratorio (ver Figura I. 5). En ausencia de sustrato o de ADP, el consumo de oxígeno causado por la oxidación de sustratos endógenos es bajo. Este estado respiratorio se define como estado 1. Añadiendo un sustrato oxidable, como glutamato o malato, este consumo aumenta levemente (estado 2).

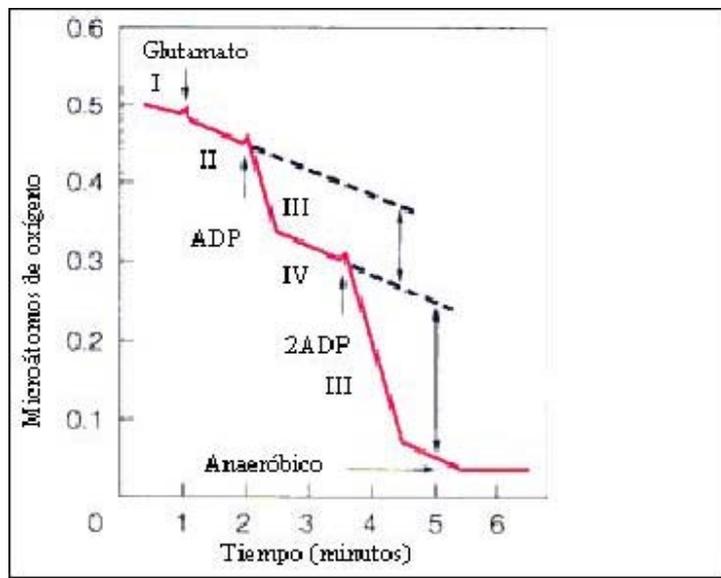


Figura I. 5.- Control Respiratorio Mitocondrial

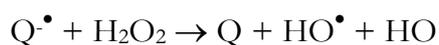
El estado 3 de la cadena de respiración mitocondrial se define como el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, es

decir, cuando tiene lugar transporte de electrones y síntesis de ATP. El estado 4 se alcanza cuando el ADP ha sido consumido, y el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte electrónico no puede ser empleado en sintetizar ATP. El mantenimiento del Control Respiratorio depende de la integridad de la membrana mitocondrial, si ésta recibe algún daño, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las mitocondrias que consumen la misma cantidad de oxígeno en estado 3 que en estado 4 están desacopladas (Rickwood y cols, 1987)

La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda energética, es decir, en condiciones cercanas al estado 4, en las cuales el cociente ATP/ADP es elevado. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de O₂ y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II, y III, con el consiguiente incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Así pues, el estado reducido de los elementos redox de los complejos I y III también contribuyen al aumento de la velocidad de generación de $\bullet\text{O}_2^-$ (Skulachev y cols., 1996). Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estadio intermedio entre el estado 3 y el estado 4 (Brand y Murphy, 1987), la generación de especies reactivas de oxígeno por los complejos I y III puede ser de gran importancia en el envejecimiento mitocondrial.

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir O₂ \bullet^- por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas y

cols, 1977). Sin embargo, consideraciones termodinámicas descartan un papel directo de la dismutación de la ubisemiquinona en la producción de este radical *in vivo*, porque el ciclo redox de la ubiquinona tiene lugar enteramente en la fase apolar de la membrana, y en tales condiciones la autooxidación de las quinonas se ve desfavorecida (Benzi y Moretti, 1995). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de HO• a partir de H₂O₂. Puesto que el peróxido de hidrógeno puede atravesar fácilmente las membranas biológicas puede entrar en contacto con la ubisemiquinona y producirse la reacción siguiente (Benzi y Moretti, 1995):



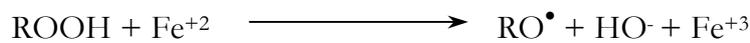
1.4.2.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss

Consiste en la reducción del H₂O₂ por iones de metales de transición. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H₂O₂) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición (sobre todo ion ferroso, Fe²⁺ y, en menor medida, el cuproso, Cu⁺ y otros iones) puede interactuar con ellos por medio de una reacción de oxirreducción: la reacción de Fenton-Haber-Weiss. Fenton descubrió a finales del siglo XIX (Fenton, 1894), que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezcla de peróxido de hidrógeno y Fe²⁺ (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quienes posteriormente dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el peróxido de hidrógeno se reduce formando radical hidroxilo y anión hidroxilo, y el metal

correspondiente se oxida por cesión de un electrón a la especie que se reduce (Haber y Weiss, 1932). Este proceso puede representarse según la siguiente reacción:

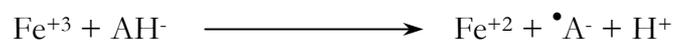


Y en general, para moléculas orgánicas:



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Sin embargo, el ion férrico puede a su vez, ser reducido por el ascorbato (Rawley y Halliwell, 1983; Sawyer, 1988) y por el radical superóxido (Frei, 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



El radical ascorbato ($\bullet\text{A}^-$) puede reducir a su vez diversos oxidantes, como el Fe^{+3} .

Las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, es decir la reducción del H_2O_2 catalizada por metales, pues resumirse tal y como se

muestra en la Figura I. 4. No obstante, no está del todo claro cómo los iones metálicos son capaces de actuar como catalizadores de las reacciones de oxidorreducción en sistemas biológicos. Los procesos de captación y distribución del hierro, y de los iones metálicos en general, están muy finamente regulados en los mamíferos. Contienen un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina...) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell, 1991; Rouault y Klausner, 1996). Así, la transferrina del plasma, proteína encargada del transporte de hierro, posee en condiciones normales una saturación del 20-30 % a pesar de su gran afinidad por el ión férrico, lo que supone que la cantidad de hierro libre en plasma humano es indetectable (Fontecave y Pierre, 1993). Se ha postulado varias teorías acerca de la participación de los compuestos metálicos en la reacción de Fenton y Haber-Weiss, como la posible existencia de un “pool” de hierro de bajo peso molecular unido al ATP, ADP o citrato (Fontecave y Pierre, 1991; Voogd y cols., 1994), o la posibilidad de que proteínas cuyo grupo prostético lo constituye el hierro, como la oxihemoglobina y el citocromo P₄₅₀, intervengan en reacciones de este tipo (Fontecave y Pierre, 1993).

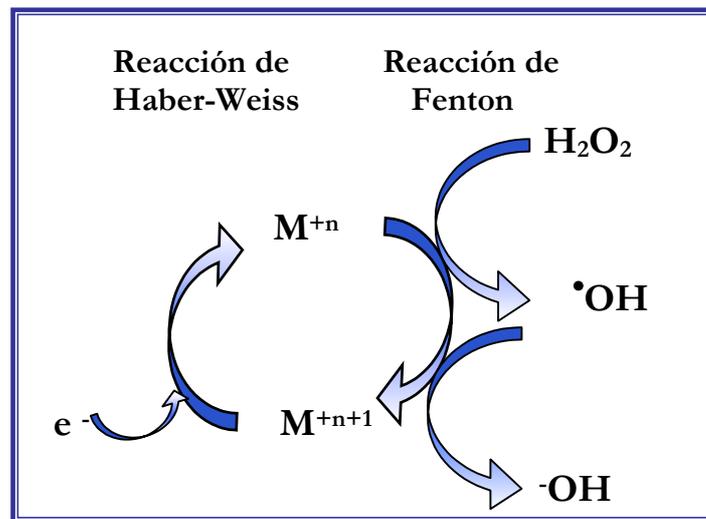


Figura I. 6.- Reacciones de Fenton y de Haber-Weiss

1.4.2.3. El sistema hipoxantina/xantina oxidasa

La xantina deshidrogenasa es una metaloflavoenzima compleja que participa en el metabolismo de las purinas, oxidando la hipoxantina a xantina y esta a ácido úrico (ver Figura I. 7a). En su forma deshidrogenasa no produce especies activadas de oxígeno, ya que emplea el NAD^+ como aceptor de electrones (Saugstad, 1990; Kinnula y cols, 1995), pero en condiciones de hipoxia (ver Figura I. 7b), por ejemplo en un proceso isquémico, la xantina deshidrogenasa sufre una conversión a xantina oxidasa, conversión que se debe a la acción de una proteasa activada con la hipoxia (Granger y cols, 1981). En su forma oxidasa, esta enzima emplea oxígeno molecular como aceptor de electrones (Radi y cols, 1992).

El sistema hipoxantina / xantina oxidasa desempeña un papel importante en medicina debido a que produce especies activadas de oxígeno. En hipoxia, la xantina deshidrogenasa, encargada de metabolizar la hipoxantina para dar xantina, pasa a xantina oxidasa y, como no hay oxígeno disponible, la hipoxantina se va acumulando sin poder ser oxidada. Al producirse la reoxigenación toda la hipoxantina acumulada se oxida a xantina y ácido úrico, con lo que se generan grandes cantidades de $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 (Granger y cols., 1981; Saugstad y cols., 1990) (ver Figura I. 7c).

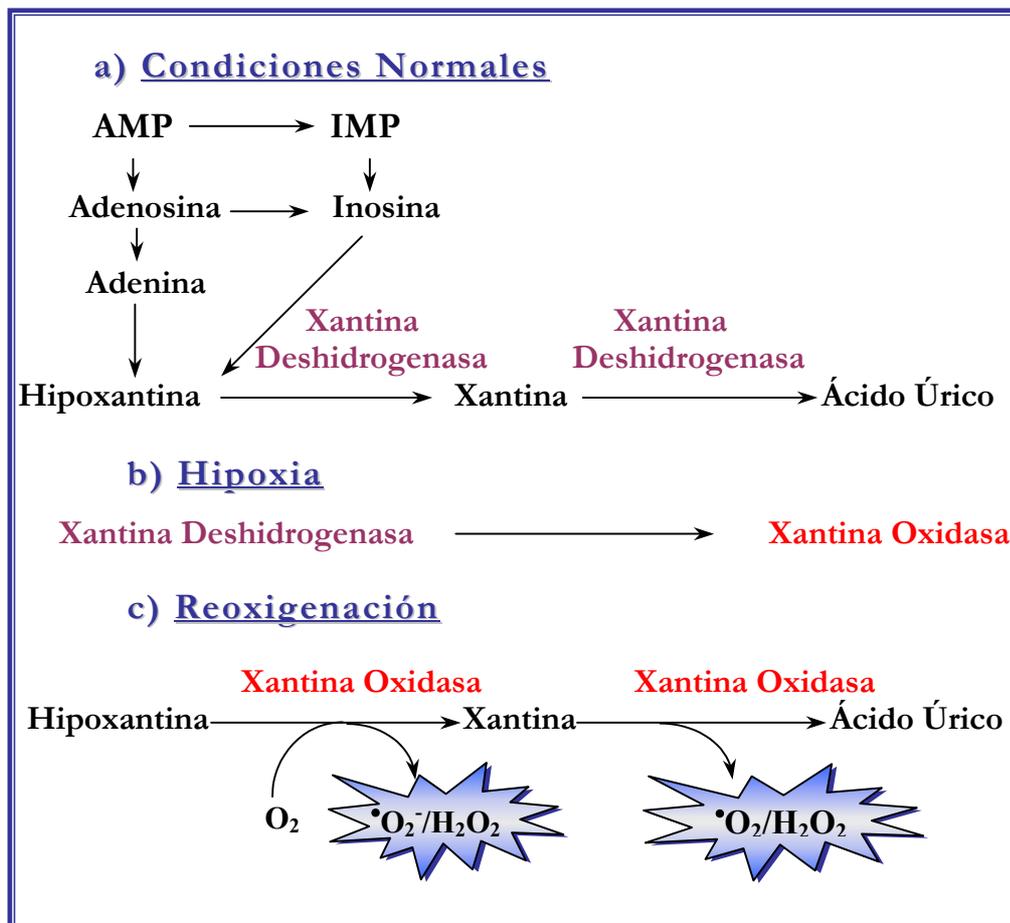


Figura I. 7.- Sistema hipoxantina / xantina oxidasa.

1.4.2.4. Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P₄₅₀ y b₅, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos. De hecho, los citocromos P₄₅₀ (término utilizado para designar a un amplio número de proteínas con grupos hemo muy numerosas en los seres vivos) son considerados como los más poderosos agentes oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas capaces de formar especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster y Estabrook, 1993).

1.4.2.5. Fagocitos activados

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 como mecanismo para combatir a los microorganismos (Babior, 1978).

1.4.2.6. Microsomas o peroxisomas

El término microsoma se aplicó a una fracción particulada que sedimentaba a 100000 g, antes de averiguar qué era dicha fracción. En la actualidad se conoce que esta fracción es en realidad un conjunto heterogéneo de vesículas membranosas (Philpot, 1991). Los microsomas, también denominados peroxisomas, poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y

la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris y cols., 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos. Por otro lado, el citocromo P₄₅₀ tiene un papel importante en los microsomas en la detoxificación de xenobióticos (Philpot, 1991).

1.4.2.7. Diversas enzimas

Las principales enzimas que contribuyen a la generación endógena de especies reactivas de oxígeno son:

- Enzimas citosólicas solubles como la aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa.
- Enzimas unidas a la membrana plasmática, como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa. Participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generando radicales libres durante su ciclo de catálisis (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994).

1.4.2.8. Oxidación de moléculas por el oxígeno

Muchas moléculas del cuerpo reaccionan directamente con el oxígeno, siendo el superóxido el principal radical formado (Halliwell, 1994). Algunas de estas moléculas son la dopamina, la adrenalina y los tetrahidrofolatos (Fridovich, 1986).

1.5. Radicales libres y señalización celular

A altas concentraciones, los radicales libres son perjudiciales, como veremos en capítulos posteriores, y producen alteraciones dañinas en las macromoléculas. Sin embargo, a concentraciones moderadas juegan un importante papel como reguladores en los procesos de comunicación y señalización intra e intercelular. Los numerosos mecanismos (físicos, químicos y biológicos) que generan estrés oxidativo en la célula, inducen la activación de multitud de mecanismos de defensa para sobrevivir al daño oxidativo que en ella se genera.

El estrés oxidativo induce la expresión de varias señales moleculares inespecíficas, que regulan respuestas a otros estreses, así como el crecimiento y metabolismo normales (Finkel y cols., 2000). Entre las vías de señalización que se activan ante el estrés oxidativo destaca la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), entre las que se encuentran la quinasa extracelular reguladora (ERK), la quinasa amino-terminal c-jun (JNK) y la quinasa p38. También interacciona con la vía de la fosfoinositol-3-quinasa (PI[3]K)/Akt, el factor nuclear-kappa B (NF-KB), p53 y HSF1 (“heat shock response”).

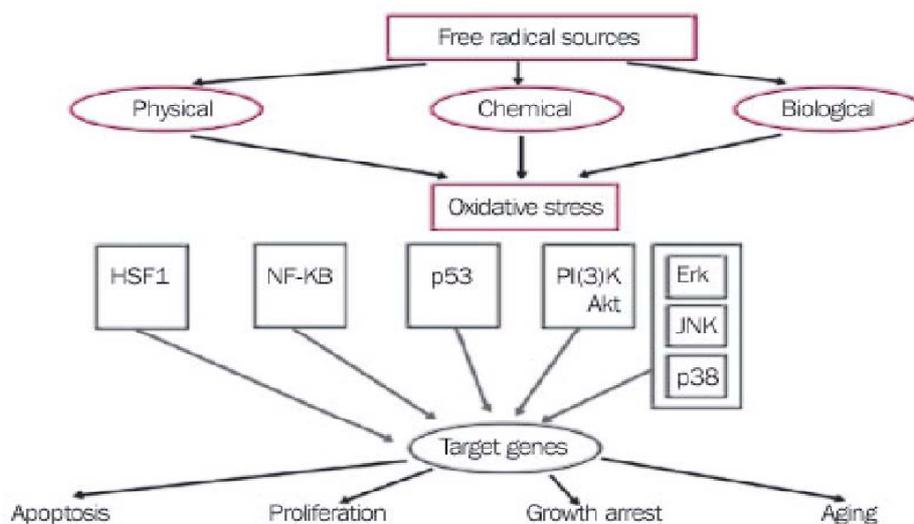
De hecho, en algunas situaciones la respuesta a radicales libres produce sobreestimulación de las vías normales de señalización por radicales libres. Aoki y cols. han publicado recientemente que el estrés oxidativo induce apoptosis en células endoteliales de aorta a través del descenso de los niveles de bcl-2 (un antiapoptótico), translocación de bax, y aumento de p53, probablemente a través de la activación de NF-KB (Aoki y cols., 2001).

En algunos tipos celulares, el aumento de p53 desencadena un aumento de estrés oxidativo, lo cual sugiere que existe una retroalimentación positiva entre ambos. Este mecanismo puede jugar un papel relevante en la respuesta apoptótica de las células (Johnson, 1996). Así mismo, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes induce la fosforilación, y con ello la activación, de muchos receptores de factores de crecimiento. Dicha activación es consistente con la emergente idea de que el peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones es mitogénico, es decir que estimula la proliferación celular (Burdon y cols., 1996). Otro aspecto que cabe destacar en este sentido es que se ha identificado un gran número de factores de transcripción y genes sensibles a estrés oxidativo, como la Mn-SOD, la catalasa, la glutatión reductasa, la tioredoxina, la glutaredoxina, la NADPH:ferrodoxin óxidoreductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, hemo oxigenasa-1 (HO-1), el transportador de cistina xc y otras (Hassan y cols. 1977; Yashpe-Purer y cols. 1977; Kuge y cols. 1994; Schnell y cols. 1992; Godon y cols. 1998; Nakamura y cols. 1994; Nakamura y cols. 1997; Ishii y cols. 1999; Sato y cols. 1999; Shull y cols. 1991).

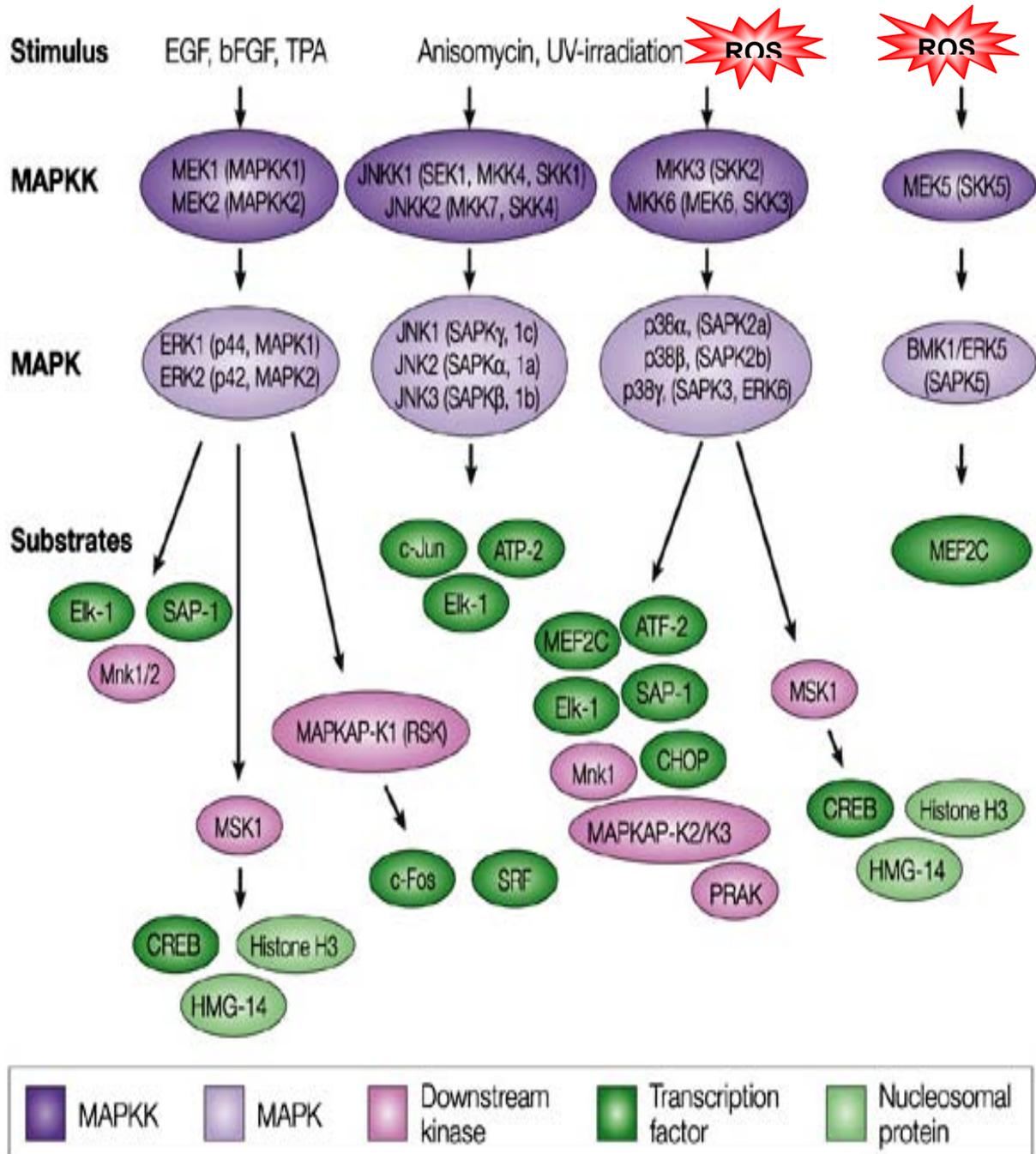
Varias vías activadas por estrés oxidativo disminuyen con el envejecimiento, como es el caso de la vía relacionada con las Hsp70 (“heat shock protein 70”). Existe evidencia de que niveles elevados de estas proteínas promueven la supervivencia de células sometidas a estrés, mientras que su disminución conlleva la muerte celular (Morimoto y cols., 1998). Sin embargo, otras “heat shock proteins” aumentan su expresión con el envejecimiento, lo cual se interpreta desde el punto de vista del desarrollo de mecanismos de defensa ante la acumulación durante los años de proteínas dañadas oxidativamente

(Lee y cols., 2000). Tanto los radicales libres como los antioxidantes influyen la expresión de genes y vías de transducción de señales, actuando como mensajeros subcelulares de ciertos factores de crecimiento. De hecho, en la última década ha habido crecimiento explosivo del conocimiento de genes relacionados con estrés oxidativo. En este sentido cabe destacar la revisión realizada por Allen y cols. sobre la respuesta de numerosos genes y proteínas ante la generación de ROS (Allen y cols., 2000). Por otro lado, subrayaremos la familia del NF-KB, puesto que es un factor de transcripción estrechamente relacionado con la regulación de muchos genes, incluyendo las proteínas de fase aguda, receptores de membrana y citoquinas. Ha sido demostrado que la activación de muchas respuestas antioxidantes está mediada, en parte, por este factor de transcripción. Éste ha sido relacionado con la activación transcripcional de la superóxido dismutasa y la gamma-glutamylcistein sintetasa (Allen y cols., 2000).

La Figura I. 8 es una representación esquemática de las cascadas de señalización activadas por ROS.



La Figura I. 9 muestra un esquema más desarrollado de las vías más importantes.



2. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1. Concepto de estrés oxidativo

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, 1996).

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas.

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

En estas circunstancias, para paliar el daño que los prooxidantes pueden causar en el organismo cuando están en exceso, está indicado

protegerlo incrementando su capacidad antioxidante. Uno de los modos en que se puede conseguir esto, consiste en la administración de antioxidantes bien como fármacos, bien como complemento dietético (Ames, 1983).

2.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

2.2.1. Daño oxidativo a lípidos

Los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres (Cheeseman y Slater, 1993). Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son el radical hidroxilo (HO^\bullet), el peróxido (ROO^\bullet), el alcóxido (RO^\bullet) y el alquílico (R^\bullet).

El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica (ver Figura I. 10a). Comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994; Halliwell, 1994). Esta reacción se produce significativamente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se estabilizan por resonancia con el doble enlace. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, R-COO^\bullet (ver Figura I. 10b). Los radicales peróxido pueden reaccionar a su vez con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes (ver Figura I. 10c), se forma un radical alquílico ($\text{R}'\text{-CH}^\bullet$) y un peróxido lipídico (R-COOH), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

Esta es una reacción en cadena, de modo que el ataque por un sólo radical libre da lugar a la formación de un gran número de especies activadas, lo cual desemboca en la oxidación de una gran cantidad de sustancias, sobre todo hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano y aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell, 1991; Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell, 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el DNA, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994).

Así pues, esos productos de degradación pueden difundir lejos de su lugar de producción y causar edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Asimismo, ellos pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos.

El malondialdehído, a su vez, puede reaccionar con lípidos y proteínas durante la peroxidación lipídica para formar bases de Schiff conjugadas, productos fluorescentes insolubles que se acumulan en el interior de los lisosomas, formando el pigmento de envejecimiento conocido con el nombre de lipofucsina (reconocido marcador morfológico de envejecimiento que se acumula en los tejidos con la edad) (Sohal y cols. 1989).

Existen varias técnicas experimentales para el estudio de la peroxidación lipídica:

1. Visualización de lipofucsina en los depósitos tisulares, especialmente en corazón y cerebro.

2. Cromatografía de gases de etano, pentano y otros alcanos exhalados por el aliento.
3. 4-hidroxinonenal (4-HNE).
4. Cuantificación de malondialdehído (MDA), el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un aducto MDA-TBA₂ susceptible de ser medido espectrofotométricamente y de analizarse por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El MDA es un producto final obtenido de la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos y está considerado como un buen marcador del daño oxidativo en las membranas biológicas (Wong y cols. 1987).
5. Medida de hidroperóxidos de fosfolípidos por detección quimioluminiscente postcolumna, tras separación mediante HPLC (Miyazawa y cols. 1994; Cadenas y cols. 1996).

La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman, 1985). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga y cols, 1994).

En ciertos tipos de células postmitóticas como miocitos cardíacos, células gliales y neuronas, la peroxidación lipídica conduce a la acumulación de “pigmentos del envejecimiento”, denominados en conjunto lipofucsina (Sohal y Brunk, 1989; Brunk y cols., 1992). Estos pigmentos son depósitos poliméricos insolubles de lípidos oxidados, proteínas y metales de transición que exhiben una fluorescencia característica (Miquel y cols., 1978; Vladimirov, 1986). En diversos tipos celulares se ha visto que los agentes prooxidantes

aceleran la acumulación de lipofucsina *in vitro*, y que los antioxidantes, como la vitamina E o el coenzima Q, la retrasan (Sahban y cols., 2002). Se ha propuesto la determinación de la lipofucsina como índice de estrés oxidativo y envejecimiento (Harman, 1978; Sohal y Brunk, 1989).

La cantidad de peróxidos lipídicos que llega a formarse en una membrana biológica está determinada por la cantidad de radicales libres que se originan inicialmente y por la propagación de la peroxidación lipídica. Ciertos componentes de la defensa antioxidante de las células restringen la extensión de esta reacción en cadena, siendo incluso en ocasiones capaces de detenerla completamente (Vladimirov, 1986).

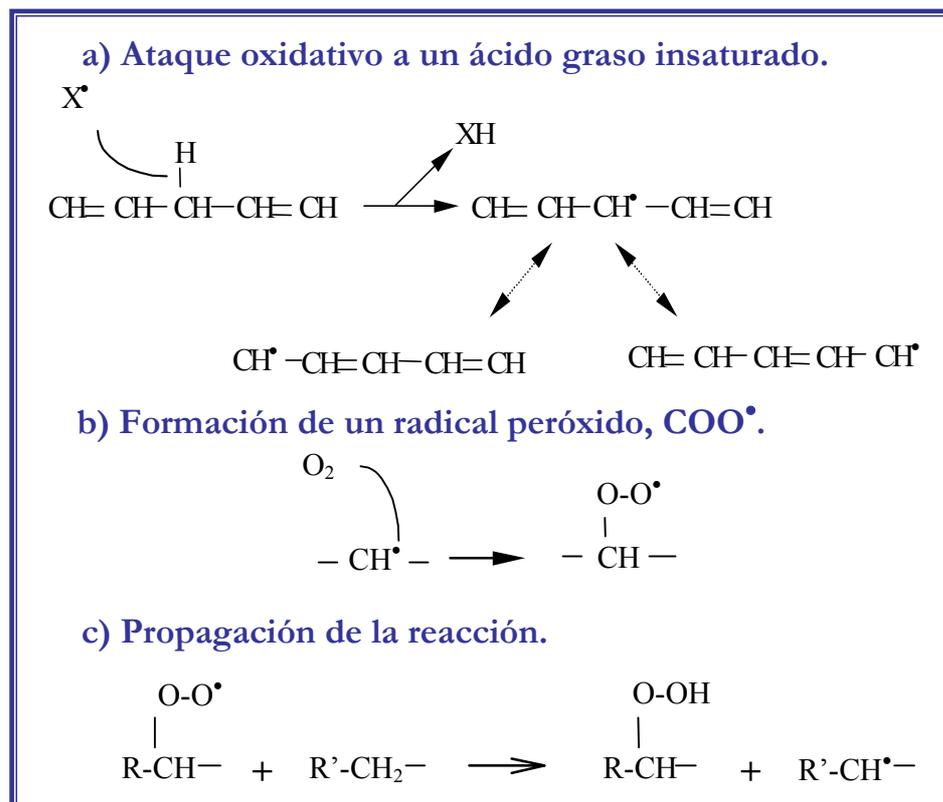


Figura I. 10.- Mecanismo de peroxidación lipídica.

2.2.2. Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles (sobre todo a nivel del grupo carbonilo) de ser atacados por los radicales libres (principalmente por el radical hidroxilo). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que presentan una mayor predisposición a ser oxidados (Davies, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

Según la concentración de oxígeno presente en el medio, en condiciones anaeróbicas los radicales libres promueven el entrecruzamiento entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan la fragmentación de la cadena peptídica (Stadman, 1992), con las consecuencias que ambos procesos suponen sobre el correcto funcionamiento de la proteína.

Otro mecanismo muy importante de modificación oxidativa de proteínas está mediado por los denominados "sistemas de oxidación de función mixta" o "sistemas de oxidación catalizada por metal", que poseen como dianas más comunes los residuos proteínicos que contienen arginina, histidina, lisina, prolina y cisteína (Stadman y cols., 1992). La Tabla I. 5 resume los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

Enzimáticos
NAD(P)H oxidasas/NAD(P)H/Fe(III)/O₂
Xantina oxidasa/Hipoxantina/Fe(III)/O₂
Citocromo P₄₅₀ reductasa/Citocromo P₄₅₀/NADPH/Fe(III)/O₂
Citocromo P₄₅₀ reductasa/redoxina/Citocromo P₄₅₀/NADH/Fe(III)/O₂
Nicotinato hidroxilasa/NADPH/Fe(III)/O₂
No Enzimáticos
Ascorbato/Fe(III)/O₂
RSH/Fe(III)/O₂
Fe(II)/O₂
Fe(II)/H₂O₂ (reactivo de Fenton)

Tabla I. 5.- Sistemas más importantes que catalizan la oxidación de proteínas.

Estos sistemas catalizan una serie de reacciones acopladas, enzimáticas o no, que implican la reducción del O₂ a H₂O₂ y del Fe³⁺ a Fe²⁺ (Amicci y cols., 1989; Fucci y cols., 1993). La producción de H₂O₂ y de Fe²⁺ es la única función que tienen en común los sistemas de oxidación catalizada de metal. Los sistemas más relevantes son diversas NADH y NADPH oxidasas, xantina oxidasa y citocromo P₄₅₀ reductasas (Stadtman y cols., 1992).

Un concepto importante en relación con el daño a proteínas producido por los sistemas de oxidación de función mixta es la especificidad de sitio del proceso (Dean y cols., 1993). El Fe²⁺ se une a uno o más sitios de la proteína y reacciona con H₂O₂, dando lugar a especies reactivas de oxígeno que reaccionan preferentemente con los grupos funcionales de los residuos de aminoácidos contiguos al lugar de unión del metal (Amicci y cols., 1989; Stadtman y cols.,

1992). De esta forma, los sistemas de oxidación de función mixta modifican sólo uno o pocos aminoácidos en una proteína dada (Stadtman y cols., 1992).

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman y cols., 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadtman y cols., 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean y cols., 1993).

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres, es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (Stadtman y cols., 1992), lo que se ve confirmado por las siguientes observaciones:

- Muchas proteasas comunes degradan proteínas oxidadas más oxidadas que las formas no oxidadas (Davies y cols., 1987).
- La mayoría de los tejidos animales poseen una proteasa alcalina neutra que degrada las formas oxidadas de las enzimas, pero que apenas tiene actividad sobre las formas no oxidadas (Rivett, 1985).
- La degradación *in vivo* de proteínas endógenas en mitocondrias de hígado y corazón y en eritrocitos se ve estimulada por la adición de sistemas generadores de radicales libres (Davies y Lin, 1988).

- La exposición *in vitro* de proteínas purificadas a radicales libres aumenta su susceptibilidad a la degradación por proteasas no dependientes de 5'-trifosfato (Davies y cols., 1987).

El envejecimiento conlleva la acumulación de proteínas dañadas debido a un aumento con la edad de la velocidad de oxidación de las mismas, a una disminución de la capacidad de degradar estas proteínas, o ambos a la vez (Stadtman y cols., 1992).

2.2.3. Daño oxidativo al DNA

El DNA también es susceptible de daño oxidativo. El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del DNA formándose radical peroxilo. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias del DNA dan lugar a un gran número de productos. También se forman puentes cruzados DNA-proteína.

El número de productos formados a consecuencia del ataque a las bases del DNA por radicales libres supera la veintena. Entre ellos se encuentran la 8-oxoadenina, 8-oxoguanina, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 5-hidroxicitosina, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, 5-hidroxiuracil, timina glicol y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina.

Uno de los primeros en valorarse fue la timina glicol mediante HPLC con detección ultravioleta. La baja sensibilidad de este tipo de detección dio lugar en los últimos años al desarrollo de técnicas que permitieran la valoración de otros productos como la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) por espectrometría de masas, o por HPLC con detección electroquímica.

Muchos de estos productos encontrados *in vitro*, también aparecen en el DNA de tejidos animales tras el tratamiento con sustancias que estimulan la generación de radicales libres o a causa del envejecimiento (García de la Asunción y cols., 1996). Según estudios realizados por Ames y cols. (Ames y cols. 1993), el daño oxidativo al DNA y la mutagénesis son dos causas importantes del cáncer.

La modificación oxidativa más frecuente suele darse a nivel de la guanosina, dando lugar a la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-oxodG). Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones G-T (Kasai y Nishimura, 1984; Shibutani y cols., 1992).

La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina se utiliza como índice del daño oxidativo al DNA (Fraga y cols., 1990).

Por otra parte, debemos destacar que el daño oxidativo asociado a proteínas y al DNA no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras del DNA puede aumentar la acumulación de daño oxidativo al mismo, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del DNA dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un DNA dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell y Auroma, 1991; Breen y Murphy, 1995). Así pues, las lesiones oxidativas al DNA parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas al envejecimiento. El DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte del DNA dañada y ésta es eliminada a continuación al ser excretada con la orina (Ames y cols, 1993). Sin embargo, las enzimas

reparadoras no son capaces de eliminar todas las lesiones que se acumulan, lo cual conduce a un aumento del número de mutaciones al DNA con la edad (Ames y cols, 1993) con las consecuencias que de ello se derivan como el aumento del riesgo de cánceres, etc.

El daño al DNA ha sido observado en un gran número de líneas celulares procedentes de mamíferos expuestas a estrés oxidativo (Halliwell y Auroma, 1991). Este daño incluye roturas de doble y simple cadena, deleciones, cambio de bases, daño oxidativo, e incluso aberraciones en los cromosomas. Los principales mecanismos moleculares implicados son la reacción directa de radicales hidroxilo y compuestos carbonílicos con el DNA y la activación de las nucleasas (Halliwell y Auroma, 1991). El ion superóxido y el H_2O_2 no reaccionan con el DNA a menos que no haya iones de metales de transición que permitan la formación de radicales hidroxilo. Los radicales hidroxilo son capaces de atacar las desoxirribosas, purinas y pirimidinas, generando numerosos productos, como la 8-hidroxideoxiguanosina (8-oxodG), timidín glicoles y 8-hidroxiadenosina (Halliwell y Auroma, 1991).

Más concretamente, el daño al DNA por radicales libres puede ocurrir de dos modos principales:

- Reacción con los residuos desoxirribosa.
- Reacción de adición a las bases del DNA.

Cuando un radical libre ataca a una desoxirribosa del DNA, generalmente se produce una ruptura de la cadena a nivel del lugar de reacción. Sin embargo, la cadena complementaria que permanece intacta, puede mantener juntos los dos extremos de la cadena dañada

hasta que actúen las enzimas reparadoras. De este modo, este tipo de daño no es usualmente crítico para la célula a no ser que haya una rotura cercana en las dos cadenas (Breen y Murphy, 1995).

La adición de los radicales libres a las bases del DNA es más habitual que la ruptura de las cadenas, y da lugar a una gran variedad de productos derivados. El principal modo de reacción consiste en la adición a nivel de los carbonos C-5 y C-6 de las pirimidinas, y a nivel de los carbonos C-4 y C-8 de las purinas (Breen y Murphy, 1995). El resultado del ataque a estos carbonos pertenecientes a pirimidinas y purinas es un conjunto de formas radicales de las bases, las cuales sufren diversas modificaciones hasta desembocar en la formación de productos finales muy variados. Se ha observado que en presencia de oxígeno, los aductos de purinas con radicales libres pueden sufrir en ciertos casos una reconversión a la purina inicial (Breen y Murphy, 1995). La oxidación de la deoxiguanosina a 8-oxoguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico (Shibutani y cols, 1992).

Al menos en el caso del DNA nuclear se cree que el hierro y el peróxido de hidrógeno juegan un papel importante en el daño oxidativo. Si el peróxido de hidrógeno llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando el radical hidroxilo (Reacción de Fenton), que ataca en ese mismo lugar al azúcar o a la base, produciendo tanto roturas de la hebra como modificaciones en las bases. Como ya ha sido mencionado, estas lesiones pueden dar lugar a mutaciones y a fenómenos carcinogénicos (Simic, 1994).

Un hecho muy importante que debemos resaltar es que el DNA mitocondrial está expuesto a un mayor daño oxidativo que el DNA nuclear (Richter y cols, 1988). El genoma mitocondrial presenta

ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes:

- Carece de histonas que protejan el DNA (Jonhs y cols., 1995).
- El sistema de reparación no es tan sofisticado como en el caso del DNA nuclear, aunque se ha demostrado su existencia (Suter y Richter, 1999; Shen y cols., 1995)
- Se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies activadas de oxígeno. La formación de 8-oxoDG en el DNA mitocondrial aumenta conforme se incrementa la tasa de producción de hidroperóxidos por la mitocondria (C. Giulivi y cols., 1991).

Otro factor distintivo del DNA mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de DNA codificante (Linnane y cols, 1989; Ames y cols, 1993) y su repercusión suele ser por tanto más importante.

Las lesiones oxidativas al DNA mitocondrial se acumulan con la edad en los tejidos procedentes de humanos y de roedores (Shibutani y cols, 1992; Ames y cols., 1993; Mecocci y cols., 1993; García de la Asunción y cols., 1996). Así pues, el sistema de reparación del DNA mitocondrial es incapaz de contrarrestar la cantidad de especies reactivas de oxígeno generadas en las mitocondrias a lo largo de la vida. Las mutaciones puntuales y las deleciones en el DNA mitocondrial se producen en los tejidos de

animales viejos (Lee y cols., 1997). En humanos las deleciones en el DNAMt aumentan más de 10.000 veces con la edad (Gadaleta y cols., 1999). Una característica peculiar de las deleciones del DNAMt asociadas al envejecimiento es su distribución en mosaico (Gadaleta y cols., 1999). Ello supone una distribución localizada de las deleciones incluso en un mismo tejido, de modo que unas células poseen un mayor porcentaje de deleciones que otras.

Los daños ocasionados en el DNA mitocondrial pueden afectar a la transcripción de genes mitocondriales (Kristal y cols., 1994).

El número de modificaciones en la molécula de DNA producido diariamente es bastante significativo. En general, se ha estimado entre 104-105 alteraciones de DNA por día y célula (Fraga y cols. 1990). Las bases alteradas son sustituidas por las correctas gracias a diferentes sistemas intracelulares de reparación del DNA y después eliminadas extracelularmente (Sancar, 1990). Por lo tanto, las alteraciones del DNA se pueden determinar, bien midiendo la presencia de bases modificadas y excretadas por la célula en sangre y orina, o bien extrayendo el DNA del tejido y midiendo directamente su contenido en bases alteradas (Aruoma y cols. 1987; Shigenaga y cols. 1989).

2.2.4. Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilo. Los mono y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por

ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini y cols, 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel y cols. 1988) dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes (sobre todo radical superóxido) provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald y Moy, 1980; Grootveld y cols, 1991). Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (McCord, 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald y cols. 1980).

Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo con la *diabetes mellitus*, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas. Se postula que una anormal regulación en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición colabora en el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo (Wolff y cols. 1987; Oberley, 1988; Wolff, 1993).

2.3. Indicadores de estrés oxidativo

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan determinar el daño oxidativo a nivel general (citósol), o particularmente a nivel de lípidos, DNA y proteínas. Entre los indicadores propuestos, los más relevantes son el cociente GSSG/GSH como indicador de daño oxidativo en el citósol, el malondialdehído y el hidroxinonenal como indicadores de daño a los lípidos así como pentano y etano exhalado, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina como índice de daño oxidativo al DNA, y grupos carbonilo y 2-oxohistidina como indicadores de daño oxidativo a proteínas (Hageman y cols., 1992).

2.3.1. Indicadores de daño oxidativo en citósol

2.3.1.1. Cociente GSH/GSSG

El glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina), como luego veremos, es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, principalmente relacionadas con la protección antioxidante de las células (Viña, 1990). Su acción antioxidante se debe al grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión es capaz de ejercer su papel protector sólo cuando se presenta en su forma reducida (GSH). La forma oxidada del glutatión se presenta cuando dos moléculas de GSH se oxidan (por presencia de agentes oxidantes o por autooxidación) cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar a la forma disulfuro (GSSG).

Un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986). Sin embargo, existen problemas metodológicos importantes en la determinación correcta del GSSG. En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son de dos a tres órdenes de magnitud mayores que los de GSSG (Kosower y Kosower, 1978). Además, el GSH se autooxida con facilidad a GSSG, sobre todo a pH neutro (Viña y cols, 1978; Asensi y cols, 1994). Esto hace que una pequeña oxidación del GSH suponga un aumento muy importante del GSSG, con el consiguiente error al determinar el índice GSSG/GSH. El modo de evitar la autooxidación del GSH es bloqueando el grupo tiol del GSH con N-etilmaleimida inmediatamente después de la extracción. Ello permite evitar las oxidaciones producidas por la manipulación de la muestra previas al análisis del GSSG por H.P.L.C. (Asensi y cols, 1994).

2.3.2. Indicadores de daño oxidativo a lípidos

2.3.2.1. Malondialdehído e hidroxinonenal

La degradación de los lipoperóxidos da lugar a la formación de una gran variedad de aldehídos. Los indicadores de daño oxidativo a lípidos más empleados de entre los señalados en el apartado 2.2.1 de la presente tesis son el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal.

Se han descrito varios métodos para la determinación de malondialdehído (Bird y Draper, 1984; Esterbauer y cols, 1991). La mayoría de ellos son poco específicos, puesto que utilizan el ácido tiobarbitúrico como reactivo y éste reacciona inespecíficamente con

todos los aldehídos de la muestra. Estos métodos han sido mejorados gracias a la separación del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico por cromatografía líquida de alta resolución de otras sustancias que puedan interferir en la determinación (Knight y cols, 1988).

El 4-hidroxinonal es un producto muy abundante de la peroxidación lipídica. Las técnicas convencionales de cuantificación incluyen la derivatización de la muestra con dinitrofenilhidracina para formar un aducto estable y no volátil con el aldehído, y una cromatografía por H.P.L.C. para separar y cuantificar el pico correspondiente al 4-hidroxinonal (Esterbauer y Zollner, 1989).

2.3.2.2. Pentano y etano

El etano y el pentano son dos hidrocarburos de cadena corta que se forman como productos terminales en la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 (Dumelin y Tappel, 1977). Debido a su volatilidad, se eliminan por vía pulmonar y se pueden identificar por cromatografía de gases. Al ser una técnica no invasora, la cuantificación de estos alcanos se ha empleado mucho en seres humanos como índice de peroxidación lipídica (Wispe y cols, 1985; Wispe y cols, 1986).

2.3.3. Indicadores de daño oxidativo al DNA

2.3.3.1. 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

Una de las bases modificadas cuyo contenido aumenta en el DNA tras un estrés oxidativo es la 8-hidroxiguanina (Kasai y cols, 1986). Esta lesión puede repararse por una glicosilasa, que elimina la

base nitrogenada (8-hidroxi-2'-deoxiguanina), o por una endonucleasa, que elimina el nucleósido (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina) (Tchou y Grollman, 1993). Tras ser escindidas del resto de la cadena, ambas se eliminan por la orina.

La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en órganos o en orina se utiliza como índice del daño oxidativo al DNA *in vivo* (Fraga y cols, 1990). Se prefiere la detección del nucleósido y no de la base, porque la excreción de la base oxidada en orina está muy influenciada por la ingesta. En la mayoría de los laboratorios donde se determina cuantitativamente esta molécula, se emplea H.P.L.C. con detección electroquímica, o por espectroscopía de masas.

2.3.4. Indicadores de daño oxidativo a proteínas

2.3.4.1. Grupos carbonilo en proteínas

Como indicadores de daño oxidativo a proteínas se determinan los grupos carbonilo que se forman en las proteínas tras ser atacadas por radicales libres. Los métodos de determinación se pueden agrupar en dos: marcaje con borohidruro de sodio tritiado, y reacción con fenilhidrazinas (Lewisch y Levine, 1995). El método más empleado se basa en la reactividad de la 2,4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilo para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, que se cuantifica mediante espectrofotometría (Oliver y cols, 1987; Lewisch y Levine, 1995). También se puede realizar un *western blotting* de proteínas oxidadas, una vez derivatizadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

2.3.4.2. 2-oxohistidina

La histidina es uno de los aminoácidos más vulnerables al ataque oxidativo. Uno de los productos de oxidación de la histidina es la asparragina (Amici y cols, 1989; Stadtman, 1990). Sin embargo, ésta no resulta un marcador apropiado debido a que aparece de manera natural en las proteínas, y además se hidroliza en medio ácido dando lugar a aspartato con gran facilidad (Uchida y Kawakishi, 1993). Otro producto de oxidación de la histidina es la 2-oxohistidina. Ésta se forma por oxidación del C-2 del imidazol de la histidina, y aunque está en menor proporción que la asparragina, sí reúne las propiedades necesarias para poder ser utilizado como índice de daño oxidativo a proteínas. (Lewisch y Levine, 1995).

3. ANTIOXIDANTES FISIOLÓGICOS

3.1. Concepto de antioxidante

Todas las células aeróbicas están sujetas a estrés oxidativo. El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática, diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres. Halliwell en 1995 definió antioxidante como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell, 1995; Halliwell, 1996).

Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ROS.
- Interceptando el ataque de ROS.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los antioxidantes se clasifican en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los **antioxidantes primarios** previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Actúan detoxificando los radicales libres (o especies que pueden generarlos) convirtiéndolos en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) (Gutteridge y Stocks, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los **antioxidantes secundarios** son protectores no enzimáticos que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se comportan como tal, el glutatión, la vitamina E, la vitamina C, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina (Halliwell y Gutteridge, 1990).

En última instancia, los **antioxidantes terciarios** ejercen su defensa mediante la reparación de biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies, 1986; Giulivi y Davies, 1990). También podemos destacar las enzimas reparadoras de DNA, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Dempsey y Halbrook, 1983; Sevanian y Kim, 1985; Dizdaroglu, 1993).

Desde un punto de vista bioquímico, los radicales libres se clasifican en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Puesto que su utilización está ampliamente distribuida

en la literatura, la presente tesis describe los antioxidantes en función de esta última clasificación.

3.2. Antioxidantes enzimáticos

3.2.1. Superóxido dismutasa

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la Naturaleza. Está presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan, 1989).

Revisten gran importancia puesto que constituyen la primera defensa al daño oxidativo que pueden causar el ión superóxido y las especies reactivas que se derivan de su presencia (Fridovich, 1974).

Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord y Fridovich, 1969). La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reacción que transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord y cols., 1974; Fridovich, 1978).



Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H_2O_2 . Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, está alrededor $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). La catálisis de la reacción de dismutación llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa incrementa esta velocidad del orden de 10.000 veces (Fridovich, 1974). Como antioxidante primario, la actividad superóxido dismutasa cumple un papel fundamental en la defensa

antioxidante ya que es una de las primeras líneas de defensa. Recordemos que aproximadamente, del 1 al 2% del oxígeno que consume la mitocondria en estado 4 respiratorio, se transforma en la cadena de transporte electrónico en radical superóxido (Boveris y Chance, 1973), y éste es principalmente detoxificado por la superóxido dismutasa, particularmente por la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, como a continuación señalaremos.

Hay descritas cuatro formas diferentes de esta enzima antioxidante. La Tabla I. 6 resume los tipos de SOD según el grupo prostético metálico ligado a ella y su localización mayoritaria.

Enzima	Grupo prostético	Localización celular
Cu/Zn-SOD	Cu, Zn	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Citosol ▪ Núcleo
Mn-SOD	Mn	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Matriz mitocondrial ▪ Citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

Tabla I. 6.- Tipos de superóxido dismutasa y localización celular mayoritaria

3.2.1.1. Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD)

La superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) aparece en la mayoría de las células eucariotas. Es una proteína soluble que contiene como cofactores iones de cobre y de zinc. Existe en muchas formas isoméricas que se distinguen por el contenido en iones metálicos (Ischiropoulos, 1990). La más abundante de las formas isoméricas se localiza mayoritariamente en el citosol, y en menor cantidad en el núcleo (ver Tabla I. 7) (Chang, 1988; Makita, 1990), aunque también tiene otras localizaciones. Su transcripción se lleva a cabo a partir del DNA nuclear. A escala tisular, esta isoforma se encuentra a elevadas concentraciones en hígado, cerebro y testículos, y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas.

Extracelularmente aparece una isoforma caracterizada por su gran peso molecular (Marklund, 1982). Aunque esta isoforma es detectable en plasma, se localiza principalmente en la matriz extracelular, probablemente para interceptar el daño causado por el superóxido que liberan neutrófilos y macrófagos al ejercer su función (Fridovich, 1997).

LOCALIZACIÓN CELULAR	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
CITOSOL	McCord 1979; Fridovich, 1983; Bannister y cols., 1987; Ishikawa, 1995.
LISOSOMAS	Geller y Winge, 1982
MITOCONDRIAS	McCord, 1979; Steeinman, 1982; Fridovich, 1983.
NÚCLEO	Patton y cols, 1980; Yusa y cols, 1984.
PEROXISOMAS	Keller y cols., 1991; Crapo y cols., 1992; Dhausi y cols., 1992; Wanders y Denis, 1992.
EXTRACELULAR	Fridovich, 1995.

Tabla I. 7.- Diferentes localizaciones celulares de la Cu-Zn SOD.

3.2.1.2. Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD)

Hay dos tipos de superóxido dismutasas que contienen manganeso.

Una de ellas se encuentra mayoritariamente en la matriz mitocondrial (Weisger y Fridovich, 1973; McCord y cols., 1977; Kinnula y cols., 1995) y en menor medida en el citosol (McCord y cols., 1977; Fridovich, 1983; Parkery y cols., 1984). Su transcripción tiene lugar a partir del DNA mitocondrial, y su presencia en la mitocondria es de gran importancia puesto que como se ha señalado en el apartado 1.4.2.1. de la presente tesis, la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en las células (Boveris y Chance, 1973), de modo que constituye una de las substanciales barreras frente al daño oxidativo originado por los radicales libres.

La otra SOD dependiente de manganeso, se encuentra en bacterias tales como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* (Vance y cols., 1972), y reviste una menor importancia con relación a lo que esta tesis se refiere.

3.2.1.3. Superóxido dismutasas dependientes de otros metales

Otras superóxido dismutasas contienen hierro, como la que se halla en *Escherichia coli* (Yost y Fridovich, 1973).

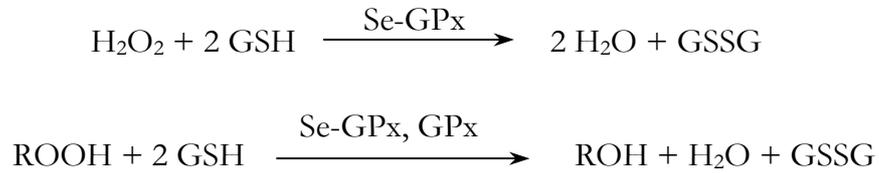
Más recientemente, se ha descubierto algunas superóxido dismutasas denominados atípicas que contienen como cofactores en su grupo prostético diferentes combinaciones de los metales mencionados anteriormente u otros metales (Duke y Salin, 1985; Barkley y Gregory, 1990; Ciriolo y cols., 1994).

3.2.2. Glutación peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células (Chance y cols., 1979). Así pues, forma parte de los denominados antioxidantes primarios de modo que convierte los radicales libres en moléculas menos dañinas, o impide su formación. La mayor parte de la actividad glutatión peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

Existen dos tipos de glutatión peroxidasa, una selenio dependiente (Se-GPx), y otra que no contiene selenio (GPx). Ambas

requieren glutatión reducido como dador de equivalentes reductores para catalizar la siguiente reacción:

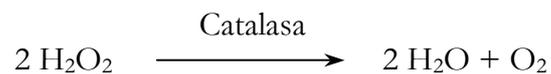


La glutatión peroxidasa selenio dependiente es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio. Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom y cols, 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986). Es capaz de catalizar tanto la reducción de peróxido de hidrógeno como de peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986)

La glutatión peroxidasa no-selenio dependiente sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986).

3.2.3. Catalasa

La catalasa participa en la detoxificación de peróxido de hidrógeno a través de una reacción que da lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance y cols., 1979).



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Tolbert y Essner, 1981), si bien se ha descrito cierta actividad catalasa

también en mitocondrias y citosol (Eriksson y cols., 1992; Prasad y cols., 1994).

3.3. Antioxidantes no enzimáticos

3.3.1. Glutación

El glutación es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Constituye el principal antioxidante endógeno de carácter no enzimático. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que le otorgan una funcionalidad amplia e importante en la célula.

Puede encontrarse en dos formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutación reducido, o como GSSG o glutación oxidado. Éste último es la combinación de dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro.

El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, 1990), entre ellas, se encarga de proteger a la célula frente al ataque oxidativo, ya sea por radicales libres, peróxidos u otros agentes nocivos como las radiaciones.

✦ Estructura química

Muchas de las funciones fisiológicas que desempeña el GSH se deben a las características de su estructura química (ver Figura I. 11).

Por un lado, el grupo tiol (-SH) de la cisteína le confiere la capacidad de intervenir en reacciones redox, por otro, el enlace γ - glutamilo le hace resistente a la degradación por peptidasas celulares.

Así pues, este enlace sólo es hidrolizable por la enzima γ - glutamil transpeptidasa situada en la membrana celular (Viña y cols., 1992).

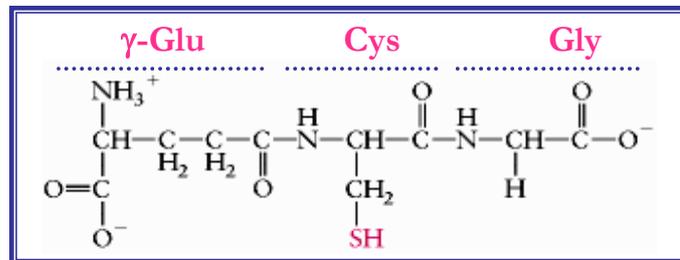


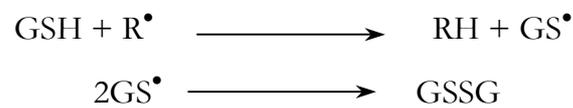
Figura I. 11.- Estructura química del GSH: γ -glutamil cistein glicina

✦ Propiedades fisico-químicas

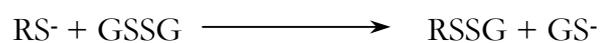
El glutatión, gracias a su grupo tiol, puede intervenir en reacciones de tipo redox, intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína que contiene en su estructura (Kosower y Kosower, 1978). Así, puede actuar de las siguientes formas:

1. **Reacción directa con un radical libre**

Formación de radical GS^\bullet . Este radical es estable y persiste hasta encontrar otro radical y formar una molécula de GSSG.



2. **Intercambio tiol – disulfuro**



3. Oxidación dieléctrica

A través de la formación de un intermediario, seguida por la sustitución de una molécula adecuada. Este mecanismo es uno de los empleados para deplecionar GSH de forma no enzimática:



✦ Síntesis y degradación del glutatión: ciclo del γ -glutamilo

El conjunto de las seis reacciones que participan en la síntesis y degradación del glutatión constituye el llamado ciclo del γ -glutamilo (ver Figura I. 12) (Meister y Anderson, 1983).

En la síntesis de GSH intervienen dos enzimas. La primera es la γ -glutamilcisteína sintetasa (ver reacción 1, Figura I. 12), que da lugar a la γ -glutamilcisteína a partir de L-glutámico y L-cisteína. El segundo paso de la síntesis de GSH (ver reacción 2, Figura I. 12) está catalizado por la glutatión sintetasa, que une una glicina a la γ -glutamil cisteína.

En situaciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de GSH es la disponibilidad de cisteína (Tateishi y cols, 1974; Tateishi y cols, 1977). Por otro lado, la síntesis de glutatión está regulada por retroalimentación, ya que el GSH inhibe la γ -glutamilcisteína sintetasa (Richman y Meister, 1975).

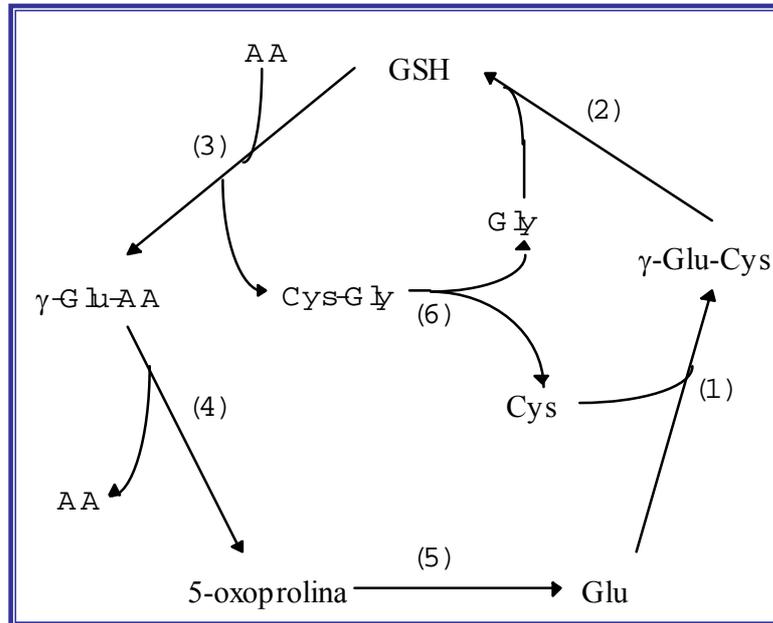


Figura I. 12.- Ciclo del γ -glutamilo.

Enzimas del ciclo: (1), γ -glutamilcisteína sintetasa; (2), glutatión sintetasa; (3), γ -glutamil transpeptidasa; (4), γ -glutamil ciclotransferasa; (5), oxoprolinasa; (6), dipeptidasa; AA: aminoácido.

El catabolismo del glutatión lo inicia la γ -glutamil transpeptidasa (ver reacción 3, Figura I. 12), que cataliza dos tipos de reacciones: a) transpeptidación, en la que la parte γ -glutamilo se transfiere a un aceptor, que puede ser el mismo GSH; b) hidrólisis, en la que se hidroliza el enlace γ -glutamilo. Los sustratos de la γ -glutamil transpeptidasa son GSH, GSSG, GSH S-sustituido y otros compuestos del γ -glutamilo (Meister y Anderson, 1983). La actividad γ -glutamil transpeptidasa se localiza en la superficie externa de las células (Meister y Anderson, 1983). Cuando el GSH interacciona con

la membrana, la γ -glutamil transpeptidasa forma un γ -glutamil aminoácido, que entra al interior de la célula. Tras este paso, la γ -glutamil ciclotransferasa (ver reacción 4, Figura I. 12) hidroliza el γ -glutamil aminoácido, liberando el aminoácido y 5-oxo-L-prolina (Meister y Anderson, 1983). La oxoprolinasa (ver reacción 5, Figura I. 12) cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de la oxoprolina, liberando glutamato. Una dipeptidasa (ver reacción 6, Figura I. 12) hidroliza la cisteinilglicina formada por la γ -glutamil transpeptidasa, dando lugar de nuevo a los aminoácidos cisteína y glicina (Meister y Anderson, 1983).

✦ **Funciones fisiológicas del GSH**

El GSH participa en gran cantidad de procesos fisiológicos:

a) Interviene indirectamente en la síntesis de DNA. En este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos, reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. En esta reacción debe intervenir un donante de hidrógeno que puede ser la tioredoxina (Theelander y Reichart, 1979) o la glutaredoxina (Holmgren, 1979), la cual depende de GSH.

b) Es uno de los antioxidantes más abundantes de la célula, y por lo tanto una primera barrera de protección frente al estrés oxidativo (Sies, 1986). El GSH protege a la membrana celular contra el daño oxidativo ya que mantiene el estatus tiólico de la misma (Kosower y Kosower, 1983). Puede excretarse de las células y actuar como mecanismo de emergencia frente al daño que un exceso de GSSG puede causar, puesto que el GSSG reacciona con los grupos

tioles de proteínas formando disulfuros mixtos (Ishikawa y cols., 1986).

c) Participa en la regulación de la síntesis de proteínas. Cuando el GSH se oxida los procesos de iniciación y elongación de la traducción se inhiben (Ochoa, 1983). Cuando el GSSG se reduce la elongación se reanuda y parece que es un aumento en la concentración de GSSG lo que hace que la síntesis proteica se inhiba.

d) Colabora en la detoxificación de xenobióticos (Orrenius y Moldeus, 1984)

e) Contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Viña y cols., 1989)

f) Constituye un reservorio de cisteína (Tateishi y cols., 1974)

g) Modula actividades enzimáticas (Pajares y cols., 1992a; 1992b)

h) Juega un papel en la homeostasis del calcio (Bellomo y cols., 1982)

i) Participa en la regulación de la proliferación celular (Terrádez y cols., 1993).

Destacaremos su propiedad como antioxidante por la relevancia que adquiere en nuestro estudio.

✦ Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin necesidad de intervención enzimática, o bien por medio de la glutatión peroxidasa, enzima clave del ciclo redox del glutatión.

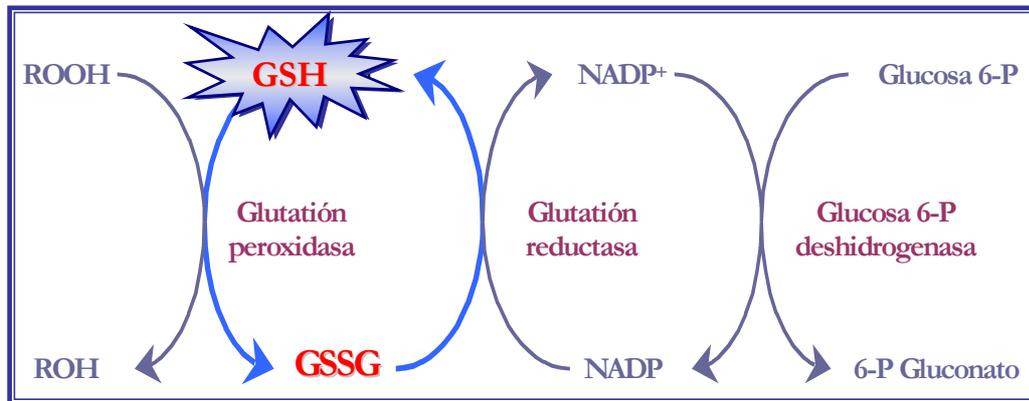


Figura I. 13.- Ciclo redox del glutatión.

Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria (Orrenius y Sies, 1982).

3.3.2. Otros antioxidantes

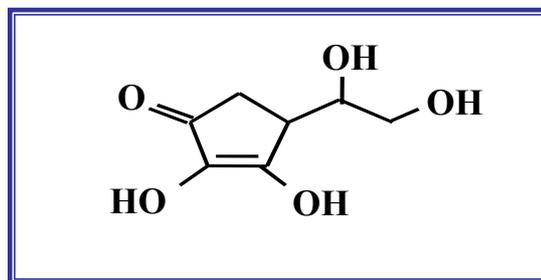
3.3.2.1. Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es considerado uno de los más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales (Bendich y cols., 1986). Es soluble en agua y se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos, el plasma contiene

alrededor de 60 $\mu\text{mol/L}$. Las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, pero los humanos, otros primates superiores y los cobayas no poseen uno de los enzimas imprescindibles para su síntesis, teniendo que ser incorporada con la dieta.

Sus características estructurales le permiten reaccionar con ROS oxidándose a dihidroascorbato que se recicla a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa. Así pues, el dihidroascorbato se encuentra en plasma a concentraciones mucho más bajas que el ascorbato.

Esta vitamina es efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. En solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana.



**Figura I. 14.- Estructura de la vitamina C: ácido
ascórbico**

La vitamina C es una molécula que posee tanto propiedades antioxidantes como prooxidantes, dependiendo de la concentración de hierro tisular (Frei, 1994), aunque no ha podido demostrarse su

efecto prooxidante *in vivo*. Cuando se encuentra a bajas concentraciones, ejerce un efecto antioxidante, uniéndose al radical superóxido o hidroxilo y formando radical semihidroascorbato, que posteriormente es reducido por el glutatión. Sin embargo, en condiciones de alta concentración tisular de hierro, el ácido ascórbico es capaz de catalizar la reacción de Fenton y por lo tanto, generar ión ferroso, que a su vez facilita la producción de radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss.

Las mayores fuentes de ascorbato en la dieta son las frutas, especialmente los cítricos, el kiwi, las cerezas y el melón. También forma parte de la composición de algunos vegetales como tomates, coliflor, coles de Bruselas, col, o brócoli. El contenido de estos vegetales, puede exceder los 100 mg ascorbato / 100 g peso fresco. Sin embargo cabe destacar que la eficacia de absorción decrece conforme aumentan estos niveles (Levine, 1986). Se ha demostrado que la biodisponibilidad de la vitamina C en los alimentos naturales, es similar a la que se encuentra artificialmente en diversos compuestos (Mangels y cols., 1993).

Tras diversos estudios, parece claro que dosis de vitamina C altas (más de 600 mg/día) son seguras y libres de efectos secundarios (Bendich, 1997). Un hito fundamental para el impulso de la investigación de las funciones de la vitamina C, a parte de prevenir el escorbuto subyacente de su deficiencia, fue la publicación por Linus Pauling del libro “Vitamin C, the common cold and the flu” (Pauling, 1970). El prestigio universal del autor hizo que se iniciara una nueva era en el estudio del papel de la vitamina C, y de las vitaminas en general. Bendich ha acuñado para esta era el nombre de

“más allá de la deficiencia”, haciendo hincapié en el hecho de que las vitaminas sirven para algo más que prevenir deficiencias.

3.3.2.2. Vitamina E

Bajo esta denominación se incluye una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. Son altamente lipofílicos, de modo que tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas.

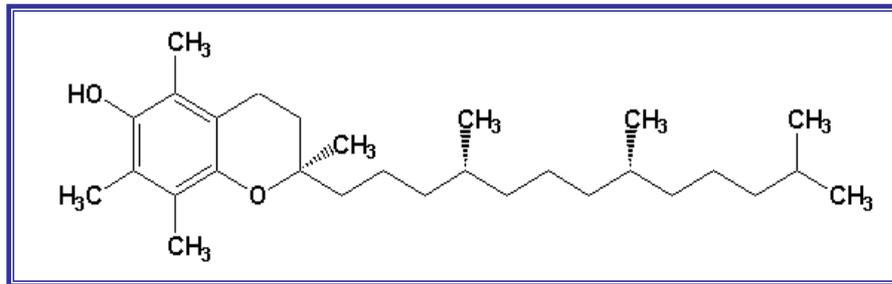


Figura I. 15.- Estructura de la vitamina E: tocoferol

Es probablemente el antioxidante más potente del organismo, en cuanto a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación.

La vitamina E secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo. Este último puede ser reducido por el ascorbato y el glutatión oxidado a la respectiva quinona.

El alfa-tocoferol es el antioxidante más eficiente de la fase lipídica (Nicki, 1987). Contiene grupos metilo adyacentes a los grupos hidroxilo fenólicos y están óptimamente posicionados en las

membranas. Los tocoferoles además tienen capacidad de captar energía del oxígeno singlete y de interaccionar con peroxinitritos.

Los niveles de vitamina E en plasma en humanos son de alrededor de 22 $\mu\text{moles/L}$; se encuentra en tejidos como el hígado, el riñón, tejido adiposo o adrenal.

La dieta humana está compuesta por multitud de alimentos que contienen vitamina E. Las fuentes ricas de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, de soja y de semilla de algodón), y productos hechos a partir de estos aceites como la margarina o la mayonesa. Contribuyen considerablemente a los suplementos en vitamina E el germen de trigo, las nueces y algunos vegetales de hojas verdes (Parker,1989).

Con respecto a la seguridad toxicológica de la toma oral de vitamina E, ha habido mucha controversia a lo largo de los años. Existen 5 revisiones destacables: Bendich y Machlin, 1987, 1993; Kappus y Diplock, 1992 y Viña y cols., 1992; Diplock, 1995. El problema en los estudios comparados surge con la confusión en la literatura entre las diferentes formas de vitamina E. Estudios de aspectos convencionales de la toxicidad de la vitamina E en animales han sido realizados por muchos investigadores durante un largo período de tiempo (Levander y cols., 1973; Krasavage y Terharr, 1977; Abdo y cols., 1986). Sin embargo, en humanos son pocos los trabajos realizados con rigor (grupo con un número significativo de pacientes para evaluación estadística, inclusión de grupos placebo, etc.). De las revisiones efectuadas podemos concluir los siguientes puntos:

1. La toxicidad de la vitamina E es muy baja
2. Estudios en animales muestran que la vitamina E no es mutagénica, carcinogénica o teratogénica.

3. En estudios hechos a doble ciego, las dosis orales tienen pocos efectos colaterales, incluso a dosis tan elevadas como 3.2 g/día.
4. Dosis de hasta 1000 mg por día son consideradas enteramente seguras y sin efectos secundarios.
5. En personas con defecto de coagulación sanguínea por deficiencia en vitamina K puede estar contraindicado las altas dosis de vitamina E vía oral.

3.3.2.3. Carotenoides

Son colorantes naturales con pronunciada actividad antioxidante (Stahl y Sies, 1993; Olson y Krinsky, 1995). La propiedad química que les da este carácter antioxidante se basa en un extendido sistema de dobles enlaces conjugados.

Los principales ROS sobre los que actúan los carotenoides son el oxígeno singlete y los radicales peroxilos (Palozza y cols., 1997). La desactivación del $^1\text{O}_2$ puede ser física o química. La física consiste en una transferencia de energía de activación desde las especies de oxígeno excitadas al carotenoide dando lugar a un carotenoide excitado triplete. La energía de excitación del carotenoide se disipa a través de interacciones vibracionales con el solvente, para recobrar su estado anterior. Así, el carotenoide acaba intacto y listo para otro ciclo de activación. La desactivación química contribuye en un 0.05% del total de los mecanismos de inactivación de los $^1\text{O}_2$ por carotenoides, pero es responsable de la eventual destrucción de la molécula. También se ha descrito su papel en el secuestro de radicales peroxilos por interacción química (Kennedy and Liebler, 1992). Se ha sugerido la formación de un radical caroteno

intermediario en este proceso que finalmente da lugar a la destrucción de la molécula.

Al igual que la vitamina E, los carotenoides pertenecen a un conjunto de antioxidantes lipofílicos presentes en lipoproteínas como la LDL o HDL. Su contribución al sistema de defensa antioxidante de las LDL no está todavía por esclarecer.

Los carotenoides se pueden encontrar en una gran variedad de frutas y vegetales. Las mayores fuentes son las zanahorias (α -carotenos y β -carotenos), los tomates (licopenos), los cítricos (β -criptoxantina), las espinacas (luteína), o el maíz (ceaxantina) (Mangels y cols., 1993). Los procesos de absorción y transporte de los carotenoides son bastante complejos. Influyen muchos factores como la coingestión con fibra o grasas o el cocinado de los alimentos entre otros (Erdman y cols., 1993). El suplemento en la dieta de cantidades moderadas de β -carotenos en individuos sanos parece seguro. Esta práctica en grandes fumadores, sin embargo, ha sido puesta en cuestión, debido a que parece que el riesgo de cáncer de pulmón aumenta (Omenn y cols., 1996).

3.3.2.4. Flavonoides

Son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se pueden encontrar en forma de O-glicósidos principalmente en muchas frutas, vegetales y bebidas como el té, el vino y la cerveza. Son eficaces antioxidantes capaces de reaccionar con radicales como los radicales peroxilos, el radical hidroxilo y el O_2^- , formando el radical fenoxi (Rice-Evans y cols., 1995; 1996). En este grupo se incluyen distintos subgrupos como los flavanoles (catequinas, epicatequinas), flavonoles (quercetina, miricetina, caemferol),

flavanonas (naringenina, taxifolina), flavonas (apigenina, hesperetina), isoflavonas (genisteína), o antocianidinas (cianidina, malvidina).

Son muchas las propiedades que se les atribuye a los flavonoides a la hora de interaccionar con radicales libres. Estas incluyen la presencia de una estructura 3',4'-hidroxi en el anillo B, la presencia de un doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo en el anillo C, y la presencia de un grupo 5-hidroxilo en el anillo A con un grupo 3-hidroxilo y una función 4-oxo en el anillo C.

Varios estudios *in vivo* como *in vitro* demuestran las propiedades antioxidantes de estos compuestos, sin embargo su biodisponibilidad es bastante pobre. Se conjugan rápidamente en las reacciones de detoxificación de fase II y los niveles de flavonoides libres en plasma humano son bastante bajos. Muchos compuestos fenólicos con actividad antioxidante son derivados del ácido cinámico, como por ejemplo el ácido cafeínico, el ácido clorogénico o el ácido ferúlico (Rice-Evans y cols., 1996).

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

4. ESTRÓGENOS

4.1. Propiedades químicas

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17β -estradiol, seguido por la estrona y el estriol. Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos (Jordan y cols., 1985; Wawrzak y cols., 1988).

4.2. Biosíntesis

Los estrógenos esteroideos se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos (Fisiología Humana, J. A. F. Tresguerres). La reacción comprende aromatización del anillo A, y ésta es catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monooxigenasa (aromatasa) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como co-sustratos (ver Figura I. 16).

La actividad de la aromatasa reside dentro de una glucoproteína transmembrana (familia P450 de monooxigenasas) (González y Nebert, 1987; Corbin y cols., 1988). También es esencial una

flavoproteína omnipresente, la NADPH-citocromo P450 reductasa. Ambas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico de células de la granulosa ovárica, células de Sertoli y de Leydig testiculares, células del tejido adiposo, sincitiotrofoblastos placentarios, blastocisto previo a la implantación y diversas regiones del cerebro.

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes en mujeres premenopáusicas. El principal producto secretado es el estradiol sintetizado por células de la granulosa a partir de precursores androgénicos, proporcionados por células de la teca. La actividad de aromatasas es inducida por gonadotropinas, que actúan por medio de receptores de membrana plasmática para incrementar las concentraciones intracelulares de adenosin-3',5'-monofosfato cíclico (AMP-cíclico, AMPc). Las gonadotropinas y el AMPc también incrementan la actividad de la enzima de desintegración de la cadena lateral del colesterol y facilitan el transporte del colesterol (el precursor de todos los esteroides) hacia las mitocondrias de células que sintetizan esteroides. El estradiol secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, y esos dos estrógenos pueden convertirse en estriol. Esas transformaciones ocurren principalmente en hígado. Los tres estrógenos se excretan en la orina junto con glucurónidos y conjugados fosfato. En varones y en mujeres postmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de deshidroepiandrosterona, secretada por la corteza suprarrenal. De este modo, la concentración de estrógenos está regulada en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos (Mendelson y Simpson, 1987).

Las concentraciones de estradiol en plasma en el hombre son bajas siendo variable en el caso de la mujer. En concreto, los niveles plasmáticos aumentan en las niñas en la pubertad alcanzando valores de 30 pg/ml al llegar a las fases II y III de desarrollo mamario y niveles de tipo adulto que oscilan entre los 10 y 200 pg/ml al llegar la menarquía o poco después.

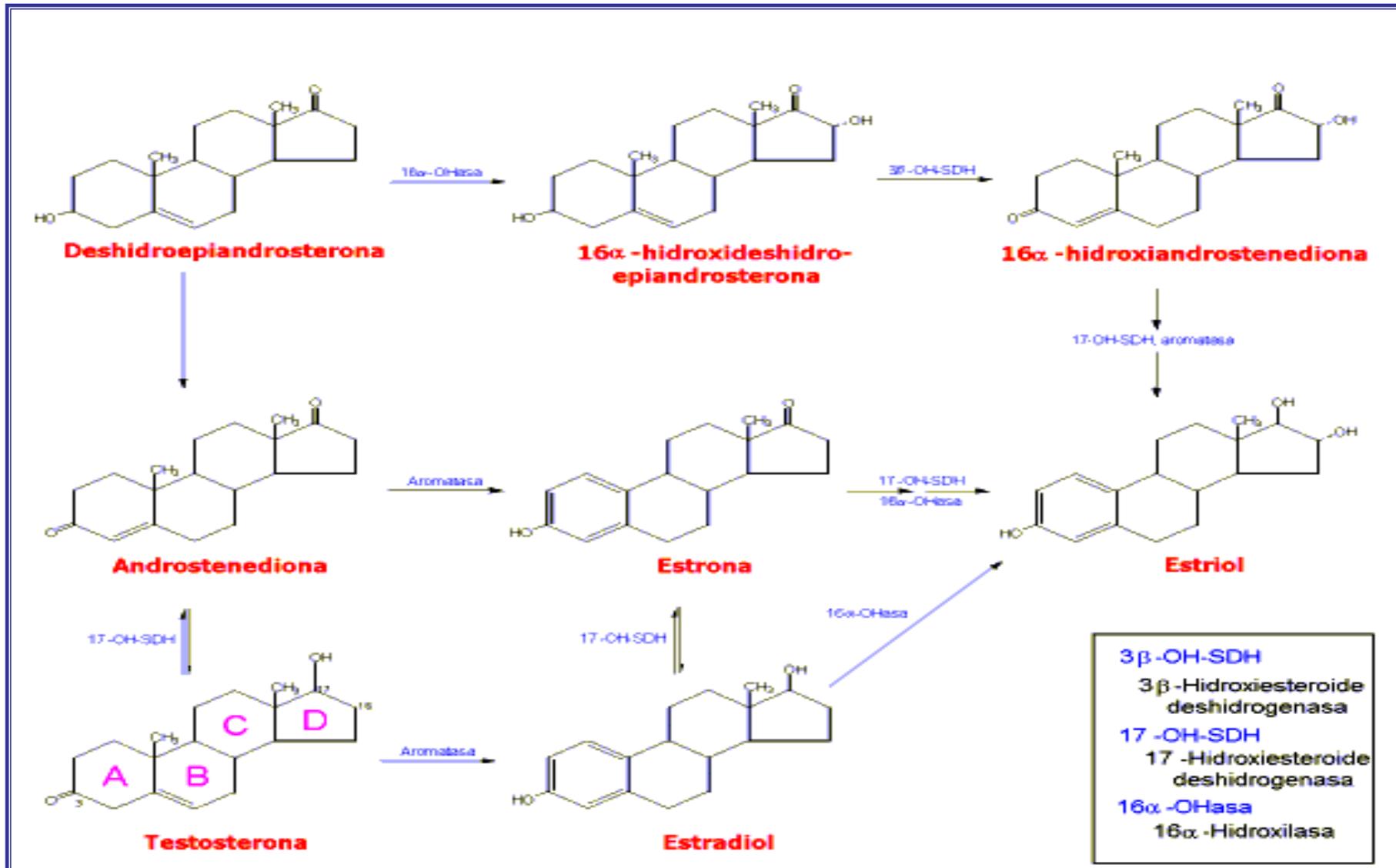


Figura I. 16.- Ruta biosintética de los estrógenos. Tomado de Goodman y Gilman "Las bases farmacológicas de la terapéutica".

4.3. Metabolismo del estradiol

Para la síntesis del estradiol, es necesaria la acción combinada de las gonadotropinas (LH), que van a estimular las células intersticiales del estroma y el cuerpo lúteo del ovario y las gonadotropinas (FSH) que fijarán su acción sobre las células granulosas del folículo de Graaf.

El estradiol se fija a la globulina fijadora de 17β -estradiol en el plasma circulante, no siendo así en el caso de la estrona y el estriol que sólo se fijan débilmente. Así mismo el estradiol experimenta un complejo metabolismo en los tejidos periféricos y en el hígado que comprende una oxidación reversible a estrona y una hidroxilación irreversible en C-2 y C-16.

Los metabolitos se conjugan con ácido sulfúrico o glucurónico y se excretan bien a la orina bien a la bilis. La determinación cuantitativa de estos catabolitos en orina es importante porque permite estimar la velocidad de recambio de las hormonas esteroides, con su consiguiente utilidad en el diagnóstico de determinadas patologías. Los metabolitos biliares pueden sufrir más transformaciones metabólicas por acción de la flora intestinal siendo reabsorbidos en la circulación portal.

Entre los metabolitos del estradiol estaría el derivado 2-hidroxílico, derivados que en conjunto reciben el nombre de catecol-estrógenos. La conversión en catecol-estrógenos tiene lugar en diferentes tejidos, entre ellos el cerebro.

4.4. Acciones de los estrógenos.

Los estrógenos poseen acciones vinculadas con el aparato reproductor, y acciones relacionadas con el metabolismo.

Por su escasa relación con el fondo de la presente tesis, no detallaremos aquellas acciones de los estrógenos relacionadas con el aparato reproductor, y centraremos la atención sobre los efectos de los estrógenos a nivel metabólico.

4.5. Efectos metabólicos de los estrógenos.

Los estrógenos afectan muchos tejidos y tienen muchas acciones metabólicas en seres humanos y animales. No está claro en todas las circunstancias si los efectos dependen de manera directa de acciones de las hormonas sobre los tejidos en cuestión, o de manera secundaria a efectos en otros sitios. Sin embargo, en la actualidad está claro que muchos tejidos no reproductores como el hueso, endotelio vascular, hígado, sistema nervioso central y corazón expresan cifras bajas de receptores de estrógenos. De este modo, es posible que muchas acciones metabólicas de los estrógenos sean un resultado directo de fenómenos mediados por receptor en los órganos afectados.

Puesto que los estrógenos producen muchas respuestas metabólicas, sus efectos sobre fenómenos particulares del metabolismo de minerales, lípidos, carbohidratos y proteínas tienen importancia especial para entender sus acciones farmacológicas.

4.5.1. Efectos de los estrógenos sobre los minerales

Los estrógenos pueden tener efectos sistémicos sobre el metabolismo de minerales, que contribuyen a la conservación de un balance positivo de calcio. Así pues, los estrógenos modulan a nivel de hueso los osteoblastos por diferentes mecanismos: por un lado intervienen en la "homeostasis del calcio" por aumento de los niveles de calcitonina y por el otro, aumentan la absorción del calcio a nivel intestinal.

También se conoce el papel de los estrógenos sobre la vitamina D al aumentar la 1-hidroxilasa renal que incrementa la síntesis del metabolito activo de la vitamina D. (Cosman y cols., 1993)

Por otro lado, los estrógenos estimulan localmente la resorción ósea (osteoclastos) a través de la prostaglandina de la serie E, interleuquinas 1 y 6, factor de necrosis tumoral alfa y beta, factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos y factor transformante alfa.

Además, contribuyen al aumento de la formación de osteoblastos al estimular los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I, IGF-II), al interferon alfa, beta y gama y el factor transformante beta (Dempster, 1993).

Así mismo, los estrógenos alteran la secreción de la hormona paratiroidea, y la deficiencia durante y después de la menopausia conduce a un volumen negativo de hueso (VonWöern N. y cols, 1994).

La disminución en los niveles de estrógenos está vinculada a aumentar el riesgo de factores de pérdida de dientes. Se están

realizando estudios para determinar el efecto que las dosis de estrógenos o de otras hormonas tienen sobre la preservación del hueso oral después de la menopausia (Marjorie y cols., 1993).

Por todo ello, la terapia hormonal de reemplazo THR tiene una influencia positiva en la masa ósea del esqueleto en la mujer postmenopáusicas (VonWowern y cols, 1994).

4.5.2. Efectos de los estrógenos sobre los lípidos

Los estrógenos tienen muchas acciones sobre el metabolismo de lípidos. En general, aumentan un poco las concentraciones séricas de triglicéridos y reducen escasamente las del colesterol total. No obstante, se cree que las acciones de mayor importancia son un incremento de las cifras de lipoproteína de alta densidad (HDL), especialmente la variedad HDL₂, por acción de una lipasa hepática y conversión a partir de lípidos precursores. Contrariamente, disminuyen los lípidos de baja densidad (LDL) y la apoproteína B y la lipoproteína (a) (Mendelsohn y cols., 1999). Los efectos anteriores sobre los lípidos circulantes se manifiestan como un efecto protector sobre la incidencia de enfermedad cardiovascular, incluyendo el infarto de miocardio y el accidente cerebro-vascular.

Además actúan también sobre las LDL oxidadas en su faceta como antioxidantes. En este sentido, podemos destacar algunos estudios como el de Sack y cols. publicado en 1994 (Sack y cols. 1994). Esta proporción beneficiosa entre lipoproteínas de alta y de baja densidad es un efecto secundario atractivo del tratamiento con estrógenos en postmenopáusicas.

La presencia de receptores de estrógenos en hígado sugiere que los efectos beneficiosos de los estrógenos sobre el metabolismo de las lipoproteínas se deben en parte a acciones hepáticas directas. Sin embargo, es imposible excluir otros sitios de acción.

Además de esos efectos sobre los lípidos plasmáticos, los estrógenos alteran la composición de la bilis al incrementar la secreción de colesterol y disminuir la secreción de ácidos biliares. Esto conduce a incremento de la saturación de bilis con colesterol, y parece ser la base para el aumento de la formación de cálculos biliares en algunas mujeres que reciben estrógenos.

4.5.3. Efectos de los estrógenos sobre los carbohidratos

Los estrógenos solos parecen disminuir un poco las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (Barrett-Connor, 1990), pero esto no parece tener acciones importantes sobre el metabolismo de carbohidratos.

4.5.4. Efectos de los estrógenos sobre las proteínas

Los estrógenos tienen acciones sobre muchas proteínas plasmáticas, en particular, en aquellas que participan en la unión a hormonas y las cascadas de coagulación. En general, los estrógenos tienden a incrementar las cifras plasmáticas de globulina de unión a cortisol (CBG o transcortina), globulina de unión a tiroxina (TBG), y globulina de unión a esteroides sexuales (SSBG), que se unen tanto a

andrógenos como a estrógenos. Se han efectuado muchos estudios bioquímicos y epidemiológicos acerca de los efectos de los estrógenos solos o en combinación con progestágenos sobre factores comprendidos en la coagulación.

4.6. Mecanismo de acción

Se cree que los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroides, actúan principalmente por medio de regulación de la expresión de genes. Los receptores de estrógenos se encuentran en las vías reproductoras femeninas, mamas, la hipófisis, el hipotálamo, hueso, hígado y otros órganos, así como en diversos tejidos en varones.

El receptor interactúa con secuencias de nucleótido específicas denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE) presentes en genes precondicionados, y esta interacción incrementa, o en algunas situaciones disminuye, la transcripción de genes regulados por hormonas. Además de los elementos de respuesta a estrógenos, muchos genes con capacidad de respuesta a estrógenos contienen elementos que median las acciones de otros factores reguladores. Esto puede proporcionar un mecanismo mediante el cual las señales provenientes de estrógenos y otros compuestos convergen en sitios genómicos comunes para integrar respuestas celulares a múltiples estímulos.

Además existen receptores estrogénicos de membrana, los cuales a su vez son estimulados por estrógenos y median respuestas indirectas a través de cascadas de señalización.

4.6.1. Receptores estrogénicos

Los receptores estrogénicos (RE) juegan un papel central en el proceso de activación de la transcripción génica por los estrógenos (Osborne y cols. 2001; Lee y cols. 2001). Existen dos tipos de RE, alfa y beta, que se diferencian tanto en sus propiedades como en su distribución tisular (Gruber y cols., 2002) (ver Figura I. 17). La estructura de ambos en cuanto a sus propiedades de reconocimiento de los estrógenos, unión al ADN y activación de la expresión génica permite suponer que actúan de manera similar (Palmieri y cols. 2002).

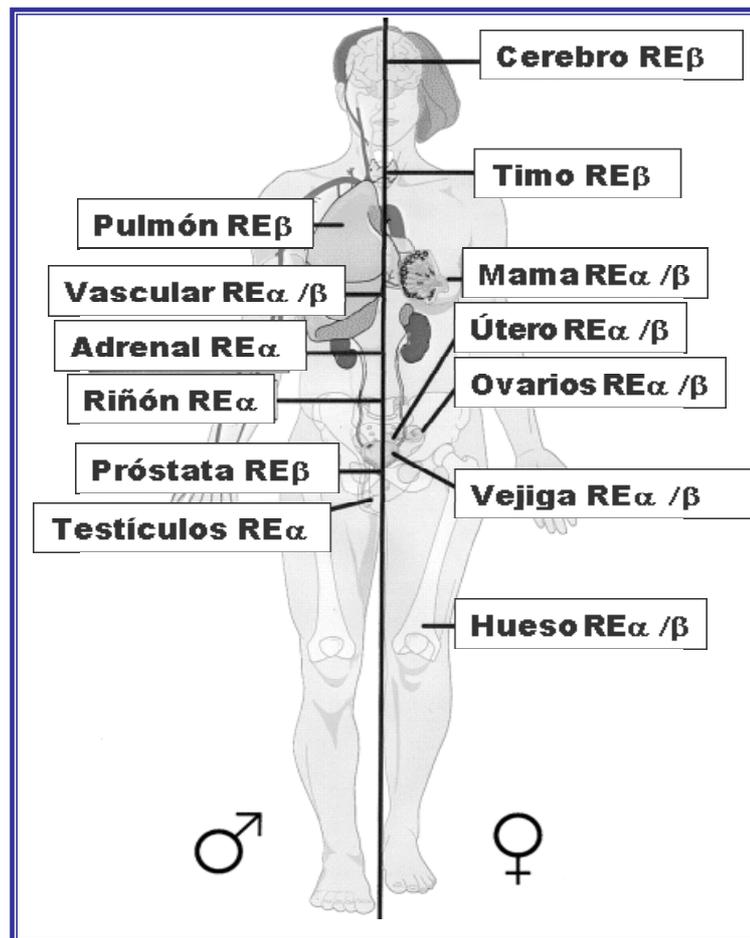


Figura I. 17.- Distribución de receptores estrogénicos.(Setchell y Cassady, 1999).

4.6.1.1. Receptores estrogénicos nucleares

El RE es una proteína monocatenaria, que en su estado nativo está unida a otras proteínas, como HSP90, que actúan como chaperones y la mantienen en estado inactivo. La llegada del estradiol al dominio de unión a la hormona del RE hace que se produzca interacción entre el esteroide y al menos tres aminoácidos del receptor. El resultado es que se produce un cambio conformacional en el RE que le hace perder afinidad por las proteínas que le acompañaban en su estado nativo, y se forma de un monómero estradiol-RE. El cambio de conformación del receptor conlleva que nuevas regiones de la proteína puedan llevar a cabo interacciones proteína-proteína y proteína. Los receptores estrogénicos, como los de andrógenos y otras hormonas esteroideas, interactúan con una gran variedad de proteínas con diferentes funciones. La primera reacción que se produce es una dimerización del RE: dos monómeros estradiol-RE reaccionan para constituir el homodímero o forma activa del receptor estrogénico. La consecuencia de ello es que el dímero es más nucleofílico que el receptor inactivo, y se localiza en el núcleo celular. El RE tiene dos dedos de zinc por los que es capaz de interactuar con regiones específicas del ADN denominadas Elementos de Respuesta Estrogénica (ERE). Los ERE están formados por dos secuencias de cinco nucleótidos específicos, separadas por tres nucleótidos indiferentes. La secuencia consenso del ERE es palindrómica, de modo que se lee indistintamente en ambas cadenas complementarias del ADN.

Los genes cuya transcripción es activada (o reprimida) por los estrógenos contienen uno o más ERE en su región promotora.

El RE contiene además dos dominios por los cuales es capaz de interactuar con las proteínas coactivadoras o corepresoras de la transcripción: TAF-1 (transcription-activation function-1), que está en la región aminoterminal y es activa en ausencia de hormona; y TAF-2, que se encuentra solapada con el dominio de unión a la hormona y sólo se activa cuando el RE se une al estradiol y forma homodímeros.

El reconocimiento de las secuencias ERE en el promotor del gen regulado por estrógenos por el homodímero de RE atrae sobre él a las proteínas coactivadoras. Éstas conectan el homodímero con el de transcripción, situado en la región rica en TA del promotor. Como consecuencia de esta interacción la RNA-polimerasa acelera su actividad transcritora y se acumulan en la célula múltiples copias del ARN-mensajero específico del gen regulado por estrógenos.

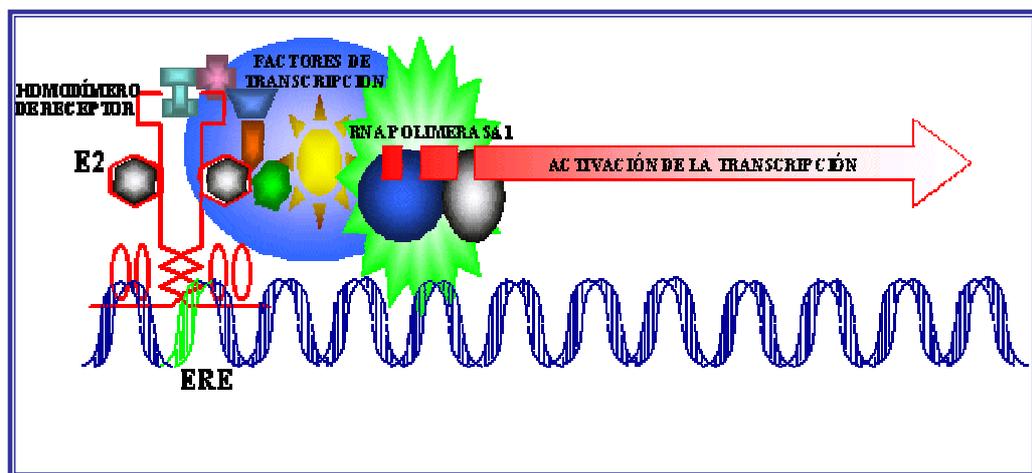


Figura I. 18.- Activación génica por los dímeros de receptor de estrógenos.

Por otro lado, cabe destacar que aunque el receptor alfa y el receptor beta guardan homología en su dominio de unión al DNA, tienen diferencias importantes en el sitio de unión a la hormona. Esto hace que posean afinidad de unión diferente por los diversos compuestos esteroideos, por ejemplo, el receptor α tiene mayor afinidad por el dietilestilbestrol (DES) que por el 17β -estradiol y a su vez por un modulador de receptores de estrógenos como es el tamoxifeno. El receptor β es más afín por el fitoestrógeno genisteína que por el tamoxifeno. Esto implica que de acuerdo a la distribución de los receptores en los tejidos, su acción será diferente (Kuiper y cols., 1998).

Como hemos señalado anteriormente, los estrógenos ejercen acciones a través de la unión con receptores localizados en el interior del núcleo. El efecto final de la unión de la hormona con el receptor es la transcripción de RNA mensajero y por lo tanto, la síntesis proteica. Hoy se sabe que entre estos dos extremos hay una serie de pasos intermedios que explican por qué un compuesto esteroideo puede tener diferentes acciones en diversos tejidos. Al unirse la hormona a su receptor se produce un cambio importante en la conformación espacial del mismo. A su vez, para que se logre la acción, deberá formarse un dímero de complejos hormona - receptor (ver Figura I. 18). Este dímero se une a un péptido llamado proteína adaptadora (represora o activadora) y todo este complejo se fijará al DNA para iniciar la transcripción. Si el esteroide que se ha unido al receptor es diferente, la conformación espacial que adquiera el complejo hormona - receptor será distinta y, por lo tanto, se unirá a otra proteína adaptadora; el resultado es que se fijará de manera

diferente al DNA de modo que la acción biológica resultante no será la misma (MacDonell, 1998)

En los últimos años se ha descrito otro tipo de receptores, denominados "receptores relacionados con el receptor de estrógenos", de los cuales se han localizado dos isoformas en el cerebro de rata. Se denominan receptores γ y forman parte de la superfamilia de receptores nucleares. Se expresan especialmente durante el desarrollo prenatal. La expresión de estos receptores podría estar relacionada con las diferencias que se observan en el desarrollo de áreas específicas del sistema nervioso central entre ambos sexos (Süsens y cols. 2000)

4.6.1.2. Receptores estrogénicos de membrana

Algunos de los efectos que ejercen los estrógenos sobre el aparato cardiovascular y sobre la activación del sistema nervioso son muy rápidos y no pueden ser explicados por su acción a través de receptores nucleares. Se ha postulado que existe otra vía por la cual pueden actuar los estrógenos, la "no genómica"; en este caso la presencia de canales de calcio en la superficie celular media el efecto de los estrógenos (Moss y cols., 1999; Gu y cols., 1999).

El modo de acción "no-genómico" del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es pues un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario, por esta razón debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana. Entre estos efectos rápidos se

encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas kinasas asociadas a la membrana, todos estos procesos ocurren en unos pocos segundos o minutos (ver Figura I. 19) (Nemere y cols., 1998; Watson y cols., 1999; Falkenstein y cols., 2000).

Este fenómeno de respuesta fisiológica rápida ante un esteroide fue descrito por primera vez en 1942 cuando el Dr. Hans Seyle observó en pacientes efectos anestésicos casi inmediatos después de la administración de progesterona. En 1967 Szego y Davis describieron por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos rápidos, “no-genómicos”, al demostrar el aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) *in vivo*, pocos segundos después del tratamiento con estradiol (Szego y cols., 1967). En 1977 Pietras y Szego demostraron la presencia de sitios específicos de unión a estrógeno en la superficie de células endometriales y más tarde lograron purificar receptores de estrógeno de membranas celulares provenientes de hepatocitos (Pietras y cols., 1977, 1979, 1980). Sin embargo, a pesar que estos efectos rápidos mediados por esteroides fueron descritos hace ya algún tiempo, la mayor atención en los últimos 30 años ha sido dedicada a estudiar los efectos genómicos mediados por estos receptores, parte de esto se debe al hecho de no haberse podido aislar hasta el momento y de esta manera caracterizar tanto estructural como funcionalmente estos receptores de membrana que median los efectos rápidos debidos a hormonas esteroideas.

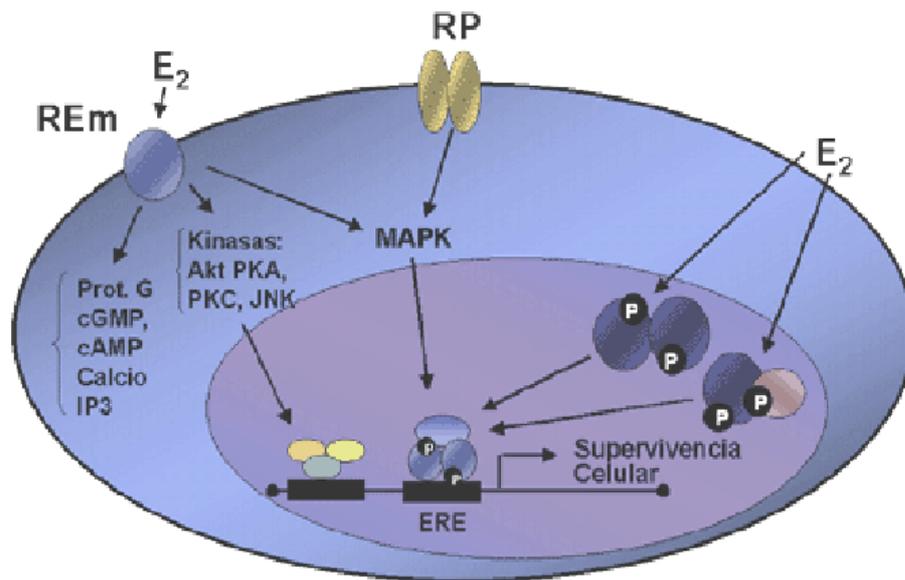


Figura I. 19.- Efectos “no genómicos” del receptor de estrógeno de membrana.

Hasta el momento, utilizando diferentes procedimientos se ha demostrado la presencia de receptores estrogénicos de membrana (REm) en distintos tejidos y líneas celulares. En la bibliografía existen trabajos publicados, utilizando E₂-BSA-FITC (17β-estradiol acoplado a albúmina y a fluoresceína), un compuesto impermeable, incapaz de penetrar la membrana, que demuestran la presencia de receptores de membrana estrogénicos en una línea celular de adenocarcinoma de mama, MCF-7 (ver Figura I. 20) (Berthois y cols., 1986; Marquez y cols., 2001).

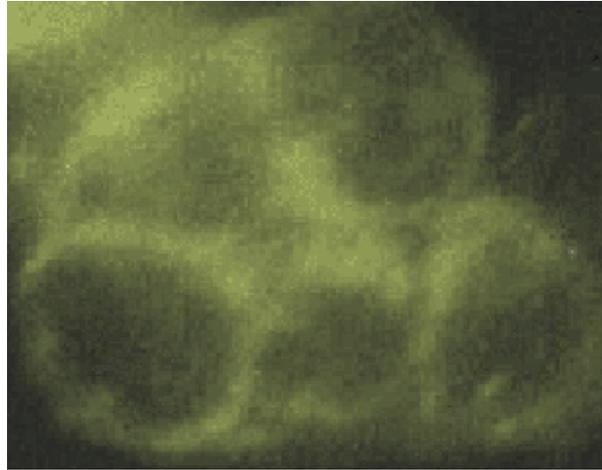


Figura I. 20.- Receptor de estrógeno de membrana en células MCF-7.

También, utilizando el mismo compuesto se demostró la presencia de RE_m en células endoteliales (Russell y cols., 2000) y en células CHO (células de ovario de Hamster) transfectadas con el gen del RE- α o RE nuclear (Razandi y cols., 1999), lo que sugirió que el RE_m podría originarse del mismo gen del receptor nuclear, sin embargo no se describió en este estudio por medio de cuáles mecanismos o modificaciones el receptor es dirigido hacia la membrana (Razandi y cols., 1999).

4.6.1.2.1. Efectos “no-genómicos” mediados por el Receptor de Estrógeno de Membrana

- **Útero:** La primera demostración de sitios específicos de unión a estrógeno fue hecha en células uterinas aisladas de rata en 1977 (Pietras y cols., 1977). Entre las funciones principales del RE de membrana en el útero están la activación de una o más cascadas de señales que puedan facilitar la absorción de compuestos mediada por hormonas, y la posibilidad de que la unión de la hormona a la membrana represente una manera de transportar el E2 en vesículas endocíticas hasta el núcleo para que ejerza su función nuclear (Pietras y cols., 1984).
- Estimulación en la producción de **corrientes de Calcio y nucleótidos cíclicos:** En células beta pancreáticas el E2 puede estimular el incremento en Ca^{2+} intracelular inducido por glucosa y los niveles de GMP cíclico (cGMP), esto sucede pocos segundos después de estimular con E2 y es un mecanismo que ocurre por asociación del RE con la guanilato ciclasa (GC) de la membrana celular. En monocitos, la producción de una corriente de Ca^{2+} después de estimular con E2, induce la producción de óxido nítrico (NO). Ambos eventos ocurren en 40 segundos (Stefano y cols., 1999). En células endoteliales el estrógeno o el compuesto impermeable a la membrana celular E2-BSA (17 β -estradiol acoplado a albúmina) puede estimular la producción de cGMP y NO

y activar además kinasas celulares (Chen y cols., 1999; Stefano y cols., 2000). Aumentos en cAMP han sido descritos también en células de cáncer de mama, células uterinas y músculo liso (Farhat y cols., 1996; Aronica y cols., 1994).

- **Sistema Cardiovascular:** Los mecanismos protectores de los estrógenos en el sistema cardiovascular son mediados por ambos receptores estrogénicos, tanto el nuclear como el de membrana (Mendelsohn y cols., 1999; Levin 1999, 2001). E2 tiene efectos rápidos que ayudan a preservar el flujo coronario, incluyendo la estimulación de la óxido nítrico sintetasa y la consecuente producción de NO y cGMP. E2 además inhibe canales de Ca^{2+} en músculo liso vascular (Nakajima y cols., 1995), reduciendo de esa manera la acción de ciertos vasoconstrictores que actúan a través de este mecanismo. Todo esto resulta en vasodilatación y mejor perfusión del corazón.
- **Sistema Óseo:** La deficiencia de estrógeno está asociada a una pérdida de hueso significativa. Existe evidencia de la presencia de sitios de unión y efectos agudos a estrógeno en osteoblastos y osteoclastos, entre ellos están, aumentos de Ca^{2+} intracelular, inositol (Korach, 1994; Stewart, 1994; Mendelsohn y cols., 1999) trifosfato y diacilglicerol, cAMP, cGMP, así como la activación de la Kinasa de Proteínas Activadora de Mitogénesis o MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Endoh, 1997; Nemere y cols., 1998).

- **Sistema Nervioso Central:** Utilizando diferentes modelos de isquemia cerebral tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado que el E2 es capaz de preservar tanto las neuronas como el endotelio neurovascular, además de limitar la extensión de la lesión y disminuir la mortalidad (Simpkins y cols., 1997). El uso de estrógeno después de la menopausia resulta en mejoría de funciones cognitivas y en una reducción de la incidencia de enfermedad de Alzheimer. En pacientes con síndrome de Turner mejora funciones motoras. En las células de pituitaria GH3/B6, es capaz de estimular la secreción de prolactina a través de la inducción de potenciales de acción (Zyzek y cols., 1981). Todos estos procesos antes mencionados son debidos a efectos rápidos, mediados por receptores de membrana capaces de activar cascadas de señales que si bien producen efectos que pueden ser medidos en pocos segundos o minutos, estos efectos rápidos muchas veces terminan en la activación de procesos “genómicos” y la inducción o inhibición de la expresión de ciertos genes.

4.7. La doble cara de los estrógenos: efectos beneficiosos y perjudiciales

La Figura I. 21 resume los efectos de los estrógenos sobre la mayoría de los tejidos sobre los que actúa.

Múltiples estudios demuestran el impacto negativo del hipoestrogenismo sobre distintos órganos y tejidos y a su vez demuestran el efecto beneficioso del reemplazo hormonal.

Los beneficios de la terapia hormonal sustitutiva (THS) son bien documentados y pueden considerarse a corto, medio y largo plazo. A corto plazo la acción de la terapia de reemplazo se hace notoria en la disminución de los síntomas vasomotores (sofocos) y en el control de los trastornos de la menstruación, mejoras a nivel urogenital y en la función sexual.

A medio plazo se encuentra disminución de la pérdida de la masa ósea y mejoría de la relación del colesterol HDL/LDL lo cual se traduce a largo plazo en disminución del riesgo de fracturas y de padecer enfermedad cardiovascular.

También se ha documentado su utilidad como preventivo de la enfermedad de Alzheimer y el cáncer de colon.

Varios estudios prospectivos han demostrado que la THS aumenta la esperanza de vida, se ha estudiado que el riesgo de la mortalidad por diversas causas en usuarias de terapia de reemplazo se reduce en un 20 a 50% en comparación con aquellas que no la reciben.

La terapia hormonal persigue los siguientes objetivos:

- 1- Tratar los síntomas vasomotores.
- 2- Evitar o revertir la atrofia urogenital y de piel.
- 3- Tratar y prevenir los síntomas de la esfera psíquica atribuibles al hipoestrogenismo.
- 4- Mejorar la disfunción sexual .

- 5- Prevenir la pérdida acelerada de masa ósea, reducir el riesgo de fracturas y osteoporosis.
- 6- Disminuir la morbimortalidad cardiovascular (prevención primaria y secundaria).

Al cumplir estos objetivos se estaría interviniendo en conseguir mejor calidad de vida. Así pues, la THS representa de verdad la primera intervención humana exitosa que modifica favorablemente el proceso fisiológico del envejecimiento.



Figura I. 21.- Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos

Hemos señalado algunos de los efectos beneficiosos de los estrógenos a diferentes niveles. No obstante, como puede observarse en la Figura I. 21, los estrógenos también ejercen algunos efectos no deseables en el organismo.

Los efectos desfavorables de los estrógenos son relativamente pocos, se pueden agrupar así:

1. Efectos sobre la coagulación: aumento de factores VII y X, aumento del fibrinógeno, disminución de la antitrombina III, y aumento de agregación plaquetaria, dichos fenómenos traerían un mayor aumento de la enfermedad trombo-embólica. Las pacientes con antecedentes de enfermedad trombo-embólica tendrían una contraindicación para uso de estrógenos, aunque existen estudios contradictorios al respecto.
2. Efecto sobre el sistema renina/angiotensina, los cuales causarían un discreto aumento de la hipertensión.
3. Efecto mineralocorticoide asociado con retención hídrica y aumento de peso. Al normalizarse el equilibrio hidrosalino se normaliza el peso ganado. Los estrógenos vuelven la mujer más activa y rápidamente el peso vuelve a lo normal.
4. Efecto oncogénico (riesgo de cáncer endometrial y cáncer de mama). En este sentido cabe destacar el estudio publicado en JAMA “Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial” el año pasado, en el que concluyen que los riesgos de la terapia hormonal sustitutiva exceden a los

beneficios de la misma en mujeres postmenopáusicas, si bien es de destacar, que la terapia hormonal sustitutiva suele incluir además de estrógenos, progesterona (Rossouw J.E. y cols., 2002).

Existen otras desventajas menos frecuentes que reajustando la dosis y controlando otros factores pueden volverse insignificantes:

1. Hemorragias uterinas: es la más frecuente, aparece habitualmente en el período de descamación del tratamiento cíclico y más raramente durante el curso del mismo. La intensidad de la hemorragia disminuye al avanzar la edad y disminuye con el uso de la terapia continua.
2. Aumento en la frecuencia de la histerectomía: se ha calculado una frecuencia mayor de histerectomía en mujeres con terapia frente a mujeres postmenopáusicas sin terapia.
3. Colelitiasis: Estudios recientes no han demostrado aumento en incidencia de colelitiasis. Se ha dicho que los estrógenos se eliminan por la bilis, lo que unido a cierto grado de colestasis puede predisponer a litiasis.

4.8. SERMs-Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógeno

En el tratamiento de los síntomas asociados con la menopausia se han utilizado medicinas que contienen estrógenos desde hace más de 50 años. Actualmente, es sorprendente que a pesar de los

beneficios que ofrece la terapia hormonal sustitutiva, es relativamente bajo el número de mujeres que inicia esta terapia y la que la inicia, usualmente no permanece en ella por más de un año, esto es en gran parte debido a que los estrógenos incrementan significativamente el riesgo a desarrollar cáncer de mama y útero. En consecuencia, nació la necesidad de crear drogas que conserven la función beneficiosa del estrógeno en los sistemas cardiovascular, nervioso y hueso, pero sin la función negativa que ejercen sobre la mama y útero, a estos compuestos se les llamó SERMS (Selective Estrogen Receptor Modulators) o moduladores selectivos de los receptores de estrógeno. El entendimiento de las bases moleculares del funcionamiento de los receptores esteroideos, en este caso del receptor de estrógeno, fue lo que permitió el desarrollo de este concepto. Desdichadamente no se ha encontrado el SERM ideal, pero algunos están siendo utilizados actualmente para el tratamiento de distintas patologías tales como el cáncer de mama y la osteoporosis.

Tamoxifeno: Es utilizado actualmente como tratamiento hormonal del cáncer de mama, es el SERM más conocido y estudiado. Fue descubierto hace 40 años en un momento en que no se conocía la posibilidad que algún químico o droga podía tener una función estrogénica en un tejido y antiestrogénica en otro, el concepto de SERM no existía ya que las bases moleculares de acción de los receptores esteroideos o de este tipo de drogas todavía no habían sido definidas.

El tamoxifeno, al igual que la mayoría de los SERMs, ejerce su acción primariamente al competir con el estradiol en la unión al RE y

alterar su conformación (ver Figura I. 22). *In vitro*, causa estancamiento de células de cáncer de mama que expresan RE, en la fase G1 del ciclo celular (Sutherland y cols., 1983) y disminuye los niveles de la ciclina D1 (Watts y cols., 1994). También, disminuye la expresión del factor de crecimiento tumoral alfa (TGF- α) y aumenta la expresión de TGF- β 1 y TGF- β 2 (Salomón y cols., 1999). En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, el tamoxifeno inhibe la fosforilación del receptor de crecimiento del factor semejante a la insulina (Insuline-like growth factor receptor) IGF-I (Guvakova y cols., 1997), pero en una línea celular endometrial (Ishikawa) produce el efecto contrario, es decir, induce la fosforilación del receptor, actuando de manera similar al estrógeno (Kleinman y cols., 1996). *In vivo*, inhibe el crecimiento de tumores de células MCF-7 implantados en ratones y previene el desarrollo de tumores mamarios en los modelos de ratones NMU y DMBA (Jordan y cols., 1976; Gottardis y cols., 1987). Similar al estradiol, en el útero, estimula la síntesis de IGF-I y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Huynh y cols., 1993; Hyder y cols., 1996).

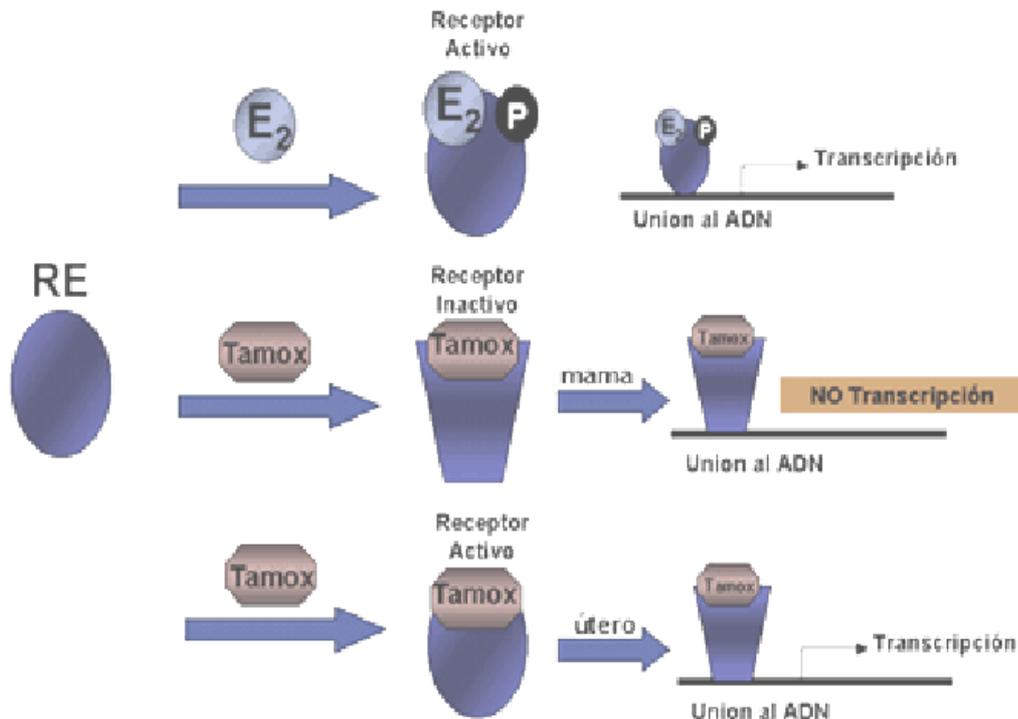


Figura I. 22.- Mecanismo de acción del Tamoxifeno

El uso clínico del tamoxifeno ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de tumores de mama que expresan RE (aproximadamente el 60-70% de los tumores al momento del diagnóstico) y si es tomada durante 5 años consecutivos previene la aparición de recurrencia del cáncer en un 42%.

Además esta droga fue aprobada recientemente para la prevención primaria de la aparición de cáncer de mama. Estudios clínicos demostraron que 20 mg de tamoxifeno diarios reducen en un 49% a 55% la incidencia de cáncer de mama.

Entre los efectos secundarios del tamoxifeno al que mayor importancia se le ha dado es el aumento en la incidencia de cáncer endometrial, debido al efecto agonista, tipo estrógeno que tiene el tamoxifeno en el útero (Fisher y cols., 1999). Otros efectos son los sofocos, pólipos endometriales, quistes, procesos tromboembólicos, etc. A pesar de los efectos secundarios de esta droga, entre ellos el más importante ha sido el del riesgo a desarrollar cáncer de útero, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (perteneciente a la OMS) recomendó que las mujeres recibiendo tamoxifeno no deben parar su tratamiento por este efecto secundario, ya que los beneficios en la sobrevivencia que esta droga ofrece son mucho mayores al riesgo a desarrollar cáncer de endometrio.

Por esta razón, esta droga ha sido utilizada exitosamente por más de 20 años en el tratamiento del cáncer de mama, y aunque ha existido la preocupación de diseñar otras drogas mucho más selectivas sin estos efectos negativos, hasta el momento no se ha aprobado ninguna que pueda sustituirla.

Raloxifeno: Esta droga comenzó a ser estudiada cuando se descubrieron los efectos no deseados del tamoxifeno, surgió la necesidad de utilizar otros moduladores selectivos que no tuvieran estos efectos negativos. El raloxifeno fue aprobado hace unos pocos años para el tratamiento de la osteoporosis por el efecto que ejerce en el mantenimiento de la densidad ósea en mujeres postmenopáusicas. Esta droga tiene efecto en la mama antiestrogénico también, pero sin el efecto estrogénico sobre el útero. Así como el tamoxifeno, disminuye la síntesis de LDL, sin afectar la de HDL y no tiene efectos negativos sobre la memoria.

Fitoestrógenos: Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de las plantas que poseen una débil actividad estrogénica. Comprenden 4 grupos químicos: lignanos, isoflavonas, cumestanos y lactonas del ácido resorcílico, siendo el grupo más estudiado las isoflavonas, principalmente las derivadas de la soja como son: Genistéina y Daidzeína. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el alto contenido de soja en la dieta está asociado a una menor incidencia de ciertas patologías, como son la enfermedad cardiovascular, algunos cánceres hormonodependientes, como el de mama, endometrio, próstata y colon, la sintomatología climatérica, la osteoporosis, y las alteraciones del ciclo menstrual. Dado que estos compuestos exhiben una acción agonista o antagonista estrogénica que es tejido-específica, han sido agrupados dentro de los SERMs. También se ha postulado como responsable de su acción agonista estrogénica, su unión específica al receptor estrogénico β , además de la activación de otro tipo receptores que estarían vinculados con su potencial anticancerígeno. Numerosos estudios han demostrado su potencial para disminuir los sofocos, mejorar los parámetros de riesgo cardiovascular, prevenir la pérdida mineral ósea asociada a la menopausia, y mejorar la atrofia genitourinaria posmenopáusica. Por otra parte, varios estudios han encontrado que estas moléculas inhiben ciertas enzimas implicadas en la diferenciación y crecimiento tumoral, así como bloquean la proliferación *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama.

La Figura I. 23 nos muestra la gran similitud que existe entre las estructuras químicas del 17β -estradiol y la genisteína, el fitoestrógeno más abundante en la soja.

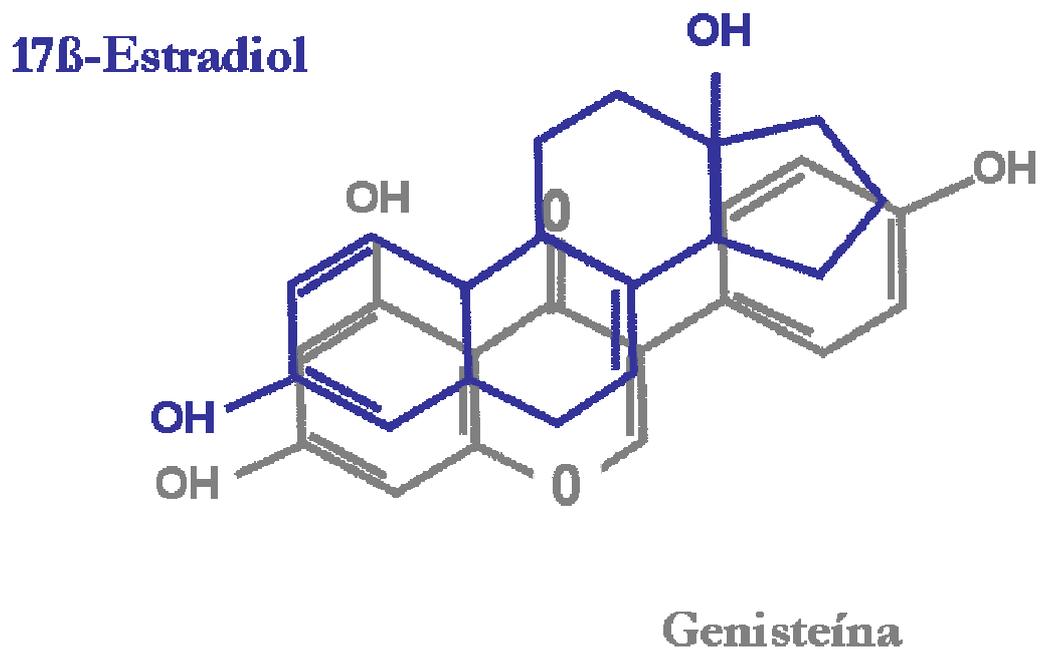


Figura I. 23.- Similitud entre las estructuras del 17β -estradiol y la genisteína.

La Tabla I. 8 resume algunas de las acciones antioxidantes mencionadas anteriormente y las referencias bibliográficas donde pueden encontrarse.

Fitoestrógenos	Acción	Referencias
Isoflavonas and lignanos	Antioxidantes	Wei y cols, 1993
Genisteína, Equol, Enteronolactona, Enterodiol	Inhibición de daño oxidativo al DNA	Harper y cols., 1999
Genisteína	Inhibición producción O ₂ ⁻ y H ₂ O ₂ (5-50 µM)	Wei y cols., 1995
Genisteína	Inhibición peroxidación lipídica y oxidación LDL (< 20 µM)	Patel y cols., 2001
Genisteína y Daidzeína	Inhibición oxidación LDL (10 µM)	Wilson y cols., 2002
Fitoestrógenos	El n° y posición de OH determina el efecto antioxidante	Arora y cols., 1998
Genisteína	↑ Actividad SOD y GST en ratones	Cai y cols., 1996
Soja	↓ Concentración de LDL oxidadas en sangre	Kanazawa., 1995 Tikkanen., 1998 Jenkins y cols., 2000
Leche de soja	↓ Oxidación DNA en linfocitos	Mitchell y cols., 1999

Abreviaturas.- LDL: Lipoproteínas de baja densidad (“Low Density Lipoproteins”); SOD: superóxido dismutasa; GST: Glutación-S-Tranferasa

Tabla I. 8.- Resumen de algunas acciones antioxidantes de los fitoestrógenos existentes en la bibliografía.

Entre otros SERMs que se encuentran en proceso de estudio tanto a nivel molecular como a nivel clínico están el Toremifeno, Droloxifeno, Idoxifeno, Droloxifeno, ICI 182,780, LY353381, GW5638, etc. En algunos años nos encontraremos con la difícil tarea de comparar todos estos compuestos para determinar cuales son más específicos y con menos efectos secundarios de acuerdo a la patología a tratar.

4.9. Conclusiones

Los estrógenos juegan un rol central en la fisiología del organismo. El modelo clásico o “genómico” de acción del RE sugiere que el receptor al unir la hormona es capaz de activar la transcripción de genes que participan en el control del crecimiento y proliferación celular. Dos receptores de estrógeno que cumplen esta función han sido identificados, el RE α y el RE β , en conjunto con una serie de proteínas activadoras y represoras. Además han sido descritos efectos rápidos mediados por esteroides, que estimulan señales intracelulares. Estos efectos “no genómicos” son mediados por receptores de membrana, sin embargo la identidad de estos receptores no ha sido descrita aún. La existencia de los receptores tanto nucleares como de membrana al mismo tiempo, es común en diversos tipos celulares y muy probablemente estas dos vías de señalización convergen para ejercer el control de distintos procesos celulares. El entendimiento de la fisiología tan compleja del RE a nivel molecular y el rol que cumple en distintas patologías lo hace una herramienta farmacológica invaluable. Esto ha hecho que las opciones terapéuticas que repercuten en la obtención de mejor salud

para la mujer hayan evolucionado dramáticamente en los últimos 30 años. El conocimiento detallado del RE desde el punto de vista de su estructura, subtipos, distribución e interacción con otras proteínas que determinan su función va a permitir el desarrollo de nuevos SERMs que puedan tener el efecto deseado en un tejido determinado y con muy poco o ningún efecto secundario. Algún día, en un futuro no muy lejano, muy probablemente la paciente y su médico tendrán a su alcance la posibilidad de elegir cuál es el compuesto más adecuado para tratar y/o prevenir una o varias patologías sin tener que sufrir las consecuencias o riesgos de efectos no deseados.

5. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

5.1. Concepto de envejecimiento

Hasta ahora no disponemos de una definición universalmente aceptada del proceso de envejecimiento. Denham Harman lo define como la acumulación progresiva de cambios con el tiempo, que provocan el aumento de probabilidad de enfermedad y muerte del individuo. Se puede definir también como el deterioro de las estructuras y funciones que llegan a un pico o meseta máximos durante el desarrollo, crecimiento y maduración de todos los individuos de una especie dada. Bernard Strehler, reconocido gerontólogo americano, define el envejecimiento a través de cuatro postulados:

- El envejecimiento es **universal**, es decir, un fenómeno dado asociado al proceso de envejecimiento debe darse en menor o mayor medida en todos los individuos de una especie.
- El envejecimiento es **intrínseco**, es decir, las causas que lo provocan deben de ser de origen endógeno, no dependiendo de factores externos o de origen ambiental.
- El envejecimiento es **progresivo**, los cambios que conducen a envejecer se dan de manera paulatina a lo largo de la vida.

- El envejecimiento es **deletéreo**, es decir que un determinado fenómeno sólo se considerará parte del proceso de envejecer si es dañino.

5.2. Consecuencias del envejecimiento

Prácticamente todas las funciones fisiológicas pierden eficiencia. En general, podemos afirmar que se produce la pérdida de la capacidad para mantener estable el medio interno del individuo frente a las perturbaciones del ambiente (pérdida de homeostasis). Un ejemplo de esto, es la menor capacidad de las personas mayores para soportar temperaturas extremas, infecciones y situaciones de estrés en general. Así pues, la fuerza y elasticidad en el sistema músculo-esquelético se deterioran, se produce un descenso de la filtración de los riñones, de la ventilación de los pulmones o del flujo máximo sanguíneo. Aparece un aumento de la intolerancia a la glucosa, pérdida de visión, audición, memoria, coordinación motora y otras funciones fisiológicas de importancia.

La mayoría de los órganos vitales van a sufrir fenómenos de atrofia o degeneración. Esto es más notable en aquellos órganos compuestos por células postmitóticas como son las neuronas, células miocárdicas, musculares o las del parénquima renal. Además se da una degradación con la edad de los materiales que se encuentran entre las células. Esto ocurre debido al descenso en el número de fibras de elastina o al entrecruzamiento de las fibras de colágeno en la dermis.

También se puede apreciar asociado al envejecimiento, un aumento en la sensibilidad a los traumatismos, las infecciones y

muchas formas de estrés, así como un funcionamiento deteriorado del sistema inmunitario que da lugar a enfermedades autoinmunes o amiloidosis.

Se dan más casos de cáncer y de enfermedades degenerativas en ancianos, que son la mayor causa de muerte y de pérdida de una buena calidad de vida.

5.3. Longevidad

Dentro del término “longevidad” se incluyen 2 conceptos diferentes: longevidad máxima y longevidad media. La longevidad media se define como la media de la esperanza de vida al nacer de los individuos de una determinada especie (López-Torres y cols., 1991). La longevidad máxima es la edad máxima que un individuo de una determinada especie puede alcanzar. De este modo, sabemos que la longevidad media de la especie humana ha aumentado considerablemente a lo largo de la Historia. Esto ha tenido lugar debido al descenso de la mortalidad infantil, del neonato y de la madre, al descubrimiento de los antibióticos, de las vacunas y en general a la mejora del control de las enfermedades infecciosas, así como a una nutrición más elaborada, mejores condiciones higiénicas y mejora en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes, etc.

Sin embargo, no se ha demostrado que exista un aumento en la longevidad máxima. En la antigüedad también había personas que alcanzaban edades avanzadas de 80-90 años o más, aunque el porcentaje era mucho más bajo que en nuestros días. El aumento en longevidad media ha producido un crecimiento del segmento poblacional entre 60 y 100 años. Por ello, cobran gran importancia

enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, los cánceres, la aterosclerosis y en general, todas aquellas que afectan con más probabilidad a este grupo de edad avanzada.

Los avances en investigación acerca de la longevidad han tenido idénticos resultados, es decir, se ha conseguido aumentar la longevidad media en varias líneas de investigación, pero son pocos los avances en el aumento de la longevidad máxima. La longevidad media ha podido modificarse mediante antioxidantes dietéticos, nivel de actividad, etc. pero la única terapia que parece concluyente para aumentar la longevidad máxima es la restricción calórica. Ya en 1934 McCay y colaboradores (revisado en Swan y cols., 1997) describen este fenómeno y más recientemente Walford y Weindruch (Walford, 1995; Weindruch y cols., 1996) descubren que se puede aumentar la longevidad máxima con una restricción calórica que no necesariamente debe darse desde el nacimiento, sino que puede comenzar tardíamente en la vida, siempre y cuando se mantengan unos niveles adecuados de vitaminas, minerales y proteínas. Esto aún no ha podido ser demostrado en humanos, pero está en marcha un experimento en simios que aportará datos en pocos años.

5.4. Teorías del envejecimiento

Han existido muchas teorías para darle una explicación al fenómeno del envejecimiento y aun hoy en día no se sabe a ciencia cierta cuáles son las causas que lo provocan. Podemos dividir las en:

- **Teorías Orgánicas:** Inmunológica, Neuroendocrina.
- **Teorías Celulares:** Límite de la Duplicación Celular.

- **Teorías de Envejecimiento Programado:** Programa Genético de Envejecimiento
- **Teorías Evolutivas.**
- **Teorías Moleculares:** Acumulación de Productos de Desecho, Entrecruzamientos, Mutaciones Somáticas, “Errores Catastróficos”, Teoría de los Radicales libres

5.4.1. Teorías Orgánicas

5.4.1.1. Teoría Inmunológica

Postula que el proceso de envejecimiento se debe a una disminución de las defensas del organismo frente a infecciones y agentes extraños. Al envejecer se altera la producción de anticuerpos, disminuye el número de linfocitos T, se atrofia el timo (de ahí las terapias de inyección de hormonas tímicas o interleukina 2), aumenta el número de enfermedades autoinmunes y de cánceres.

Harman apoya la idea de que el descenso de las capacidades del sistema inmune ligado a la edad es secundario al incremento de las reacciones de autoinmunidad (Harman, 1981). Por lo tanto, cambios postraduccionales mutagénicos en las proteínas inducirían un reconocimiento del sistema inmune como extraño. Pero al disminuir la capacidad de reconocimiento inmune, estas proteínas anómalas podrían desarrollar funcionalidades dañinas. Así mismo, Burnet (Burnet, 1970) sugirió que al aumentar la edad también lo hacen la cantidad de clones de linfocitos que dan lugar a anticuerpos contra antígenos del propio huésped.

5.4.1.2. Teoría Neuroendocrina

Se basa en los cambios degenerativos que el cerebro y el sistema nervioso muestran con la edad. El sistema nervioso junto con el sistema endocrino, controlan la homeostasis, es decir, mantienen estable el medio interno frente a todo tipo de perturbaciones. Al degenerar el sistema nervioso, también lo harán los órganos sujetos a su control. Un apoyo a esta teoría es el hecho de que la restricción calórica, que retrasa el proceso de envejecimiento, disminuye los niveles de insulina y de glucosa en sangre, aumenta los glucocorticoides de forma moderada, eleva la secreción de adrenalina y de otras catecolaminas procedentes de las glándulas adrenales, así como la actividad del sistema nervioso simpático (Kemnitz y cols., 1994).

Estas 2 teorías tienen el inconveniente de no explicar la degeneración de ambos sistemas, neuroendocrino o inmunitario. También carecen de universalidad, ya que existen especies con sistemas inmunitarios o neuroendocrinos poco desarrollados y que no por ello envejecen después que otras.

5.4.2. Teorías Celulares

5.4.2.1. Teoría del Límite de la Duplicación Celular

Fue propuesta por Leonard Hayflick a finales de la década de los setenta (Hayflick, 1980). Hayflick observa que al cultivar fibroblastos *in vitro* el número de duplicaciones celulares es limitado y tanto mayor cuanto más larga es la longevidad máxima de la especie

donante. Aunque una observación importante, es incapaz de explicar el envejecimiento de células que no se duplican como pueden ser las neuronas, las células coronarias o las musculares. Incluso refiriéndonos a células con capacidad mitótica (las del epitelio germinal de la piel y mucosa intestinal, o células madre de la médula ósea o del bazo) no explicaría los sucesos *in vivo*, ya que son experimentos *in vitro* y parece que el número de duplicaciones que Hayflick encontró (50 veces en fibroblastos humanos) ha podido aumentarse mejorando las técnicas de cultivos celulares. Aun así, tampoco explicaría por qué las células dejan en un momento dado de duplicarse.

Más recientemente, ha despertado mucha expectación una observación realizada por Yu en 1990 (Yu y cols., 1990), el cual encuentra que en *Tetrahymena* se requiere la presencia del enzima telomerasa para mantener su inmortalidad. En cada división celular se van perdiendo fragmentos de DNA en los extremos de los cromosomas (telómeros) y es este enzima el que evita este fenómeno. Cuando el enzima se inactiva o no se expresa, la célula moriría al perder DNA codificante. Se encontró que los telómeros de algunos tejidos somáticos se acortaban, mientras que los de tejidos germinales permanecían intactos. De todas formas, esta teoría tampoco podría explicar el envejecimiento de las células postmitóticas.

5.4.3. Teorías del envejecimiento programado

5.4.3.1. Programa genético de envejecimiento

En esta teoría se propugna que existe un control genético en el que de forma paulatina y comenzando desde el momento de nuestro nacimiento, se va deteriorando el organismo hasta llegar a su muerte. Flodin ve al genoma nuclear como un “reloj molecular” responsable de programar los cambios que se irían presentando en el desarrollo de un organismo a lo largo de su vida (Flodin, 1984). La marcada variabilidad entre las especies y la relativa constancia en la longevidad dentro de una especie, permitirían apoyar la idea del control genético del ciclo vital. Sin embargo, muchos piensan que un programa de envejecimiento activo difícilmente podría haber evolucionado, ya que la fuerza de la selección natural disminuye enormemente tras la edad reproductiva, y es entonces cuando se manifiesta el envejecimiento.

5.4.4. Teorías evolutivas

Este conjunto de teorías no se contraponen con las anteriores, sino complementarias. Teorizan porqué cada especie animal tiene una determinada longevidad máxima o velocidad de envejecimiento, en vez de abordar el envejecimiento desde el punto de vista de cómo envejecemos, tema que tratan las anteriores. Una de estas teorías es la de la distribución de la energía entre esfuerzo reproductivo y mantenimiento de los órganos corporales, que basa en la observación de que existe una relación inversa entre potencial reproductivo y longevidad.

Otra hipótesis evolutiva es la de la presión de predación, desarrollada por Steven Austad en los últimos años (Austad, 1997). Si una especie sufre pocos ataques mortales de predadores, la selección natural actuaría haciendo que la especie sufra un aumento en su longevidad.

Lo que ocurre con estas teorías es que es difícil explicar cómo pueden transmitirse los genes para aumentar la longevidad entre las generaciones, si los individuos viejos se reproducen en menor grado que los jóvenes.

5.4.5. Teorías Moleculares

5.4.5.1. Teoría de la Acumulación de Productos de Desecho

Se basa en el hecho de que en todas las células postmitóticas se van acumulando con el tiempo productos del metabolismo que no pueden ser renovados, de entre los cuales el más característico corresponde a los gránulos de lipofucsina, perfectamente visibles al microscopio óptico. Están compuestos de lípidos y proteínas altamente entrecruzados, insolubles y probablemente oxidados (Dillard, 1984). Parecen provenir en gran medida de los lisosomas y se ha demostrado que no son dañinos para la célula, en contra de lo que se creía en un principio. Es decir, más que una causa del envejecimiento los gránulos de lipofucsina serían un buen marcador del mismo.

5.4.5.2. Teoría de los Entrecruzamientos

Fue propuesta por Björkstén (Björkstén, 1974) y se basa en que en el metabolismo celular se producen sustancias que favorecen la unión de macromoléculas, como el DNA o las proteínas. Este proceso aumenta la resistencia de estas moléculas a su degradación y, en el caso del DNA, puede dar lugar a mutaciones. Además, se produce una pérdida de la solubilidad de las macromoléculas y disminuye la permeabilidad y elasticidad de las membranas, al tiempo que aumenta la viscosidad de los tejidos. El estudio más extensivo sobre el fenómeno del entrecruzamiento fue realizado en el colágeno, molécula presente en la matriz extracelular de prácticamente todos los tejidos. El número de puentes cruzados en el colágeno aumenta con la edad, lo que favorece su insolubilidad (Wess y cols., 1996) y son la base de las lesiones arterioscleróticas. Sin embargo, este fenómeno parece importante sólo en las macromoléculas de vida larga como el colágeno, mientras que otras se renuevan con tal rapidez que el entrecruzamiento carecería de importancia.

Recientemente, los científicos han centrado sus investigaciones en la glicosilación de proteínas u otras moléculas. Se ha demostrado que este fenómeno se da en individuos de edad avanzada y en la *Diabetes mellitus*, patología modelo de envejecimiento prematuro (Monnier y cols., 1984). Los complejos formados por la glucosa con otros compuestos comienzan cuando un grupo aldehído de la glucosa reacciona con un amino de la otra molécula formándose una base de Schiff (Cerami, 1987). Este producto formado es inestable y da lugar a un llamado producto de Amadori reversible. Estos reaccionan con otros dando finalmente productos irreversibles glicosilados.

5.4.5.3. Teoría de la Mutaciones Somáticas y Teoría de los “errores catastróficos”

Orgel supone que los errores se producen en las enzimas responsables de la transferencia de información de DNA a proteínas (Orgel, 1965). Esto daría lugar, a su vez, a la formación de nuevas enzimas erróneas, lo que amplificaría el problema.

Aunque estas 2 teorías son ciertas, tampoco explicarían la causa de las mutaciones o errores iniciales.

5.4.5.4. Teoría de los Radicales libres

Una de las teorías más relevantes para explicar el envejecimiento es la Teoría del Envejecimiento por Radicales Libres, que fue propuesta inicialmente por Harman en la década de los años 50 (Harman, 1956).

El desarrollo de la presente tesis, se sustenta principalmente en esta teoría, por ello prestaremos una mayor atención a la misma.

La Teoría de los Radicales Libres enunciada por Harman en 1956 propone que los radicales libres derivados de oxígeno son los responsables del daño asociado oxidativo a la edad. Los sistemas antioxidantes no son capaces de hacer frente a todas las especies reactivas de oxígeno que se generan continuamente a lo largo de la vida de la célula, lo que acaba provocando un daño oxidativo en ella, y por extensión sobre los tejidos.

Existen muchas pruebas experimentales a favor de esta teoría. Los animales viejos presentan mayores índices de oxidación que los jóvenes y se acumulan proteínas oxidadas, formas oxidadas del DNA y

de lípidos (Stadman, 1992; Sohal y cols., 1993). En principio, esto podría atribuirse a una tasa mayor de radicales libres generados por los organismos viejos. Otras evidencias experimentales que soportan esta teoría como posible causa del proceso de envejecimiento, son el aumento de la vida media obtenido incrementando las defensas antioxidantes y la implicación de las especies de oxígeno reactivas en los procesos degenerativos relacionados con la edad (Harman, 1978). Se ha comprobado que la administración de antioxidantes puede aumentar la vida media en moscas (Miquel y Economos, 1980; Viña y cols., 1992). Así mismo, Orr y Sohal han encontrado recientemente que la expresión simultánea de los genes de la superóxido dismutasa cobre/zinc y de la catalasa en *Drosophila melanogaster* transgénicas aumenta su vida máxima (Orr y Sohal, 1994).

Por otra parte, los Radicales libres de oxígeno y los peróxidos son generados continuamente en la cadena de transporte mitocondrial (Boveris y Chance, 1973; Chance y cols., 1979). Además, cerca del 1-2% del oxígeno usado por la mitocondria de mamíferos en estado 4 no da lugar a agua, sino especies activadas del oxígeno (Boveris y Chance, 1973; Chance y cols., 1979).

Sobre la base de todo esto, Miquel y colaboradores proponen en 1980 la **Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular** (Miquel y cols., 1980). Esta teoría sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los radicales de oxígeno al genoma mitocondrial en células postmitóticas fijadas (Miquel y cols., 1980). Las mitocondrias de las células postmitóticas consumen O₂ a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (Miquel y Fleming, 1986).

La Teoría Mitocondrial del Envejecimiento se ha probado recientemente en varios laboratorios, y existe en la bibliografía una gran cantidad de evidencias experimentales que la apoyan. Diversos autores han comprobado que las mitocondrias de animales viejos producen más radicales libres que las de los jóvenes (Sohal y cols., 1990; Sastre y cols., 1996, 1998). Además, existe una relación inversa entre la producción mitocondrial de peróxidos y la longevidad de los mamíferos (Sohal, 1991; Barja y cols., 1994;). Estos resultados apoyan la idea de que la generación de prooxidantes es un factor crítico en la velocidad del envejecimiento (Sohal, 1991). Así mismo, se ha demostrado que el daño oxidativo al DNA mitocondrial, proteínas y lípidos sobrevienen a lo largo del envejecimiento (Richter, 1988; Shigenaga y cols., 1994; Benzi y Moretti, 1995; García de la Asunción, 1996; Sastre y cols., 1996, 1998), y que la generación de peróxidos por la mitocondria aumenta con la edad (Sastre y cols., 1996, 1998). El papel de las mitocondrias viejas en el envejecimiento celular se ha demostrado microinyectando mitocondrias aisladas a partir de fibroblastos de ratas viejas, donde se veía que las células inducidas degeneraban (Corbisier y Remacle, 1990).

La generación continua de ROS por la mitocondria a lo largo de la vida celular, produce un estrés oxidativo mitocondrial “crónico” relacionado con la edad, que juega un papel clave en el envejecimiento. Más aún, la mitocondria de especies que viven periodos de tiempos más cortos produce relativamente cantidades más elevadas de ROS que aquella procedente de especies que viven más (Sohal y cols, 1990; Sohal, 1991; Barja y cols., 1994). De este modo, la velocidad de producción de ROS aparece como

determinante en el potencial de vida máxima (Pérez-Campo y cols., 1998).

El papel de la mitocondria en el envejecimiento celular también se ha relacionado con las pérdidas funcionales mitocondriales a lo largo del proceso de envejecimiento (Miquel y cols., 1980; Shigenaga y cols., 1994). Así, la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas decrece con la edad en hígado, músculo esquelético y cerebro. Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que el potencial de membrana mitocondrial decrecía con la edad y que aumentaba el tamaño mitocondrial en el envejecimiento (Sastre y cols., 1996). También se ha publicado que existe una disminución de los transcriptos mitocondriales relacionados con la edad en algunos tejidos de rata y en *Drosophila* (Calleja y cols., 1993). Debemos tener en consideración la expresión del 16S rRNA mitocondrial, la cual se ve disminuida en los procesos de estrés oxidativo (Crawford y cols., 1997). Además, la expresión de este gen mitocondrial disminuye con la edad, y esta disminución se correlaciona con la curva de supervivencia en *Drosophila* (Calleja y cols., 1993). Así pues, la expresión del 16S rRNA puede ser considerada como un marcador de envejecimiento celular.

Así mismo, se ha encontrado una disminución en la actividad de algunas proteínas transportadoras aniónicas con la edad, como los transportadores de fosfato y dicarboxilatos en mitocondrias de hígado (Sastre y cols., 1996) y los transportadores acilcarnitina-carnitina, de Ca^{2+} , de nucleótidos de adenina y de piruvato en mitocondrias de corazón. Sin embargo, otros autores han estudiado la tasa de producción de radicales libres en diversos tejidos de rata, sin encontrar un incremento con la edad o bien, han encontrado un

pico en edades intermedias, pero no en edades avanzadas. De este modo, sería más acertado estudiar marcadores de estrés oxidativo en lugar de producción de radicales libres. Este sería el caso de marcadores de peroxidación lipídica, como el etano y pentano del aire espirado, ya que se considera como un factor esencial en el envejecimiento de células aerobias (Lippman, 1985) y se sabe que forma parte de la etiología y patogenia de enfermedades asociadas con la edad avanzada (Vladimirov, 1986). De este modo, ha sido comprobado que los animales viejos presentaban un incremento de la oxidación en sus tejidos.

Otro marcador de estrés oxidativo utilizado para estudiar el envejecimiento, ha sido la oxidación proteica. Vitorica y colaboradores se interesaron por el daño asociado a enzimas específicas que se inactivan con la edad (Vitorica y cols. 1986). Muchas modificaciones post-traduccionales acumuladas en el viejo se deben a la acción de radicales libres (Stadman, 1992). En este proceso, aminoácidos tales como la prolina, la arginina y la lisina se oxidan para dar derivados carbonilos, es decir, aldehídos.

El daño oxidativo asociado al DNA puede ser el más importante de todos los mencionados. El grupo de Bruce Ames en California ha calculado que los radicales libres del oxígeno modifican cada día aproximadamente diez mil bases de DNA por célula (Ames y cols., 1993). Las enzimas reparadoras del DNA son capaces de eliminar la mayoría de estas lesiones, pero no todas. Por tanto, las lesiones no reparadas del DNA, como la 8-oxodG se acumulan con la edad y se sabe que es el DNA mitocondrial el que mayor cantidad de oxidación presenta, no el nuclear (Richter y cols., 1988). Nuestro grupo demostró que la oxidación del DNA mitocondrial se

correlaciona con la del glutatión mitocondrial (García de la Asunción y cols., 1996).

La teoría del envejecimiento por Radicales Libres y la teoría Mitocondrial de Envejecimiento resultan especialmente atractivas debido a que permiten una intervención racional, por ejemplo, la administración de antioxidantes podría retardar el daño que acompaña al proceso de envejecer. Además, se tratan de dos teorías que podrían explicar prácticamente todos los fenómenos descritos en las teorías anteriores: la pérdida de capacidad del sistema inmunitario y neuroendocrino con la edad, el límite de la duplicación celular de Hayflick, la acumulación de lipofucsina, la formación de puentes cruzados intermoleculares, las mutaciones somáticas, o los errores de Orgel.

5.5. Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento

Cutler observó que diversos antioxidantes tales como la vitamina E, el urato, la ceruloplasmina y la actividad superóxido dismutasa en diferentes organismos muestran una correlación con la tasa metabólica multiplicada por la longevidad máxima de cada especie (Cutler, 1991). Consecuentemente, propuso que la duración de la vida se debería correlacionar con la capacidad de protección antioxidante. En esta línea, Orr y Sohal consiguieron moscas *Drosophila melanogaster* doblemente transgénicas, que sobre expresaban superóxido dismutasa Cu, Zn-dependiente y catalasa, y vieron que la disminución del estrés oxidativo se correlaciona con el aumento de la longevidad media y máxima de las moscas (Orr y

Sohal, 1994). Además, se enlentece el proceso de envejecimiento ya que las moscas transgénicas presentan un retraso en la pérdida de la capacidad física y niveles inferiores de daño oxidativo a proteínas. Sin embargo, no se observó efecto en la elongación de la vida con la sobreexpresión de estas enzimas por separado (Orr y Sohal, 1992).

Un punto a destacar de gran importancia es la interrelación de los antioxidantes celulares. Personas con defectos en la absorción de vitamina E o niveles bajos de GSH muestran diversas patologías, pero no un envejecimiento acelerado. El grupo de Barja observó que inhibiendo la actividad catalasa en ranas, se induce una mayor actividad superóxido dismutasa, glutatión reductasa y aumenta la síntesis de glutatión y de ácido ascórbico. Esto daba lugar a un aumento en la longevidad media de las ranas (López-Torres y cols., 1993). Es decir, los organismos tienden a mantener la homeostasis de sus defensas antioxidantes y es difícil que los antioxidantes celulares actúen por separado, ya que en realidad se encuentran tan íntimamente relacionados que los cambios en un antioxidante afectarían al resto (Cutler, 1991; López-Torres y cols., 1993).

6. ENVEJECIMIENTO Y GÉNERO

Durante 1999 se celebró el Año Internacional de las Personas Mayores. Este tiempo sirvió para reflexionar y comprobar que la esperanza de vida en la mayoría de los países ha aumentado más de 30 años en el siglo XX. Hasta hace poco tiempo cumplir 65 años se consideraba el principio de la vejez, pero hoy ya se sube esta marca a los 85 años. En este contexto, se sabe que se ha alargado la edad de las mujeres 8 años más que en los varones, aunque conforme envejece la población femenina también se acrecienta el riesgo de sufrir enfermedades antes más frecuentes en los hombres: accidentes cardíacos y cerebro-vasculares, cáncer, infecciones, etc. Los expertos señalan que lo más importante es dar vida a los años y no sólo años a la vida.

El envejecimiento de la población se percibe de diferente manera si la persona que entra en años es de un sexo u otro. En el caso de las mujeres dos hechos fisiológicos fundamentales condicionan su vida y su madurez: la menarquía, por un lado, y la menopausia y el climaterio en un segundo momento.

Con la menopausia, y como consecuencia de la disminución de los niveles de estrógenos, se producen unas alteraciones hormonales en la mujer que supera los 50 años que pueden provocar un deterioro de su salud, aunque no necesariamente. Hasta ese momento los estrógenos han jugado un papel fundamental en su organismo, previniendo accidentes cardiovasculares, osteoporosis, etc. Sin

embargo, cuando alcanza la menopausia, es cuando está más expuesta a padecer osteoporosis, infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares, artritis y artrosis, problemas de comunicación (oído, habla) y, en última instancia, demencia senil y Alzheimer.

Así pues, las mujeres gozan de buena salud durante su etapa juvenil y adulta, pero conforme alcanzan el climaterio y bajan los niveles de estrógenos, llegan a estar más expuestas a sufrir las enfermedades que los varones de su edad.

Sin embargo, viven más años, ¿cómo se comprende este fenómeno? No debemos olvidar ciertos aspectos que aventajan a la mujer en cuanto a su perduración en el tiempo:

1. El sistema inmunológico femenino produce mayor cantidad de anticuerpos que protegen mejor ante determinadas enfermedades (Krishnaraj, 1992).
2. Además, en la edad madura la mujer conserva un mayor porcentaje de la fuerza que tenía en su juventud, respecto al varón (Sinaki, 2001).
3. De igual manera, los estrógenos contribuyen a proteger a la mujer al actuar a diferentes niveles:
 - 3.1 Frente a la osteoporosis, actuando a diferentes niveles (ver punto 4.11.1 de la presente tesis).
 - 3.2 Frente a los accidentes cardíacos, al disminuir los niveles de LDL, aumentar los niveles de HDL, etc. (ver punto 4.11.2 de la presente tesis).

3.3 Frente al daño oxidativo ocasionado por los radicales libres induciendo la expresión de enzimas antioxidantes, como se verá en el desarrollo de la presente tesis.

3.4 A otros niveles (efectos sobre proteínas, etc...)

Por estas y otras razones parece que la mujer vive durante más tiempo que el hombre.

Además, si nos fijamos en la población de centenarios, podemos comprobar que la mayoría son mujeres.

La gerontóloga de la Universidad de Harvard (EEUU), Margery Silver, ha realizado un estudio sobre centenarios entre una población de 460.000 ancianos de seis ciudades de Massachusetts. Este estudio revela que un 80% son mujeres, y el 20% restante hombres (Silver, 2001).

Cumplir los cien años ya no es una meta insalvable para las mujeres. En España ya se contabilizan varios casos que se aproximan a la barrera mítica de los 125 años (límite biológico del ser humano). La Figura I. 24 muestra el número de mujeres y de hombres según su edad a partir de los 55 años en España (datos del año 2001). Los datos de la misma han sido extraídos del Instituto Nacional de Estadística.

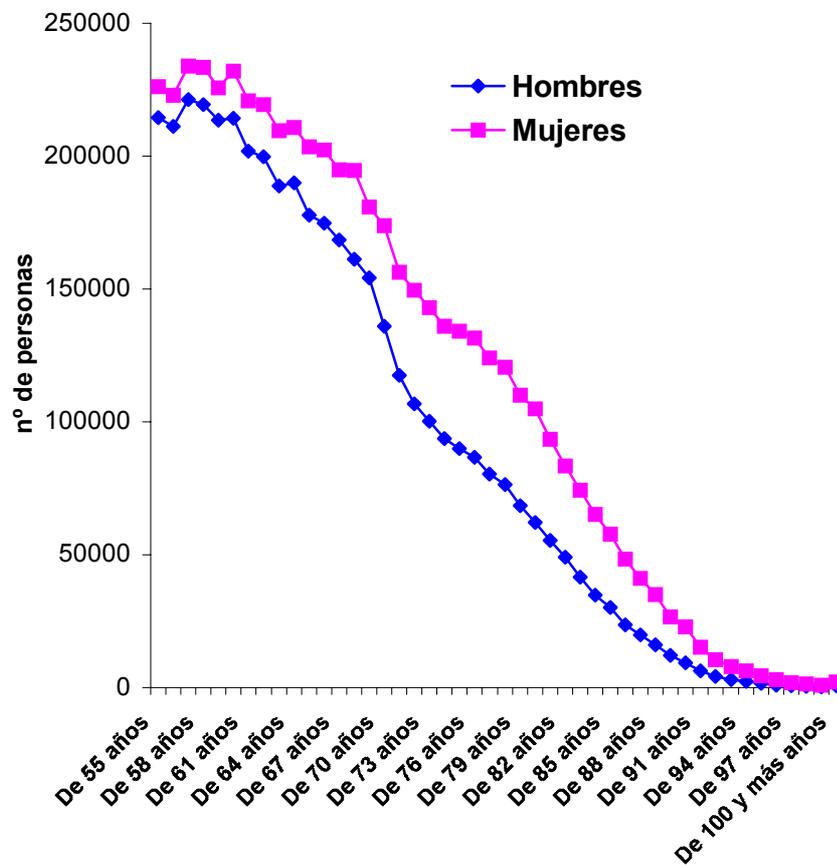


Figura I. 24.- Número de mujeres y de hombres según su edad a partir de los 55 años en España. Los datos de la misma han sido extraídos del Instituto Nacional de Estadística.

En la gráfica no se distingue bien, pero el número de centenarios en España es de 5296 personas, de las cuales 3890 son mujeres y 1406 hombres.

Así pues, la mujer no sólo posee una esperanza de vida más larga, sino que también alcanza una vida máxima mayor que el hombre.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es determinar las posibles razones biológicas que sustentan la diferente longevidad entre el sexo masculino y el sexo femenino en muchas especies, incluyendo la especie humana.

No es un objetivo de esta tesis estudiar las enfermedades asociadas al envejecimiento y su posible relación con el género masculino o femenino. Como se ha indicado antes el objetivo es explicar la diferente longevidad entre el género masculino y femenino en varias especies.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Determinar la tasa de producción de peróxido de hidrógeno y otras especies oxidantes en mitocondrias aisladas de ambos géneros.
2. Determinar los niveles de antioxidantes en mitocondrias procedentes de animales macho y hembra.
3. Determinar si los machos están sometidos a un mayor daño oxidativo sobre moléculas clave en la Biología como es el DNA, en especial el DNA mitocondrial.
4. Determinar si la edad biológica, que no cronológica, de las hembras es inferior a la de los machos explicando así en parte la diferente longevidad media.

5. Determinar la actividad de enzimas clave en la longevidad, que no poseen actividad antioxidante, tales como la telomerasa.
6. Determinar si la acción de los estrógenos está mediada por receptores o se comportan como antioxidantes químicos no hormonales o enzimáticos.
7. Determinar si los fitoestrógenos reproducen algunos de los efectos beneficiosos de los estrógenos en biología celular.

Estos objetivos son los que fundamentalmente perseguimos en el desarrollo de la presente tesis, y cuyas observaciones mostramos en los siguientes apartados de la misma.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Animales de experimentación

Se emplearon ratas Wistar machos y hembras de edades comprendidas entre los 4 y 6 meses. Algunos experimentos se llevaron a cabo con ratones OF1 machos y hembras de 4 meses de edad.

Los animales se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz /oscuridad (12 /12 h) constantes. Se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar (que contenía 590 g de carbohidratos, 30 g de lípidos, y 160 g de proteínas por kilogramo de dieta) y agua corriente sin restricción en la ingesta.

1.1.1. Sacrificio de los animales

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y 10:00 horas de la mañana del día correspondiente.

El sacrificio se realizó por dislocación cervical del animal, sin utilizar ninguna sustancia anestésica y /o tranquilizante.

Una vez muerto el animal, se procedió inmediatamente a la apertura de la cavidad abdominal para extraer el hígado y a la apertura del cráneo para la extracción del cerebro.

1.2. Aparatos

➤ **Balanzas**

Balanza de precisión SARTORIUS, modelo TECATOR 6110, con una sensibilidad de ± 0.0001 g. También utilizamos una balanza SARTORIUS modelo PT 1200, con una sensibilidad de ± 0.1 g

➤ **Centrífugas**

Para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1.

Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofuge 17RS.

También se utilizó la ultra centrífuga de la casa KONTRON, modelo T-1075.

➤ **Espectrofotómetro**

Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatzado.

➤ **pHmetro**

El pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

➤ **Fluorímetro**

Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.

➤ **Homogeneizador**

Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH.

➤ **Autoclave**

Marca Selecta, modelo Autester-G.

➤ **Termociclador**

Marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp® PCR System 9700.

Marca Perkin Elmer, modelo GeneAmp® PCR System 9600.

Marca BIORAD, modelo iCycler iQTM Multi-Color, Real-Time PCR Detection System.

➤ **Cubetas de electroforesis**

Cubeta de la casa SIGMA- ALDRICH.

➤ **Fuentes de alimentación de electroforesis**

Marca SIGMA, modelo PS 250-2, y marca BIO-RAD, modelo 200/2.0 Power Supply.

➤ **Transiluminador ultravioleta**

Marca Vilverlourmat, modelo TFX-35M.

➤ **Dispositivo fotográfico**

Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.

➤ **Equipo de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Cromatógrafo de la marca Kontron, compuesto por:

- Bomba Kontron, modelo 422.
- Detector electroquímico ESA Coulochem II, modelo 5200, con una célula analítica modelo 5011 y una célula acondicionadora modelo 5021.

- Columna Spherisorb ODS 2, de 0.46 cm de diámetro por 25 cm de longitud y 5 μm de diámetro de partícula.

➤ **Campana de flujo laminar vertical**

Marca CULTAIR modelo B100

➤ **Estufa termostatzada de cultivos**

Marca NAPCO modelo 5415IR, CO₂ System

➤ **Microscopios**

Microscopio óptico NIKON SE.

Microscopio óptico invertido ZEISS Modelo ID03

1.3. Reactivos

➤ **Determinación de proteínas**

Se empleó el “Protein ASSAY Kit” de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin.

➤ **Aislamiento de RNA total.**

Se utilizó el kit “QuickPrep Total RNA extraction kit” de Amersham Pharmacia Biotech.

➤ **Retrotranscripción y amplificación.**

El kit empleado fue el Titan™ One Tube RT-PCR System de los laboratorios Boehringer Mannheim.

Asimismo, para la realización de la PCR en tiempo real se empleó el kit TTh DNA polymerase de los laboratorios Boehringer Mannheim.

➤ **Enzimas**

Peroxidasa de rábano, Taq Polimerasa, AMV Reverse Transcriptase de Boehringer Manheim, TTh DNA polymerase. Glutación-S- transferasa, xantina oxidasa, glutación reductasa, RNAasa I de SIGMA.

➤ **Otros reactivos**

El resto de reactivos se obtuvo de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Manheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania), Gibco BRL Life Technologies (USA).

2. MÉTODOS

2.1 Aislamiento de mitocondrias

2.1.1 Mitocondrias hepáticas

2.1.1.1 Reactivos

- Solución de lavado: NaCl 0.9%
- Tampón de aislamiento de mitocondrias, cuya composición es: Sacarosa 0.3 M, EGTA 1 mM, MOPS 5 mM, BSA 15 μ M, KH_2PO_4 5 mM, enrasar con H_2O . El pH del tampón se ajusta añadiendo KOH al 20 % hasta alcanzar pH=7.4.

2.1.1.2 Procedimiento

Una vez extraído el hígado, se introduce en una placa Petri para lavarlo con NaCl 0.9 % (el último lavado debe realizarse con tampón de aislamiento). El tejido lavado se pone sobre papel secante y seguidamente se pesa. Una vez pesado se trocea y se introduce en el homogeneizador de vidrio, donde se añade tampón de aislamiento a razón de 2 mL/g de tejido. Tras homogeneización a 980 rpm de velocidad, para disgregar el tejido y romper las células, obtenemos un homogenado del tejido, que introducimos en uno o varios tubos de centrífuga según el volumen obtenido. Todo este proceso se debe realizar a 4°C. Seguidamente procedemos al aislamiento mitocondrial propiamente dicho, que está basado en el método publicado por Rickwood y cols. en 1987. Este método consiste en una centrifugación diferencial que comprende dos partes principales: en una primera parte se centrifuga el homogenado a 1000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido y el debris celular. A continuación se recoge el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en 3 mL de tampón de aislamiento y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones para obtener un rendimiento óptimo del proceso. Se juntan los dos sobrenadantes obtenidos y se centrifuga de nuevo para eliminar posibles contaminaciones con restos celulares. Una vez recogido el sobrenadante, que contiene las mitocondrias, pasamos a la segunda parte del aislamiento, que comprende tres centrifugaciones a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Esta alta velocidad de centrifugación conlleva la precipitación de las mitocondrias, obteniendo por tanto un precipitado rico en mitocondrias que lavamos en centrifugaciones sucesivas. Tras la

tercera centrifugación, el precipitado mitocondrial obtenido se resuspende en tampón de aislamiento o en tampón para la determinación de peróxidos, a razón de 2 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de precipitado mitocondrial o 20 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de precipitado mitocondrial respectivamente. De este modo obtenemos una suspensión mitocondrial más o menos diluida en función de la determinación a realizar.

2.1.2. Mitocondrias de cerebro: sinápticas y no sinápticas.

2.1.2.1. Reactivos

- Tampón de aislamiento: Sacarosa 0.32 M, EDTA-K 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH=7.4.
- Ficoll 7.5 % (P/P), Sacarosa 0.32 M, EDTA-K 50 μM , Tris-HCl 10 mM, pH=7.4.
- Ficoll 10 % (P/P), Sacarosa 0.32 M, EDTA-K 50 μM , Tris-HCl 10 mM, pH=7.4.
- Tris-HCl 6 mM, ajustado a pH=8.1. (Tampón Tris-
alcalino)
- Ficoll 6 % (P/P), Manitol 0.24 M, Sacarosa 60 mM, EDTA-K 50 μM , Tris-HCl 10 mM, pH=7.4.
- Ficoll 4.5 % (P/P), Manitol 0.24 M, Sacarosa 60 mM, EDTA-K 50 μM , Tris-HCl 10 mM, pH=7.4.
- Ficoll 3 % obtenido a partir del Ficoll 6 % diluido 1:1 con agua destilada, pH=7.4.

- Disolución de Albúmina de Suero Bovino (BSA) que contiene 1 mL de BSA (10 mg BSA/mL) y 19 mL de tampón de aislamiento.

Los distintos tipos de Ficoll se preparan con los siguientes tampones:

- Tampón SET 4X para el Ficoll 7.5 y 10 %: Sacarosa 1.28 M, EDTA-K 200 μ M, Tris-HCl 40 mM, pH=7.4.
- Tampón MSET 2X para el Ficoll 6, 4.5, y 3 %: Manitol 0.48 M, Sacarosa 120 mM, EDTA-K 100 μ M, Tris-HCl 20 mM, pH=7.4.

2.1.2.2. Procedimiento

Una vez extraído el cerebro, se introduce en una placa Petri para lavarlo en presencia de NaCl 0.9 % (el último lavado debe realizarse con tampón de aislamiento). El tejido lavado se pone sobre papel secante y seguidamente se introduce en el homogeneizador de vidrio, donde se añade 15 mL de tampón de aislamiento. Tras homogeneización manual, para disgregar el tejido y romper las células, obtenemos un homogenado del tejido, que repartimos en dos tubos de centrifuga. Todo este proceso se debe realizar a 4°C. Seguidamente procedemos al aislamiento mitocondrial propiamente dicho, que está basado en el método publicado por Lai y cols. en 1979. Este método comprende los siguientes pasos:

- 1.- Centrifugar el homogenado a 1300 g durante 3 minutos a 4°C. Recoger el sobrenadante y resuspender el precipitado en 15 mL de tampón de aislamiento para centrifugarlo de nuevo bajo las mismas condiciones. Tomar el sobrenadante y juntarlo con el obtenido en la primera centrifugación.

2.- Centrifugar este sobrenadante a 17000 g durante 10 minutos a 4°C, de modo que obtenemos un precipitado mitocondrial crudo (CM).

A partir del CM se puede obtener 2 fracciones de mitocondrias sinápticas (SM1 y SM2) y una fracción de mitocondrias no sinápticas.

✦ Obtención de la Fracción Sinaptosómica y las Mitocondrias No Sinápticas de Cerebro.

3.- Resuspender el CM en 5 mL de tampón de aislamiento. Depositar esta suspensión sobre 7 mL de Ficoll 7.5 % y éste a su vez sobre 7 mL de Ficoll al 10 %. Centrifugar a 36000 rpm durante 35 minutos.

De este modo obtenemos un precipitado (M), y dos interfases, la fracción mielínica (My) y por debajo de ésta la fracción sinaptosómica (Syn).

4.- Aspirar la fracción My con pipeta Pasteur y recoger la fracción Syn con mucho cuidado. Centrifugar la fracción Syn diluida tres veces con tampón de aislamiento a 18500 g durante 10 minutos a 4°C.

✦ Obtención de la fracción de Mitocondrias No Sinápticas de Cerebro (M).

5.- Resuspender el precipitado (M) obtenido en el punto 3 en 15 mL de tampón de aislamiento y centrifugar a 9800 g durante 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante rápidamente y lavar el precipitado de nuevo con BSA, centrifugando bajo las condiciones anteriores. Decantar rápidamente el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 mL de tampón de aislamiento. Esta suspensión es la fracción de mitocondrias no sinápticas de cerebro.

✦ Obtención de las fracciones de Mitocondrias Sinápticas de Cerebro (SM1 y SM2).

6.- Romper el precipitado obtenido de la fracción Syn en el paso 4 con 10 mL de tampón Tris-alcálico. Homogeneizar e ir añadiendo poco a poco 20 mL más de este tampón. Centrifugar a 11800 g durante 10 minutos a 4°C.

7.- Retirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender el precipitado en 10 mL de tampón Tris-alcálico. Centrifugar a 8300 g durante 10 minutos a 4°C.

8.- Retirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender el precipitado en 3 mL de Ficoll 3 %. Depositar esta suspensión sobre 5 mL de Ficoll 4.5 % y éste a su vez sobre 10 mL de Ficoll 6 %. Centrifugar a 11300 g durante 30 minutos a 4°C.

Finalmente obtenemos un precipitado y dos interfases, la fracción S3 y por debajo de ésta la fracción S4.

9.- Aspirar la fracción S3 con pipeta Pasteur. Decantar la fracción S4 y diluirla dos veces con tampón de aislamiento. Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4°C.

10.- Lavar el precipitado obtenido resuspendiendo en 5 mL de BSA y centrifugar a 9800 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante es la fracción de mitocondrias sinápticas, que se resuspende en tampón de aislamiento hasta un volumen de 1 mL.

2.2 Citometría de flujo

2.2.1 Características de la citometría de flujo

La citometría de flujo se define como el proceso analítico por el cual las células individuales u otras partículas suspendidas en un medio líquido adecuado, son forzadas a pasar en fila, frente a un conjunto de sensores que miden ciertas propiedades físicas u ópticas de esas células o partículas.

El citómetro de flujo mide múltiples propiedades de una población celular de forma individual, es decir, analiza célula a célula y además de forma multiparamétrica. Esto va a permitir detectar la heterogeneidad celular así como el estudio de distintas propiedades por célula

2.2.2 Funcionamiento de un citómetro de flujo

En el citómetro de flujo las células pasan por una cámara de flujo en la que son sometidas a un movimiento de flujo laminar que las obliga a salir de ellas alineadas y describiendo siempre la misma trayectoria. Las células al salir de la cámara de flujo pasan secuencialmente a través de un láser debidamente alineado (Métézeau y Delamare, 1988)

El paso de las células individuales y centradas en el mismo punto de enfoque del láser se consigue utilizando el flujo laminar. La corriente de líquido en el que se desplazan las células está formada por dos flujos concéntricos: uno interno (medio de cultivo o tampón que preserve las características celulares a preservar) donde se encuentran las células y un flujo externo formado por solución salina fisiológica.

Al disminuir la presión del flujo interno respecto al externo, se produce el centrado del flujo interno en medio del cilindro de líquido, obligando a las células a circular siguiendo un flujo laminar, de dimensiones ajustadas a su tamaño. Ello provoca el paso de células, una a una y centradas en el eje del cilindro del líquido, de forma que todas pasarán por el punto medio del haz de láser.

La interacción de las partículas con el láser provoca, por un lado, la dispersión de parte de la luz del haz, que se recoge mediante lentes situadas frontal y perpendicular respecto al mismo, y por otra, la emisión de fluorescencia, debido a la excitación por el láser de fluorocromos naturales o incorporados a la célula. Esta fluorescencia se recoge mediante una lente situada perpendicularmente al haz de láser (Carretero F, 1985)

La recepción de las señales se realiza a través de una serie de lentes. Un sistema óptico de filtros se encarga de separar las diferentes longitudes de onda; las señales luminosas se transforman en pulsos eléctricos de un voltaje proporcional a la intensidad de la luz incidente.

Las señales eléctricas se amplifican y se procesan mediante conversión analógico-digital y, en relación directa con su magnitud, se les asigna un determinado número de canal en los histogramas (Métézeau y Delamare, 1988; Carretero, 1985; Jensen B.D. y Horan P.K., 1989)

2.3 Determinación del tamaño y complejidad mitocondrial por citometría de flujo

2.3.1 Tamaño mitocondrial

Para la determinación del tamaño mitocondrial se utilizarán los parámetros de dispersión de luz: dispersión frontal y lateral de la luz láser. Las medidas de dispersión frontal se toman con un detector que recoge la luz del láser dispersada entre 1 y 20° respecto al haz. Esta medida se relaciona con el tamaño celular.

2.3.2 Complejidad mitocondrial

La dispersión de luz a 90° respecto al haz láser se recoge por las lentes situadas en esta posición junto con las emisiones de fluorescencia, siendo posteriormente separada en la cámara de flujo mediante un espejo dicróico para su valoración. Esta medida será correlacionada con el índice de refracción de la célula con respecto al medio y depende de la estructura intracelular como relación núcleo-citoplasma o vesiculación.

2.4 Determinación de la tasa de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno

2.4.1 Fundamento

Utilizamos un método modificado a partir del desarrollado por Barja y cols. en 1999. Esta técnica se fundamenta en la medida de la fluorescencia emitida (a 420 nm) por el dímero formado entre el peróxido de hidrógeno producido por las mitocondrias y el ácido

homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético), al ser excitado por una haz de luz de una longitud de onda de 312 nm. La catálisis de la reacción de dimerización la lleva a cabo la enzima peroxidasa a medida que se va formando el peróxido de hidrógeno. Las mitocondrias, una vez aisladas del tejido correspondiente, se incuban con sustratos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial: piruvato 5 mM y malato 2.5 mM como sustratos del complejo I, y succinato 10 mM como sustrato del complejo II. Para cada sustrato ensayado, se realizan determinaciones por duplicado de la cantidad de dímero H_2O_2 -ácido homovanílico a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

2.4.2 Reactivos

- Tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno: EGTA 0.1 mM, KH_2PO_4 5 mM, $MgCl_2$ 3 mM, KCl 145 mM, HEPES 30 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta 7.4.
- Solución Glicina-EDTA: Glicina 2 mM, EDTA 50 mM, NaOH 2.2 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20 % hasta $pH \geq 11$.
- Succinato potásico 10 mM (concentración final en el tubo): Neutralizar ácido succínico con KOH 20% hasta alcanzar $pH=7.4$. Enrasar con tampón para la determinación de H_2O_2 .
- Piruvato sódico 2.5 mM (concentración final en el tubo) disuelto en tampón para la determinación de H_2O_2 .
- Malato potásico 2.5 mM (concentración final en el tubo): Neutralizar ácido málico con KOH 1 M hasta $pH=7.4$. Enrasar con tampón para la determinación de H_2O_2 .

- Ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético) 0.1 mM (concentración final en el tubo) disuelto en tampón para la determinación de H₂O₂.
- Peroxidasa de rábano 6 U/mL.

2.4.3 Procedimiento

Una vez aisladas las mitocondrias, el precipitado mitocondrial se resuspende en tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno a razón de 20 µL/mg de precipitado.

Por otro lado, realizamos la mezcla de reactivos que previamente habremos preparado. Dicha mezcla contiene las siguientes cantidades de reactivo por cada determinación: 5 µl de peroxidasa de rábano 6 U/mL, 20 µL de ácido homovanílico 1 mM, 20 µL de succinato 0.1 M pH 7.4 y hasta 1.5 mL del tampón para la determinación de H₂O₂ previamente burbujeadado con aire durante 5 minutos. Dicha mezcla se utilizará para medir la producción de peróxido de hidrógeno en la cadena de transporte electrónico mitocondrial aportando como donante de sustancias reductoras el succinato (complejo II). Para la determinación de la tasa de generación de peróxido de hidrógeno aportando sustratos del complejo I, la mezcla contiene los mismos componentes, excepto el succinato que se sustituye por 20 µL de malato 25 mM y 20 µL de piruvato 50 mM.

A continuación se preparan para cada tipo de sustrato tubos de polipropileno aptos para centrifugar. Necesitaremos dos tubos por cada tiempo de incubación a realizar (5, 10, 15, 20 minutos) y por cada sustrato a ensayar (succinato y piruvato-malato). Se añade a cada tubo 1.5 mL de la mezcla de reacción.

Preincubamos a 37°C durante 5 minutos en agitación la suspensión mitocondrial y los tubos con la mezcla de reacción. Transcurrido ese período de tiempo, añadimos 500 µL de suspensión mitocondrial respetando los tiempos de incubación a realizar. (Separamos una pequeña cantidad de suspensión mitocondrial para determinar el contenido proteico de la muestra).

Detenemos la reacción de dimerización aumentando el pH por medio de la adición de 1 mL de tampón Glicina-EDTA pH \geq 11. A medida que paramos la reacción, guardamos los tubos en hielo, y seguidamente centrifugamos a 15000 g durante 15 minutos a 4°C.

Recogemos los sobrenadantes que contienen el dímero H₂O₂-homovanílico y medimos con un fluorímetro la fluorescencia que emite a 420 nm de longitud de onda tras excitación con un haz de luz de 312 nm.

2.4.4 Cálculos

La fluorescencia emitida por los sobrenadantes se valora frente a una recta patrón construida con peróxido de hidrógeno en presencia de ácido homovanílico y peroxidasa. La recta patrón se realiza añadiendo a una misma cantidad de ácido homovanílico y peroxidasa, distintas cantidades de peróxido de hidrógeno, como se indica en la tabla adjunta:

Tubo	Peroxidasa (μL)	Ác.homovanílico (μL)	Tampón peróxidos (μL)	H_2O_2 (nmol/mL)
1		20	1975	0
2		20	1975	1.0
3		20	1975	1.5
4		20	1975	2.0

Tabla III. 1. Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.

Para realizar la determinación fluorimétrica, se añaden los reactivos que indica la tabla adjunta a los tubos, y a continuación se añaden 1 mL de tampón glicina-EDTA a cada uno de los tubos y a partir de ese momento se procede igual que con las muestras.

Los patrones de H_2O_2 se realizan a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno al 33,3 % p/v. Primero se realiza una dilución $1/10^3$ del peróxido de hidrógeno comercial en el mismo tampón que utilizamos para las muestras, y, a partir de ésta se obtiene una dilución $1/10^5$ de la comercial (también en este tampón). Esta será la solución que se utilizará para realizar los patrones de H_2O_2 .

Para calcular con exactitud la concentración de la solución comercial de peróxido de hidrógeno debe medirse la absorbancia de la dilución $1/10^3$ a una longitud de onda de 230 nm (A_{230}), utilizando el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a esa longitud de onda ($72,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), mediante la siguiente ecuación, puede conocerse la concentración de H_2O_2 en cada tubo de la recta patrón:

$$\frac{A_{230} \times \mu\text{L H}_2\text{O}_2 \times 10^4}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times 1000 \mu\text{L}} = \text{nmoles H}_2\text{O}_2/\text{mL}$$

Una vez calculado el valor de H₂O₂ en nmol/mL, se divide por la cantidad de proteínas en mg/mL, obteniendo así el resultado final en nmol de H₂O₂/mg de proteínas.

2.5 Determinación de los niveles de GSH mitocondrial.

2.5.1 Fundamento

El método empleado es el descrito por Brigelius et al. en 1983. Se basa en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenzenceno. Esta reacción está catalizada por la glutatión-S-transferasa (GS-T). El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm.



2.5.2 Procedimiento

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 825 μL de fosfato potásico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0.

- 25 μL muestra (una vez obtenidas las mitocondrias, se resuspenden a razón de 2 $\mu\text{L}/\text{mg}$ en tampón de aislamiento de mitocondrias. Se toman 200 μL de esta suspensión y se añade 50 μL de PCA 30%, EDTA 2.5 mM; en el caso de tejido, se pesan 100 mg de tejido que se homogeneizan con 1 mL de PCA 6% EDTA 1 mM).
- 10 μL de una solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno 10 mM en etanol al 100%.

Se realiza un autocero (ha de tenerse en cuenta que la absorbancia de la línea de base debe ser estable) (E1) y la reacción comienza añadiendo 10 μL de una solución de glutatión-S-transferasa 500 U/mL en tampón fosfato sódico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4. Esta solución se dializa previamente durante 6 horas en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada dos horas.

Se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción (E2). La diferencia E2-E1 es proporcional a la cantidad de GSH existente.

2.5.3 Cálculos

Para calcular la concentración de GSH se utiliza el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutatión a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$\frac{(E2 - E1)_{340} \times \text{vol cubeta (mL)}}{9.6 \times \text{vol muestra (mL)}} = \mu\text{moles GSH /mL muestra ácida}$$

2.6 Determinación de la concentración de proteínas

2.6.1 Fundamento

Se toma una cantidad de suspensión mitocondrial comprendida entre 50 y 100 mL y se conserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización. Empleamos el “Protein Assay Kit” de Sigma-Aldrich Química, basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (Lowry y cols., 1951; Lowry y Peterson, 1977). El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. El reactivo de Folin, también incluido en el kit, contiene fenol, que al interaccionar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul.

2.6.2 Procedimiento

Añadir 25 mL de muestra (previa dilución 1/8 en el caso de mitocondrias resuspendidas en tampón de aislamiento) a un tubo de ensayo. Completar con agua hasta 1 mL.

Preparar un blanco con 1 mL de agua y, además, un blanco que contenga el mismo volumen que las muestras de una dilución 1/8 del tampón utilizado en el aislamiento de las mitocondrias, ya que este tampón contiene seroalbúmina bovina.

Añadir 1 mL del reactivo de Lowry a cada tubo, agitar en el vórtex e incubar 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

Añadir 500 μL del reactivo de Folin, agitar en el vórtex e incubar 30 minutos en oscuridad.

Realizar una lectura espectrofotométrica a 660 nm de longitud de onda.

2.6.3 Cálculos

Restar a cada muestra la absorbancia del blanco realizado con tampón utilizado para el aislamiento de mitocondrias, y se valoran frente a una recta patrón construida con seroalbúmina bovina en cantidades comprendidas entre 0,01 y 0,1 mg/mL.

2.7 Aislamiento de DNA mitocondrial de hígado de rata

2.7.1 Reactivos

- Tampón 1: TRIS-HCL 10 mM, pH=7.8; NaCl 60 mM; Sacarosa 5 %; EDTA 10 mM; enrasar con H₂O.
- Tampón 2: TRIS-HCL 300 mM, pH=9.0; SDS 1.25 %; Sacarosa 5 %; EDTA 10 mM; enrasar con H₂O.
- Acetato sódico 3 M, pH=4.8.
- Acetato potásico 3 M, pH=4.8.

2.7.2 Procedimiento

Para aislar DNA mitocondrial (DNAmt) a partir de hígado de rata se utilizó un método modificado a partir del desarrollado por Latorre y cols. en 1986. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1.- Sacrificar al animal por decapitación y extraer el hígado. Seguidamente colocar el tejido en una placa de Petri con NaCl 0.9 %

(p/v). Para facilitar su lavado y eliminar la sangre cortamos el órgano con unas tijeras.

2.- Homogeneizar el tejido inmerso en 1.5 mL/g de tejido de tampón 1 a una velocidad de 980 rpm.

3.- Alicuotar 300 μ l del homogenado obtenido en un tubo “eppendorf”. Añadir 300 μ L del tampón 2 y 300 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), para la extracción del contenido lipídico de la muestra. Agitar los “eppendorf” durante 10 minutos.

4.- Centrifugar las muestras a 500 g durante 10 minutos a 4°C. Una vez obtenido el centrifugado, extraer la fase viscosa superior, transfiriéndola a otro tubo “eppendorf”, desechando la fase líquida.

5.- Incubar los “eppendorf” a 65°C durante 30 minutos. De este modo conseguimos romper las membranas liberando el contenido celular, a la vez que desnaturalizar los ácidos nucleicos. Además se forman complejos SDS-proteínas desnaturalizadas.

6.- Añadir 120 μ L de acetato potásico 3 M, pH=4.8, e incubar la mezcla 10 minutos a -20°C. El descenso del pH provoca la renaturalización correcta de los ácidos nucleicos de pequeño tamaño, incluido el DNAm_t, y la renaturalización al azar y precipitación de los de gran tamaño, principalmente ácidos nucleicos provenientes del DNA nuclear.

7.- Centrifugar las muestras a 10000 g durante 10 minutos a 4°C y recoger el sobrenadante. Así, eliminamos restos celulares, los complejos SDS-proteínas, y el DNA nuclear.

8.- Añadir al sobrenadante obtenido idéntico volumen de isopropanol, mezclar e incubar durante 5 minutos a temperatura

ambiente. De esta manera conseguimos precipitar los ácidos nucleicos solubles, entre los que se encuentra el DNAMt.

9.- Centrifugar a 10000 g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado contendrá el DNAMt parcialmente purificado.

Una vez obtenido el DNAMt, comienza la **fase de purificación** del mismo.

10.- Resuspender el precipitado de DNAMt en 500 µL de etanol 70 %. Centrifugar de nuevo bajo las condiciones del paso 9.

11.- Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente. A continuación resuspenderlo en 150 µL de TE (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.0) y añadir 10 µL de RNAasa y esperar 6 minutos.

12.- Seguidamente añadir 300 µL de una disolución de SDS 0.1 % pH ≥ 11. Incubar a 65°C durante 6 minutos. Repetir de nuevo los pasos 9-12.

13.- Inmediatamente después añadir 230 µL de acetato sódico 3 M pH=4.8 e incubar la mezcla a -20°C durante 20 minutos.

14.- Centrifugar a 10000 g durante 5 minutos a 4°C. Recoger el sobrenadante.

15.- Resuspender en idéntico volumen de isopropanol, e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

16.- Centrifugar bajo las mismas condiciones del paso 14 y decantar el sobrenadante

17.- Resuspender en 500 µL de etanol 70 % y centrifugar de nuevo bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

18.- Decantar el sobrenadante y dejar secar el precipitado de DNAm_t durante aproximadamente 20 minutos. Finalmente resuspender el precipitado en 50 µL de TE.

✦ Medida de la concentración y pureza de DNA mitocondrial.

La cuantificación del DNAm_t se lleva a cabo por medio de determinación espectrofotométrica. Se determina la absorbancia de la muestra frente a un blanco a dos longitudes de onda: 260 nm y 280 nm

La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de DNA obtenida, teniendo en cuenta que un valor de 1 en la absorbancia corresponde a 50 µg/mL de DNA. Teniendo en consideración la dilución realizada en la medida, podremos calcular la concentración de DNA.

Por otro lado, el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm nos indica el grado de pureza del DNAm_t. Éste se considera aceptable cuando el cociente se encuentra entre valores comprendidos entre 1.7-1.8.

2.8 Determinación del daño oxidativo al DNAm_t a través de la medida de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

2.8.1 Fundamento

La 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) constituye un marcador biológico de daño oxidativo al DNA. Permite determinar oxidación del mismo ya que los radicales libres cuando atacan al DNA causan una oxidación de la guanosina para dar 8-OHdG. Para

su determinación se empleó un método descrito por Shigenaga y cols. en 1994. Éste se basa en la medida de los niveles de 8-OHdG mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con detección electroquímica.

2.8.2 Reactivos

- Acetato sódico 3 M, pH=5.
- Acetato sódico 20 mM, pH=4.8.
- Nucleasa P1 (*Penicillium citricum*)
- TRIS-HCl 1 M, pH=7.4.
- Fosfatasa alcalina (*Escherichia coli*)

2.8.3 Procedimiento

Una vez obtenido el DNAm_t, se procedió a la preparación de la muestra para ser inyectada en el HPLC, según el método desarrollado por Shigenaga y cols. en 1994. Éste supone el seguimiento de los siguientes pasos:

- 1.- Añadir 40 µL de acetato sódico 3 M pH=5 y 800 µL de etanol 70% frío para provocar la precipitación del DNAm_t.
- 2.- Centrifugar a 10000 g durante 15 minutos a 4°C.
- 3.- Decantar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente.

Llegados a este punto, tenemos la muestra preparada para proceder a la **hidrólisis enzimática** de la misma, de modo que se separen las diferentes bases nitrogenadas.

4.- Resuspender entre 200-500 μg de DNAm_t en 200 μL de acetato sódico 20 mM, pH=4.8 y añadir 20 μg de nucleasa P1. Incubar la mezcla a 37°C en agitación suave durante 10 minutos.

5.- Añadir 15 μg de fosfatasa alcalina disuelta en 20 μL de TRIS-HCl 1 M, pH=7.4. Incubar la mezcla a 37°C en agitación suave durante 1 hora.

6.- Centrifugar a 10000 g durante 5 minutos a 4°C y recoger el sobrenadant

7.- Añadir 20 μL de acetato sódico 3 M pH=5 para disminuir el pH de la muestra.

De este modo tenemos la muestra lista para ser inyectada en el cromatógrafo.

✦ Condiciones para la determinación de 8-OHdG mediante HPLC con detección electroquímica.

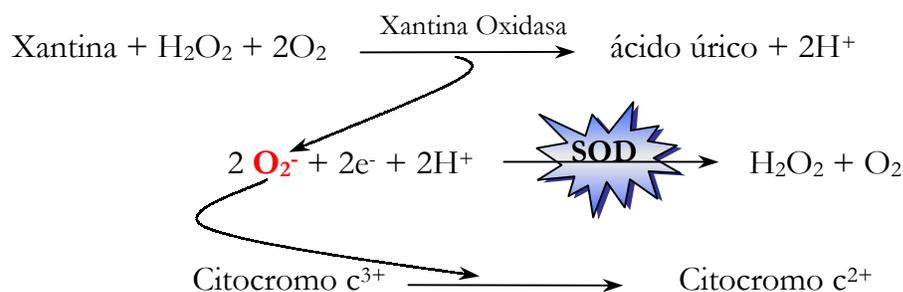
- FASE MÓVIL: Fosfato potásico monobásico 25 mM, pH=5.5; metanol 3 %.
- FASE ESTACIONARIA: Columna Sepherisorb ODS 2, de 0.46 cm x 25 cm y 5 μm de diámetro de partícula.
- VOLUMEN DE INYECCIÓN: 100-200 μL de muestra.
- FLUJO: 1mL/min constante durante todo el análisis.
- AJUSTE DEL DETECTOR ELECTROQUÍMICO:
 - E_1 (Electrodo 1) = 100 mV
 - E_2 (Electrodo 2) = 100 mV
 - Escala = 100 n Ω
 - Guard cell (electrodo que estabiliza la línea de base) = 400 mV

2.9 Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

2.9.1 Fundamento

Para la determinación de esta actividad enzimática, seguimos el protocolo desarrollado por Flohe y cols. en 1984.

Este método se fundamenta en el siguiente esquema de reacciones:



Según este esquema, el método se basa en la inhibición de la reducción del citocromo c^{3+} producida por el radical superóxido, por medio de la intervención de la SOD catalizando la reacción previamente señalada. Como generador constante de radicales superóxido se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa. La velocidad de reducción del citocromo c se sigue espectrofotométricamente a 550 nm.

Así pues, se define la unidad de la actividad SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la velocidad de reducción de la citocromo c^{3+} .

2.9.2 Reactivos

- Tampón fosfato potásico 0.1 M, EDTA 0.2 mM, pH=7.8
- Xantina 0.25 mM disuelta en 1 mL de NaOH 0.1 N. Enrasar con agua hasta 200 mL.
- Citocromo c^{3+} 0.2 mM
- Xantina oxidasa a una concentración determinada (aproximadamente 0.005 U/mL en la cubeta) de modo que obtengamos una pendiente de 0.025 ± 0.001 unidades de absorbancia por minuto frente al blanco a 550 nm.

2.9.3 Procedimiento

Preparar la siguiente mezcla de reactivos en la cubeta, que contiene:

- 500 μ L de tampón Tampón fosfato potásico 0.1 M, EDTA 0.2 mM, pH=7.8
- 200 μ L de la solución de xantina 0.25 mM
- 100 μ L de la solución de citocromo c^{3+} 0.2 mM
- 150 μ L de agua bidestilada
- \pm 20 μ L de la suspensión de xantina oxidasa
- 50 μ L de agua bidestilada (para el blanco) o 50 μ L de muestra

A continuación registrar la pendiente a 550 nm durante 2 minutos a 25°C frente al blanco. El volumen de la suspensión de xantina oxidasa se ha de ajustar hasta obtener una pendiente de 0.025 unidades de absorbancia por minuto.

Una vez ajustada la pendiente, proceder a la determinación de la actividad de SOD en las muestras apropiadamente diluidas.

Debemos tener en cuenta que la linealidad de la determinación se mantiene entre el 40 y 60 % de inhibición, lo cual corresponde a pendientes comprendidas entre 0.01 y 0.015 unidades de absorbancia por minuto.

2.9.4 Cálculos

La ecuación para el cálculo de esta actividad se deriva de la aplicación de la Ecuación de Michaelis-Menten. Tras una serie de transformaciones, llegamos a la siguiente expresión matemática:

$$\left(\frac{V}{V_c} - 1 \right) \times \left(\frac{\text{Volumen final cubeta (mL)}}{\text{Volumen de muestra (mL)}} \right) \times \frac{1}{\text{dilución muestra}}$$

Siendo:

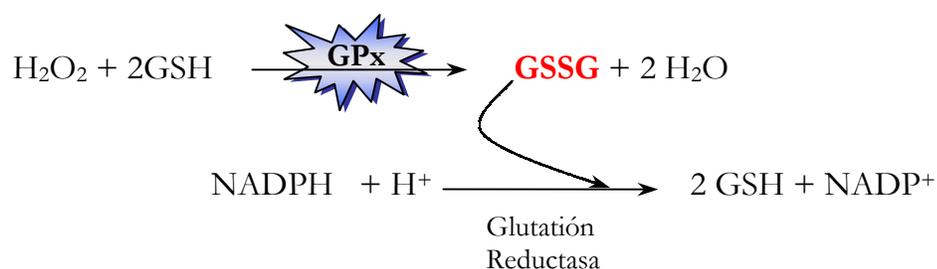
V = velocidad de generación de O₂⁻ sin muestra, es decir sin inhibición por parte de la SOD

V_c = velocidad de generación de O₂⁻ en presencia de muestra, es decir con inhibición por parte de la SOD

2.10 Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

2.10.1 Fundamento

La actividad de la glutatión peroxidasa se determinó según el método propuesto por Flohe y cols. en 1984. La reacción que permite su análisis es la siguiente:



De este modo, el glutatión oxidado generado en la reacción catalizada por la GPx, como consecuencia de la reducción del peróxido de hidrógeno, es a su vez reducido en la reacción catalizada por la glutatión reductasa, que utiliza NADPH como cofactor. La desaparición de NADPH puede registrarse espectrofotométricamente a 340 nm de longitud de onda.

2.10.2 Reactivos

- Tampón fosfato potásico 0.1 M, EDTA 1 mM, azida sódica 1 mM, pH=7
- Glutatión disulfuro reductasa 2.4 U/mL
- GSH 10 mM

- NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO₃ 0.1%
- Peróxido de hidrógeno 1.5 mM

2.10.3 Procedimiento

Preparar la siguiente mezcla de reactivos en la microcubeta, que contiene:

- 590 μ L del tampón fosfato potásico 0.1 M, EDTA 1 mM, azida sódica 1 mM, pH=7
- 10 μ L de la suspensión mitocondrial

Después añadimos sucesivamente:

- 100 μ L de la solución de glutatión reductasa
- 100 μ L de la solución de glutatión

Preincubar a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente añadir 100 μ L de la solución de NADPH. Registrar durante 3 minutos la oxidación de NADPH hasta línea de base estable.

Añadir la solución de peróxido de hidrógeno, de modo que registraremos durante 3 minutos la disminución de la absorbancia a 340 nm de longitud de onda, resultado de la oxidación del NADPH.

2.10.4 Cálculos

La cantidad de NADPH oxidado por unidad de tiempo (c), se calcula según la expresión siguiente:

$$c = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Siendo:

V_f = volumen final (mL)

V_m = volumen de muestra (mL)

ϵ = coeficiente de extinción molar (para el NADPH= 6.22
 $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

d = paso de luz de la cubeta

ΔA = incremento de los valores de absorbancia

Δt = incremento de tiempo

2.11 Aislamiento de RNA a partir de tejido

2.11.1 Fundamento

El aislamiento de RNA a partir de tejido hepático se llevó a cabo utilizando el kit de la casa *Amersham Pharmacia*, “QuickPrep Total RNA Extraction Kit”. Éste se basa en un método que combina las propiedades disruptivas y a la vez protectoras del tiocianato de guanidina (Chirgwin, J. M. y cols., 1979) con precipitación selectiva y centrifugación isopícnica utilizando cloruro de litio y trifluoroacetato de cesio.

Inicialmente la muestra de tejido se extrae por homogeneización en el seno de un tampón altamente concentrado en tiocianato de guanidina. Ello asegura la rápida inactivación de la actividad de las RNAsas endógenas y la completa disociación de los componentes celulares del RNA. Tras una segunda homogeneización en presencia de cloruro de litio, se añade trifluoroacetato de cesio y se centrifuga. Una vez centrifugado, obtenemos un precipitado de RNA, una capa rica en proteínas en la superficie, y una interfase que contiene DNA.

2.11.2 Reactivos

- Tampón de extracción: solución acuosa tamponada que contiene tiocianato de guanidina y N-lauroil sarcosina.
- Solución de cloruro de litio: solución de LiCl en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).
- Trifluoroacetato de cesio (CsTFA).
- Etanol 70 %

2.11.3 Procedimiento

Según las instrucciones del kit, seguimos los siguientes pasos, para cada una de las muestras:

- 1.- Añadir 250 μ L de tampón de extracción y 4.5 μ L de β -mercaptoetanol a un homogeneizador de vidrio
- 2.- Pesar 100 mg de tejido y añadirlos al homogeneizador.
- 3.- Homogeneizar el tejido.
- 4.- Añadir 525 μ L de cloruro de litio (LiCl).
- 5.- Homogeneizar y pasar la muestra a un “ependorf” de 1.5 mL
- 6.- Añadir 750 μ L de trifluoroacetato de cesio (CsTFA), y mezclar con pipeta estéril.
- 7.- Tapar los tubos y agitar con vórtex.
- 8.- Dejar los tubos en hielo durante 10 minutos.
- 9.- Centrifugar durante 15 minutos a velocidad máxima y temperatura ambiente.
- 10.- El RNA queda en el precipitado.
- 11.- Retirar la capa de proteínas y el sobrenadante rico en DNA mediante bomba de vacío.

Una vez extraído el RNA, se procede al **lavado** del mismo, siguiendo los siguientes pasos:

- 12.- Añadir al precipitado de RNA la mezcla de lavado, que contiene los siguiente reactivos: 113 μL de tampón de extracción, 263 μL de LiCl y 375 μL de CsTFA.
- 13.- Agitar con vórtex 5 veces a velocidad máxima.
- 14.- Retirar el sobrenadante con bomba de vacío, y mantener en hielo.
- 15.- Añadir 1.5 mL de etanol al 70% para precipitar el RNA.
- 16.- Agitar con vórtex 5 veces a velocidad máxima.
- 17.- Aspirar el etanol y dejar que se evapore completamente durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 18.- Disolver el RNA en 100 mL de agua libre de RNAsas (agua tratada con dietilpirocarbonato). Agitar con vórtex para favorecer la disolución.
- 19.- Dejar el RNA en hielo durante 15-30 minutos para que se disuelva. Agitar con vórtex para favorecer la disolución.
- 20.- Romper el precipitado vorteando 10 veces.
- 21.- Calentar a 65°C durante 10 minutos.
- 22.- Agitar con vórtex para asegurarse de que se ha disuelto, alicuotar y guardar a -80°C para su conservación.

Tras la extracción y lavado del RNA, el siguiente paso es la determinación de la concentración de RNA obtenida.

✦ Cuantificación de la concentración de RNA

La cuantificación del RNA se realizó mediante medida espectrofotométrica a 260 nm, y la comprobación de la pureza mediante la relación de las medidas 260/280 nm. Para hacer el

blanco de la medida de RNA se puso 1 mL de agua libre de RNAsas en la cubeta de cuarzo (A_b) y para la medida se diluyó en esta agua 2 μ L del RNA aislado (A_m). Con los valores obtenidos se hizo el siguiente cálculo:

$$A \times 40 \times 1000/2 = \text{mg de RNA}$$

Siendo:

$$A = A_m - A_b$$

$$40 = \text{abs. de 1 mg de RNA}$$

$$1000/2 = \text{Dilución del RNA.}$$

La comprobación de la pureza del RNA se llevó a cabo dividiendo el valor de la absorbancia a $\lambda=260$ nm entre el valor de la absorbancia a $\lambda=280$ nm, de forma que valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que se obtuvo un RNA de buena calidad.

Además de las medidas de absorbancia, y con el fin de asegurar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

2.12 Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR)

2.12.1 Fundamento

En la actualidad, existen varios métodos de determinación de la expresión del RNA mensajero, como el Northern Blotting, la hibridación in situ, los ensayos basados en la protección frente a las RNAsas, cDNA arrays y retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) del RNA.

En la presente tesis utilizamos este último (RT-PCR) para determinar la expresión del RNA. Particularmente, empleamos el método semicuantitativo de RT-PCR para realizar todas las determinaciones, y en algún caso empleamos también el método cuantitativo para corroborar los resultados obtenidos.

Básicamente, la RT-PCR consiste en dos pasos:

✦ Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT).

Consiste en la obtención de un DNA copia (cDNA) a partir de un RNA mensajero (mRNA), el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas DNA polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan RNA como genoma, en vez de DNA. Para poder expresar sus proteínas, han de pasar la información a DNA. La transcriptasa inversa utilizada para este trabajo es AMV-RT (avian myeloblastosis virus).

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA utilizamos cebadores (“primers”) específicos del gen cuya expresión queremos determinar, de modo que la retrotranscripción es específica del cDNA que queremos amplificar (ver apartado 2.12.2).

✦ Amplificación del DNAC: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez sintetizado el cDNA, lo amplificamos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de DNA.

El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de DNA, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o “primers” se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del DNA.

Los requerimientos de la reacción son simples: deoxinucleótidos (dNTPs) que proporcionan tanto la energía como las unidades de la síntesis, una polimerasa de DNA, cebadores, el DNA molde y un tampón que contenga magnesio.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del DNA.
- Unión o “annealing”: unión de los “primers” específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de “primers”.
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del “primer” respectivo.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del DNA, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el nº de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

El apartado 2.12.3 de la presente tesis recoge las condiciones de amplificación empleadas para cada uno de los genes estudiados.

2.12.2 Sondas.

Los cebadores que se utilizaron para la determinación de los niveles de expresión de los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa GCG a partir de las secuencias génicas obtenidas en el “Genbank”.

Para cada uno de los genes a estudiar se seleccionaron las siguientes (todos expresados en dirección 5'- 3') fueron los siguientes:

Glutación Peroxidasa: 5'-GAC ATC AGG AGA ATG GCA AG

5'-CAT CAC CAA GCC AAT ACC AG

Manganeso-Superóxido: 5'-CGT GCT CCC ACA CAT CAA TC

dismutasa 5'-TGA ACG TCA CCG AGG AGA AG

16S rRNA: 5'-GAC GAG AAG ACC CTA TGG AG

5'-AGA AAC CGA CCT GGA TTG C

Se tomó como control interno el RNA de la proteína ribosomal 26S, dado que este RNA se expresa a un nivel constante en muchos tejidos y líneas celulares cultivadas en diferentes condiciones fisiológicas.

2.12.3 Condiciones de amplificación

Las condiciones del RT-PCR para cada uno de los genes estudiados son:

Glutación Peroxidasa (GPx)

- Retrotranscripción: 50°C durante 30'
- Desnaturalización previa: 94°C durante 3'
- Amplificación: (35 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o “annealing”: 63°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

- Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD)

- Retrotranscripción: 50°C durante 30'
- Desnaturalización previa: 94°C durante 3'
- Amplificación: (30 ciclos)
 - Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos
 - Unión o “annealing”: 64°C durante 30 segundos
 - Extensión: 72°C durante 30 segundos
- Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Subunidad 16S del RNA ribosomal (16S rRNA)

- Retrotranscripción: 50°C durante 30'
- Desnaturalización previa: 94°C durante 3'
- Amplificación: (25 ciclos)
 - Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos
 - Unión o “annealing”: 62°C durante 30 segundos
 - Extensión: 72°C durante 30 segundos
- Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Subunidad 26S del RNA ribosomal (26S rRNA)

- Retrotranscripción: 50°C durante 30'
- Desnaturalización previa: 94°C durante 3'
- Amplificación: (20 ciclos)
 - Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos
 - Unión o “annealing”: 51°C durante 30 segundos
 - Extensión: 72°C durante 30 segundos
- Extensión final: 72°C durante 7 minutos

2.13 Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR) semicuantitativa

2.13.1 Fundamento

En el método de RT-PCR semicuantitativo la acumulación del producto de amplificación se mide durante la fase exponencial de amplificación. Por ello, es importante determinar el número de ciclos (n) que ha de transcurrir para no rebasar esta fase exponencial. En caso contrario, se alcanza la fase de saturación, en la que no es posible determinar diferencias de expresión génica.

La determinación del número de ciclos (n) se realiza aumentando el nº de ciclos hasta que detectamos, tras la visualización del producto, una cantidad constante de producto, de modo que n viene determinado por el nº de ciclos necesarios para amplificar el producto justo antes de la saturación.

La Figura III. 1 muestra los productos de amplificación obtenidos según el nº de ciclos, y señala el nº de ciclos en el que la amplificación se encuentra en la fase exponencial.

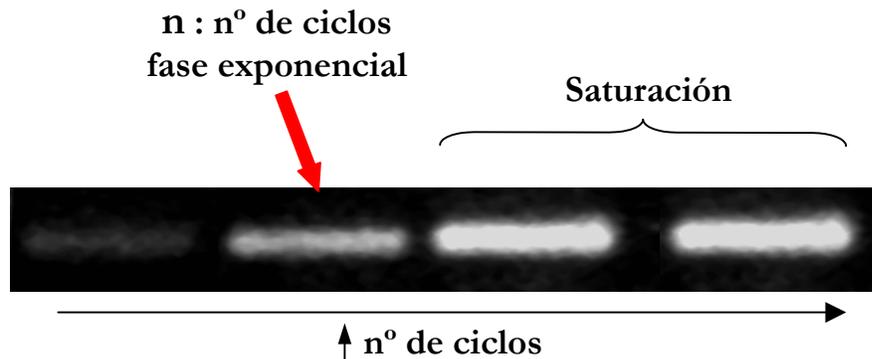


Figura III. 1.- Imagen de los productos de amplificación obtenidos en función del nº de ciclos de amplificación.

2.13.2 Procedimiento

La reacción de RT-PCR semicuantitativa se llevó a cabo utilizando el kit denominado “Titan™ One Tube RT-PCR System” de la casa *Boehringer Mannheim*, que permite realizar en un único paso la transcripción inversa y la amplificación del cDNA sintetizado.

La reacción se realizó según el protocolo proporcionado por el citado kit, y consiste en la preparación de dos mezclas por separado, cada una de las cuales contiene:

Mezcla 1 (por muestra):

Nucleótidos.....0.2 mM concentración final
 “Primers”.....0.4 μ M cada uno, concentración final
 Muestra de RNA.....20 ng de RNA
 Solución ditiotretol (DTT).....5 mM concentración final
 Agua libre de RNAsas.....c.s.p. 12.5 μ L

Mezcla 2 (por muestra):

Tampón con Mg^{2+} 1.5 mM $MgCl_2$ concentración final
 Mezcla enzimas.....AMV (RT) y Taq DNA polimerasa
 y Tgo DNA polimerasa (PCR)
 Agua libre de RNAsas.....c.s.p. 12.5 μ L

Una vez preparadas, ambas mezclas se unen en un “ependorf” de 0.2 mL y se introducen en el termociclador siguiendo las condiciones de amplificación señaladas en el apartado 2.12.3 de la presente tesis.

2.13.3 Visualización del producto amplificado.

La visualización de los productos de la reacción de PCR semicuantitativa se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE), tinción con bromuro de etidio y transiluminación con luz UV.

Los tamaños esperados de los fragmentos de PCR son: 395 pares de bases (pb) para la Glutación Peroxidasa, 378 pb para la Manganese-Superóxido Dismutasa, 380 pb para el 16S rRNA y 252 pb para el gen de referencia 26S rRNA.

La determinación de la expresión del gen en cuestión se realiza mediante análisis densitométrico de las bandas obtenidas, de modo que se divide la densidad óptica obtenida para el gen en cuestión por la obtenida para el gen de referencia.

2.14 Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real)

2.14.1 Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de RNA mensajeros (RNAm), tanto en células como en tejidos.

Este método, a diferencia del semicuantitativo, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes que sólo emiten fluorescencia cuando el DNA está en forma de doble cadena, de modo que determinando el

incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado.

La sustancia fluorescente utilizada en nuestros experimentos fue SYBR Green I, el cual se une al DNA y emite fluorescencia sólo en el caso de que la dos hebras complementarias de DNA estén unidas.

Así, este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia, y nos permite controlar la reacción en todo momento (aumento del n° de ciclos, repetición de ciclos, pausa...).

La Figura III. 2 representa las curvas de amplificación que obtenemos mediante este método.

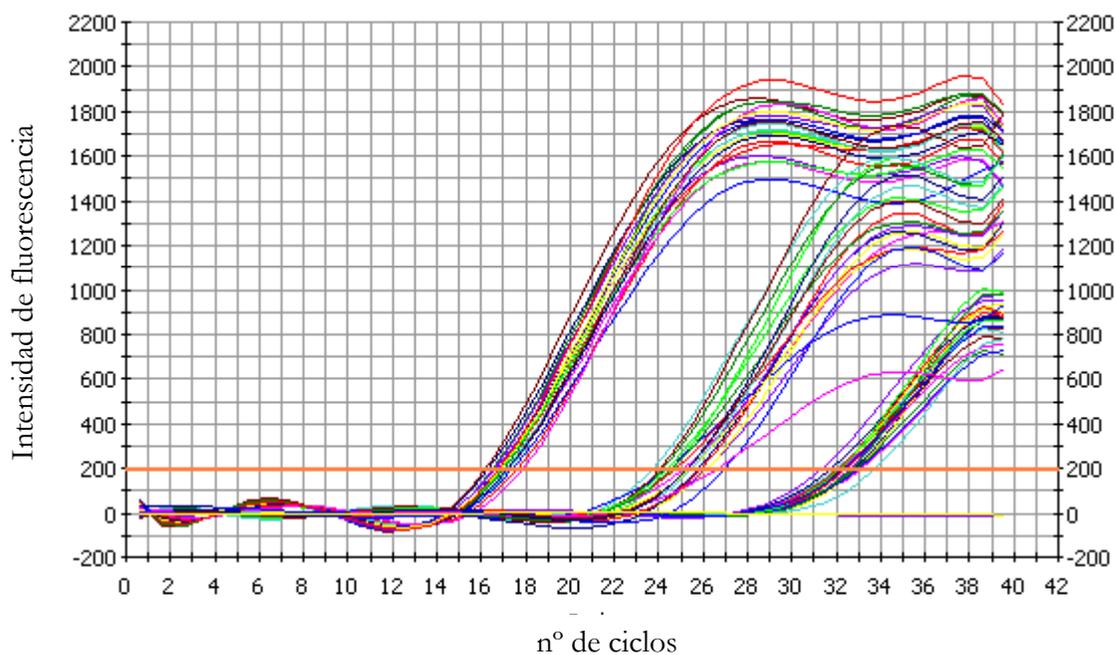


Figura III. 2.- Curvas de amplificación obtenidas mediante PCR en tiempo real.

El software del ordenador construye estas curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. Así, al final obtenemos una representación en la que el eje de ordenadas es la fluorescencia y el eje de abscisas es el nº de ciclos transcurridos. Una vez obtenida la representación, el eje de ordenadas se transforma en logarítmico para su mejor interpretación (Figura III. 3).

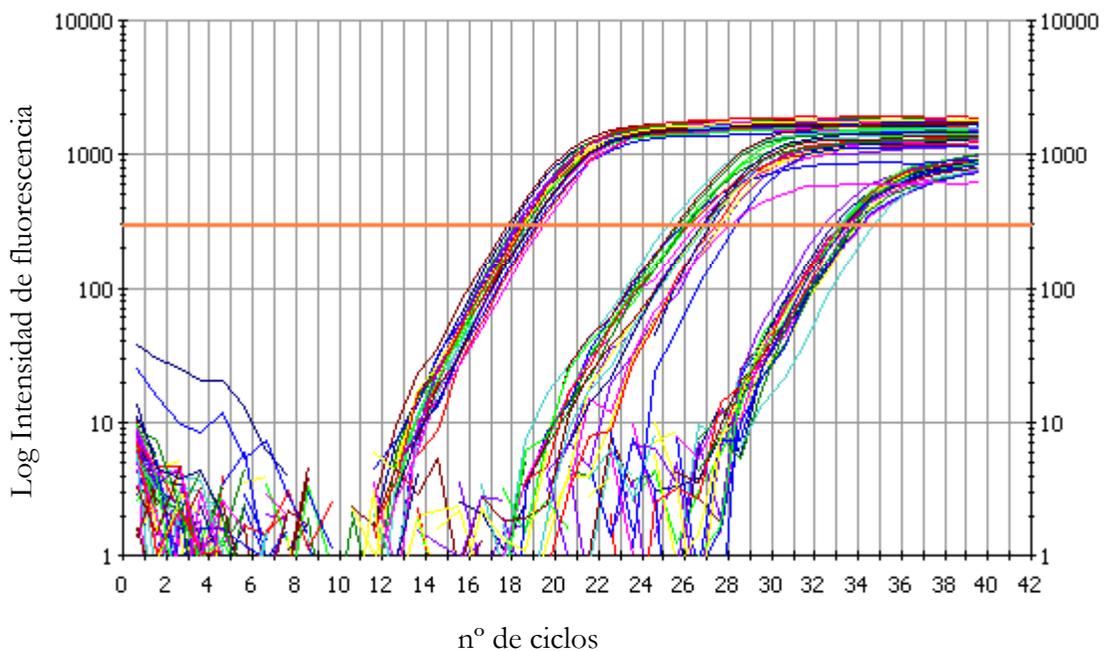


Figura III. 3.- Curvas de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico.

En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo

en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (“threshold cycle”, Ct), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cDNA (DNA copia) de partida, puesto que cuanto más copias de RNAm (RNA mensajero) de partida del gen estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de RNAm de partida conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de un gen de expresión constitutiva, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de RNAm de partida empleado para la realización de la curva estándar.

Otro método para determinar la expresión a partir de las curvas de amplificación obtenidas consiste en la comparación de Ct. Como hemos señalado, cuanto más RNAm de partida hay, menor es el Ct obtenido. Este método se asemeja al método de la curva estándar, pero utiliza fórmulas aritméticas cuya resolución conduce a la cuantificación relativa de la expresión de un determinado gen.

2.14.2 Procedimiento

La reacción de RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando el kit denominado “Tth DNA Polymerase” de la casa *Boehringer Mannheim*, que permite realizar en un único paso la transcripción inversa y la amplificación del cDNA sintetizado. La Tth DNA polimerasa posee la propiedad de actuar como retrotranscriptasa (en

presencia de iones Mn^{2+}) y como polimerasa al mismo tiempo. Además se utilizó el reactivo SYBR Green I para la detección fluorescente del producto formado.

La reacción se realizó según el protocolo proporcionado por el citado kit, y consiste en la preparación de dos mezclas por separado, cada una de las cuales contiene:

Mezcla 1 (por muestra):

Nucleótidos.....0.3 mM concentración final
“Primers”.....0.4 μ M cada uno, concentración final
Muestra de RNA.....20 ng de RNA
Agua libre de RNAsas.....c.s.p. 12.5 μ L

Mezcla 2 (por muestra):

Tampón con Mg^{2+} 1.5 mM $MgCl_2$ concentración final
 $Mn(OAc)_2$ 2.5 mM concentración final
Tth DNA polimerasa.....5 U/reacción
SYBR Green I.....dilución 1/20000
Agua libre de RNAsas.....c.s.p. 12.5 μ L

Una vez preparadas, ambas mezclas se juntan y se introducen en pocillos de placas diseñadas para este fin y se introducen en el termociclador, que ha sido programado previamente según las condiciones de amplificación señaladas en el apartado 2.12.3 de la presente tesis para la manganeso-superóxido dismutasa (gen problema). El gen de referencia empleado en este caso fue gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y su

amplificación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que el gen problema.

2.14.3 Cálculos

En la presente tesis realizamos una cuantificación relativa del gen problema, utilizando el método de comparación de Ct mencionado en el apartado 2.14.2.

La ecuación que permite la cuantificación por este método viene dada por

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$

siendo $\Delta Ct_1 = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen referencia de la muestra 1}}$

$\Delta Ct_2 = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen referencia de la muestra 2}}$

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. La comprobación de este requisito se comprueba realizando curvas estándar de cantidades de RNA conocidas para cada uno de los genes, el problema y el de referencia. Una vez obtenidas las curvas de amplificación se representa el logaritmo de la concentración frente al Ct, tanto para el gen problema como para el de referencia, y se calcula la pendiente de la recta para cada una de las representaciones obtenidas. Para que las eficiencias sean similares, las pendientes de ambas rectas deben ser similares, puesto que la eficiencia de la reacción de amplificación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Para una pendiente de -3.322 obtenemos una eficiencia del 100 %, lo cual significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado.

Una reacción de amplificación debe tener una eficiencia lo más cercana al 100 % para estar optimizada.

En nuestro caso obtuvimos para el caso del gen problema manganeso-superóxido dismutasa una pendiente de -3.112 , y para el gen de referencia GAPDH de -3.253 , lo cual supone unas eficiencias de reacción de 109% y de 102% respectivamente.

Una vez comprobamos que las eficiencias son comparables, realizamos las reacciones de amplificación conjuntamente para ambos genes (problema y referencia) y para cada muestra, macho y hembra por triplicado y aplicamos la ecuación de comparación de Ct mencionada anteriormente para el cálculo de la diferencia de expresión del gen manganeso-superóxido dismutasa entre ambos géneros.

2.15 Determinación cuantitativa de la actividad telomerasa

La determinación cuantitativa de la actividad telomerasa se realizó utilizando el kit Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} de la casa Roche-Boehringer Mannheim que consiste en un inmunoensayo enzimático fotométrico (ELISA) utilizando

previamente el protocolo de amplificación repetida del telómero (TRAP).

Este análisis, basado en una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utiliza la actividad telomerasa presente en las células de la muestra para adicionar repeticiones de telómeros en el extremo 3' de un oligonucleótido utilizado como sustrato.

2.15.1 Fundamento

El método se basa principalmente en la consecución de los siguientes pasos: (ver Figura III. 4).

✦ Elongación/Amplificación:

En un primer momento, la telomerasa procedente de la muestra, añade repeticiones teloméricas (TTAGGG) al extremo 3' de un “primer” sintético marcado con biotina (P1-TS). Los productos de elongación, al igual que el estándar interno (IS) incluido en la misma reacción, son amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los “primers” P1-TS y el “primer” reverso P2. Los productos de PCR que se derivan de la elongación a través de la telomerasa contienen específicamente secuencias incrementadas en 6 nucleótidos (TTAGGG), mientras que aquellos que provienen del estándar interno, tienen una longitud determinada de 216 pb.

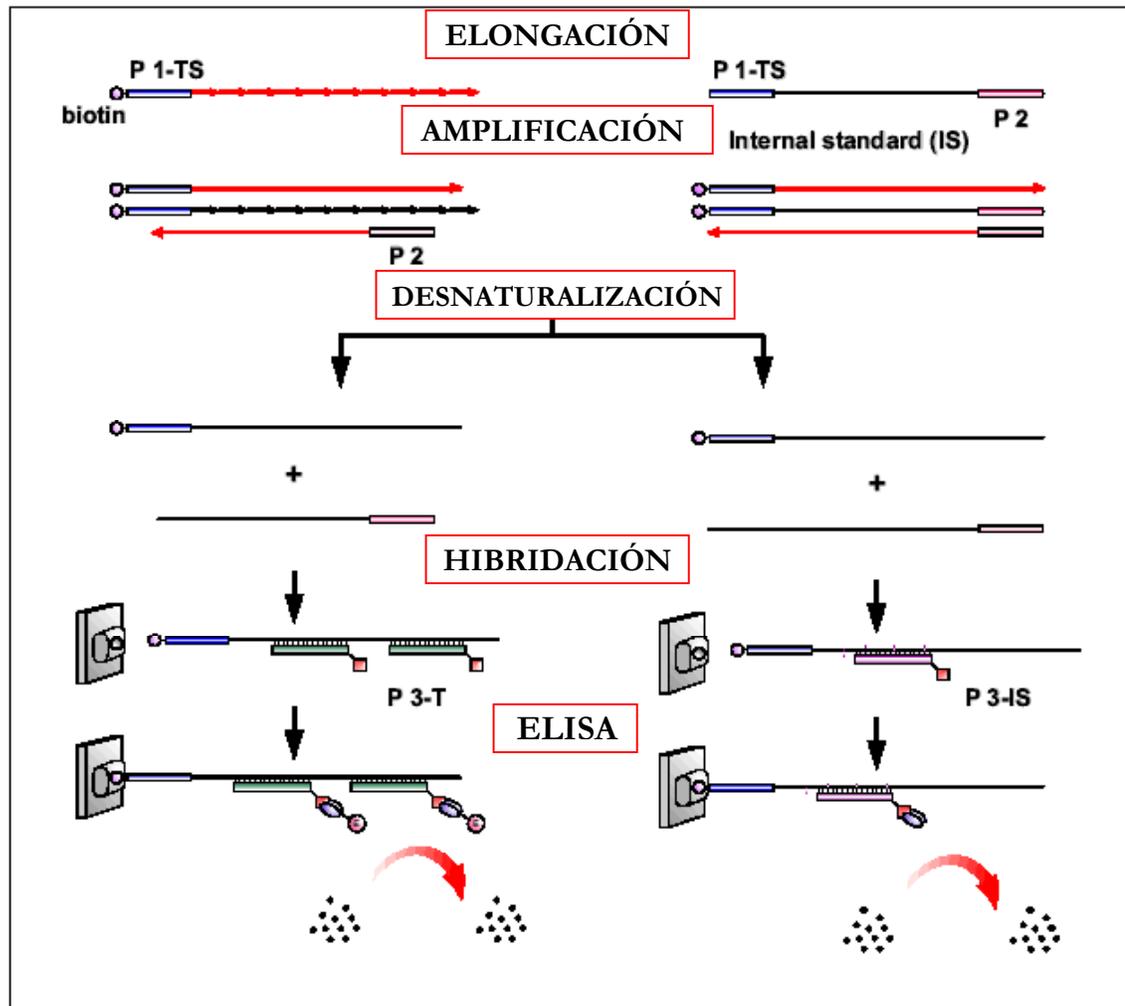


Figura III. 4.- Fundamento del kit Telo TAGGG
Telomerase PCR ELISA^{PLUS}.

✦ Detección a través de Enzimoimmunoensayo (ELISA):

Una vez obtenidos los productos de PCR se hacen dos alícuotas de cada muestra y se desnaturalizan para ser hibridadas posteriormente con sondas marcadas con digoxigenina. Una alícuota se hibridará con una sonda específica de las repeticiones teloméricas (P3-T), y la otra con una sonda específica del estándar interno (P3-

IS). Los híbridos resultantes se inmovilizan en la placa de ELISA mediante unión biotina (procedente del P1-TS) - estreptavidina (en la placa de ELISA). Una vez inmovilizados, los productos se detectan mediante la adición de un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano (Anti-DIG-HRP) y tetrametilbencidina (TMB) que reacciona con la peroxidasa, dando un producto coloreado cuya absorbancia puede ser detectada mediante espectrofotometría.

2.15.2 Reactivos

- Solución 1: Tampón de lisis
- Solución 2: Mezcla de reacción que contiene sustrato biotinilado P1-TS, “primer” reverso P2, nucleótidos y *Taq* DNA polimerasa.
- Solución 3: 0.001 amol/ μ L de DNA de 216 pb empleado como estándar interno en la reacción de amplificación.
- Solución 4: 0.001 amol/ μ L de DNA utilizado como control positivo, con la misma secuencia que un producto de la telomerasa con 8 repeticiones teloméricas (TS8).
- Solución 5: 0.1 amol/ μ L de DNA utilizado como control positivo, con la misma secuencia que un producto de la telomerasa con 8 repeticiones teloméricas (TS8).
- Solución 6: Agua bidestilada libre de RNAsas.
- Solución 7: Reactivo de desnaturalización que contiene una concentración de hidróxido sódico menor del 0.5 % para desnaturalizar los amplicones.

- Solución 8: Tampón de hibridación T, que contiene la sonda marcada con digoxigenina complementaria de las secuencias teloméricas (P3-T).
- Solución 9: Tampón de hibridación IS, que contiene la sonda marcada con digoxigenina complementaria del estándar interno (P3-IS).
- Solución 10: Tampón de lavado
- Solución 11: Anticuerpo policlonal de oveja anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano (Anti-DIG-HRP).
- Solución 12: Tampón de dilución del anticuerpo Anti-DIG-HRP para preparar la solución de trabajo.
- Solución 13: Sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)
- Solución 14: Reactivo para parar la reacción, contiene una concentración de ácido sulfúrico menor del 5 %.
- Placa de Enzimoimmunoensayo (ELISA): Placa de 96 pocillos pre-tratada con estreptavidina y posteriormente con reactivo de bloqueo.

2.15.3 Procedimiento

El procedimiento para la medida de actividad telomerasa requiere la consecución de tres pasos que a continuación detallamos:

✦ Preparación del extracto a partir de tejido

- 1.- Cada muestra de tejido previamente congelada a -80°C debe ser troceada hasta obtener láminas muy finas. Éstas deben transferirse rápidamente a un homogeneizador de vidrio que contiene 200 μl de tampón de lisis frío. Homogeneizar en

hielo a elevada velocidad hasta obtener una consistencia uniforme.

2.- Incubar en hielo durante 30 minutos.

3.- Centrifugar a 16000 g durante 20 minutos a 4°C.

4.- Recoger 175 μ L de sobrenadante en un “eppendorf”.

5.- Medir la concentración de proteínas en la muestra (ver apartado 6 de esta sección).

✦ Protocolo de amplificación repetida del telómero (TRAP)

Todos estos pasos deben realizarse en hielo.

6.- Preparar la mezcla de reacción que contiene por cada muestra:

- 25 μ L de mezcla de reacción.
- 5 μ L de estándar interno.
- c.s.p. 50 μ L de agua libre de RNAsas.

7.- Muestras:

- 10 μ g del sobrenadante obtenido a partir del tejido.
- 10 μ g de control negativo de la muestra (alícuota del sobrenadante inactivada la telomerasa mediante calentamiento a 85°C durante 10 minutos).
- 1 μ L de la solución de control positivo (TS8)

8.- Introducir cada una de las muestras (problema, control + y control -) y 30 μ L de mezcla en “eppendorf” adecuados para la amplificación.

9.- Programar el termociclador según las siguientes condiciones:

- Elongación por la telomerasa : 25°C durante 30’
- Inactivación de la telomerasa: 94°C durante 5’
- Amplificación: (30 ciclos)

- Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos
- Unión o “annealing”: 50°C durante 30 segundos
- Extensión: 72°C durante 90 segundos

- Extensión final: 72°C durante 10 minutos

✦ Desnaturalización/Hibridación y Enzimoimmunoensayo (ELISA)

- 10.- Pipetear 10 μL de reactivo de desnaturalización en dos tubos de reacción por separado. Introducir 2.5 μL del amplificado en cada uno de ellos. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 11.- Añadir 100 μL del tampón de hibridación T a uno de los tubos y 100 μL del tampón de hibridación IS al otro. Agitar los tubos enérgicamente.
- 12.- Incubar la mezcla durante 2 horas a 37°C bajo agitación a 300 r.p.m.
- 13.- Transferir 100 μL de la mezcla a la placa de ELISA e incubar durante 1 hora a 37°C bajo agitación a 300 r.p.m.
- 14.- Retirar completamente las soluciones de hibridación.
- 15.- Lavar tres veces con solución de lavado durante al menos 30 segundos. Retirar completamente la solución de lavado.
- 16.- Añadir 100 μL de la solución de trabajo (Anti-DIG-HRP), sellar la placa con el papel adhesivo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo agitación a 300 r.p.m.
- 17.- Lavar cinco veces con solución de lavado durante al menos 30 segundos. Retirar completamente la solución de lavado.

- 18.- Añadir 100 μL de la solución TMB previamente atemperado, sellar la placa con el papel adhesivo e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente bajo agitación a 300 r.p.m.
- 19.- Sin retirar la solución anterior, añadir 100 μL de la solución con ácido sulfúrico para parar la reacción.
La adición del ácido sulfúrico hace que el producto de la peroxidasa, obtenido al reaccionar con el TMB cambie de azul a amarillo, permitiendo una máxima sensibilidad en la medida.
- 20.- Mediante un lector de placas, medir la absorbancia de las muestras a 450 nm (frente a una medida de referencia a 690 nm) transcurridos 30 minutos desde la adición del ácido.

2.15.4 Cálculos.

La actividad telomerasa relativa (RTA) se obtiene tras la resolución de la siguiente ecuación:

$$RTA = \frac{(A_s - A_{so}) / A_{s,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,o}) / A_{TS8,IS}} \times 100$$

siendo:

A_s : absorbancia de la muestra

A_{so} : absorbancia del control negativo de la muestra

$A_{s,IS}$: absorbancia del estándar interno de la muestra

A_{TS8} : absorbancia del control positivo

$A_{TS8,o}$: absorbancia del control negativo con tampón de lisis

$A_{TS8,IS}$: absorbancia del estándar interno del control positivo

2.16 Cultivos celulares

Los cultivos celulares son el producto de la colección de células animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su supervivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, reciben el nombre de Cultivo Primario; cuando éste cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de **Líneas Celulares**.

Las **Líneas Celulares** continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo.

En nuestro estudio, empleamos la línea celular MCF-7, proveniente de células tumorales de glándula mamaria.

La razón por la cual escogimos esta línea celular es porque contiene receptores estrogénicos, como podemos comprobar en la figura adjunta, en la que se muestra la respuesta positiva de las células MCF-7 ante anticuerpos frente a receptores estrogénicos.

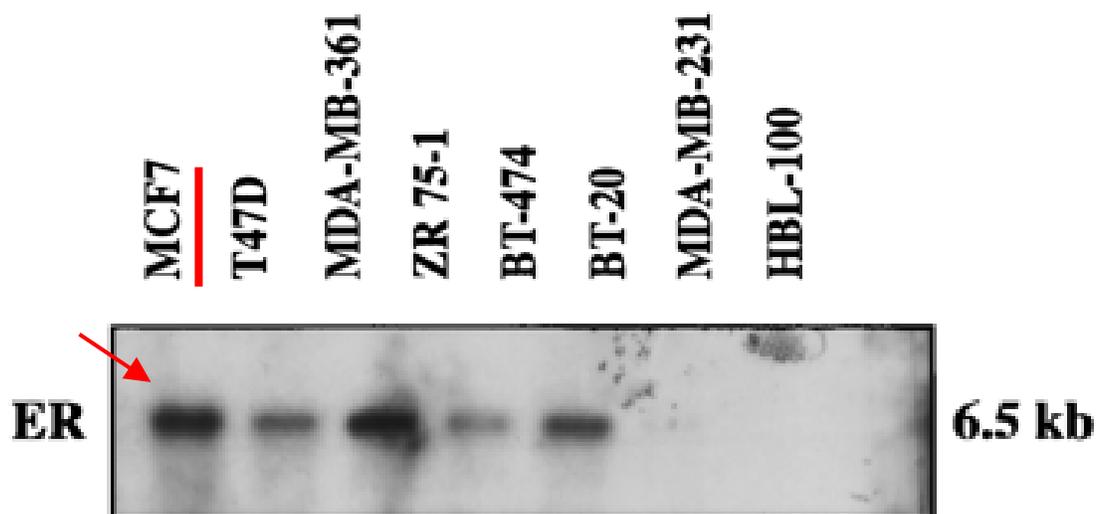


Figura III. 5.- Expresión de receptores estrogénicos en células tumorales de glándula mamaria MCF-7.

Además, como se muestra en la Tabla III. 2, existen numerosos estudios acerca del efecto de estrógenos y fitoestrógenos sobre el estrés oxidativo y los antioxidantes en este tipo de células.

Tabla III. 2. Efecto de estrógenos y fitoestrógenos en GSH/GSSG, GPx, GCS, GST, Mn-SOD en células MCF-7.

Tipo celular	Condiciones de cultivo	Mayores descubrimientos	Referencias
MCF-7	B-medium (sin rojo fenol) Modified DMEM	GSH $12.0 \pm 0.9 \mu\text{g}$ (total GSH/GSSG) / mg prot. BSO $100 \mu\text{M}$; Daño al DNA (8oxodG)	Mobley, J. A. Toxicol Appl Pharmacol 180: 219-26, 2002.
MCF-7	DMEM	GSH $28.8 \pm 5.6 \text{ fmol/cel}$; Tasa de síntesis $0.0179 \text{ fmol / min.cel}$ Tiempo de recambio (hr) 26.8; Actividad GCT $21.1 \text{ pmol/ mg..min}$; Actividad GCS 371 pmol/ mg.min	Gamsik, M. P. BiochemPharmacol. 63: 843-5, 2002.
MCF-7		El estrés redox extracelular puede regular la función del RE intracelular DTT, H_2O_2	Liang, X. Mol Cell Endocrinol. Nov 25;146: 151-61, 1998.
Células de adenocarcinoma		GSH, GPx, GCS son regulados durante el ciclo celular	Lewis A. D. Carcinogenesis. 9:1283-7, 1988.
MCF-7	DMEM con rojo fenol	Quercetina y Miricetina aumentan los niveles intracelulares de GSH a elevadas concentraciones ($50- 100 \mu\text{M}$)	Rodgers, M. H. Chem Biol. Interact. 116:213-28, 1998.
MCF-7	DMEM / F2 + glutamina Suero de ternera	MCF-7 tienen actividad de GPx baja (4.96 U / mg prot) GPx inhibe NF-kB reduciendo el estrés oxidativo	Zhao, L. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 6356-61, 2000
MCF-7	DMEM	GSTM3 expresión baja ($1-10 \text{ fmol/l}$) a 16 h tratamiento Genisteína no afecta esta expresión	Leffers, H. Hum Reprod. 16: 1037-45, 2001.
MCF-7		GPx actividad $0.24 \text{ nmol / mg.min}$ No se detecta mRNA GPx Relación entre expresión de GST y GPx	Akman, S. A. Cancer Res. 50:1397-402, 1990.

Tabla III. 2. Efecto de estrógenos y fitoestrógenos en GSH/GSSG, GPx, GCS, GST, Mn-SOD en células MCF-7 (Continúa).

Tipo celular	Condiciones de cultivo	Mayores descubrimientos	Referencias
MCF-7		Actividad GPx 0.37 nmol / mg. min ; Actividad SOD 0.58 µg / mg	Doroshov J.H Free Radic Res Commun. 12-13:779-81, 1991.
MCF-7		Expresión Mn-SOD aumenta con TNF	Siemankowski, L.M. Free Radic Biol Med. 26: 919- ^{ooooo} 24, 1999
MCF-7	DMEM	Sobreexpresión de Mn-SOD in MCF-7 regula la expresión de otros genes relacionados con apoptosis, daño al DNA y factores de transcripción	Zhongkui, L. Free Radic Biol Med. 30:260-7, 2001.

GPx: glutatión peroxidasa; GCS: glutamil cistein sintetasa; GST: glutamil-S-transferasa; Mn-SOD: manganeso superóxido dismutasa; GCT: glutamil cistein transferasa; PhGPx: fosfolípido glutatión preoxidasa; GSTmu3: GST subunidad mu3; CAT: catalasa; DTT: ditioneitol; BSO: butionil sulfoximina

2.16.1 Condiciones de cultivo

Las células MCF-7 se cultivaron según indicaciones de la AMERICAN TYPE CELL CULTURE (ATCC).

Se prepara el medio de cultivo en frascos de poliestireno de 75 cm² (T75) suministrados por Falcon Labware, USA. Para un volumen final de 15 mL, la composición del medio de cultivo es la siguiente:

- Iscove's Modified Dulbecco's Medium
(GIBCO Lab. USA), pH 7.4.....13.5 mL
- Suero bovino fetal (10% volumen final).....1.5 mL
- Gentamicina (50 µg/mL conc. final).....15 µL
- Estreptomycin (100 µg/mL conc. final).....15 µL
- Penicilina (100 µg/mL conc. final).....15 µL
- Fungizona (25 µg/mL conc. final)..... 15 µL

Una vez preparado el medio de cultivo, se añaden las células en número deseado y se introduce la mezcla en un frasco T75.

Los frascos se incuban a 37°C en una estufa incubadora bajo una atmósfera con un 5 % de CO₂.

El medio de cultivo se renovó dos o tres veces por semana.

2.16.2 Procedimiento

Se dejó crecer el cultivo hasta un 80 % de confluencia en frascos de poliestireno de 75 cm² (T75). Una vez alcanzada la confluencia deseada, se procedió a la incubación de las células según las diferentes condiciones experimentales:

✦ Para la **curva de concentraciones**, se realizaron las siguientes incubaciones:

- **Control:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de DMSO, que es el vehículo del 17β -estradiol, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 10 nM:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 10 μM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 0.12 μM :** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 120 μM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 0.6 μM :** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 0.6 mM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 3 μM :** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 3 mM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 15 μM :** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 15 mM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes

de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.

✦ Para la **curva de tiempos**, se realizaron las siguientes incubaciones:

- **Control:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de DMSO, que es el vehículo del 17β -estradiol, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 15 μM , 3 minutos:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 15 mM disuelta en DMSO, durante 3 minutos, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 15 μM , 5 minutos:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 15 mM disuelta en DMSO, durante 5 minutos, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 15 μM , 10 minutos:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 15 mM disuelta en DMSO, durante 10 minutos, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **17β -estradiol 15 μM , 20 minutos:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μL de una solución madre de 17β -estradiol 15 mM disuelta en DMSO,

durante 20 minutos, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.

- **17 β -estradiol 15 μ M, 1 hora:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μ L de una solución madre de 17 β -estradiol 15 mM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- ✦ El resto de experimentos se realizaron siguiendo las siguientes incubaciones:
 - **Control:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μ L de DMSO, que es el vehículo del 17 β -estradiol, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
 - **Tamoxifeno 15 μ M:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μ L de una solución madre de tamoxifeno 15 mM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
 - **17 β -estradiol 15 μ M:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μ L de una solución madre de 17 β -estradiol 15 mM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
 - **Genisteína 15 μ M:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μ L de una solución madre de genisteína 15 mM disuelta en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.

- **17 β -estradiol 15 μ M + Tamoxifeno 15 μ M:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μ L de una solución madre de 17 β -estradiol 15 mM y 15 μ L de una solución madre de tamoxifeno 15 mM ambas disueltas en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **Genisteína 15 μ M + Tamoxifeno 15 μ M:** células al 80 % de confluencia a las que se añadió 15 μ L de una solución madre de genisteína 15 mM y 15 μ L de una solución madre de tamoxifeno 15 mM ambas disueltas en DMSO, durante 1 hora, antes de la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno.

Una vez realizadas las incubaciones, se procedió a la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en las diferentes condiciones, tal y como se expone a continuación.

2.17 Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7

2.17.1 Fundamento

Utilizamos el mismo método señalado en el apartado 2.4.1. de la presente tesis, pero en este caso no suministramos sustratos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, puesto que no entran en la célula. Nuestro objeto es determinar los niveles de H₂O₂ existentes en el interior de la célula en cada una de las condiciones anticipadas en el apartado 2.14.2 de la presente tesis.

2.17.2 Reactivos

- Solución PBS (tampón sodio fosfato pH 7.4)
- Solución Glicina-EDTA: Glicina 2 mM, EDTA 50 mM, NaOH 2.2 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta $\text{pH} \geq 11$.
- Ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético) 0.1 mM (concentración final en el tubo) disuelto en PBS.
- Peroxidasa de rábano 6 U/mL.

2.17.3 Procedimiento

Realizamos la mezcla de reactivos que contiene las siguientes cantidades de reactivo por cada determinación: 5 μL de peroxidasa de rábano 6 U/mL, 20 μL de ácido homovanílico 1 mM, y hasta 2 mL de PBS. Dicha mezcla se añade a cada uno de los frascos, que previamente han sido lavados dos veces con PBS, y se deja durante 5 minutos a 37°C en la estufa de incubación. Transcurrido ese tiempo, se sacan los frascos y se para la reacción por medio de la adición de 1 mL de tampón Glicina-EDTA $\text{pH} \geq 11$.

Una vez detenida la reacción, se procede al raspado de las células, y se recoge todo el contenido (células y mezcla de reacción) en tubos de propileno para su posterior centrifugación a 15000 g durante 15 minutos. Una vez centrifugados los tubos, se toma el sobrenadante y se determinan los niveles de peróxido de hidrógeno siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado 2.4.3 de la presente tesis.

El precipitado celular, tras su disolución en NaCl 1N, facilitada mediante la aplicación de calor, nos servirá para determinar la cantidad de proteínas de las células.

2.17.4 Cálculos

Los cálculos se realizan de la misma forma que en el apartado 2.4.4 de la presente tesis.

2.18 Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó un análisis de la varianza. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de aquellos grupos en los cuales F no fue significativa para un valor $p \leq 0.05$. Luego, el grupo de datos para los que F fue significativa fue analizado por el test de la t de Student. La simbología empleada en la presente tesis es la siguiente: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

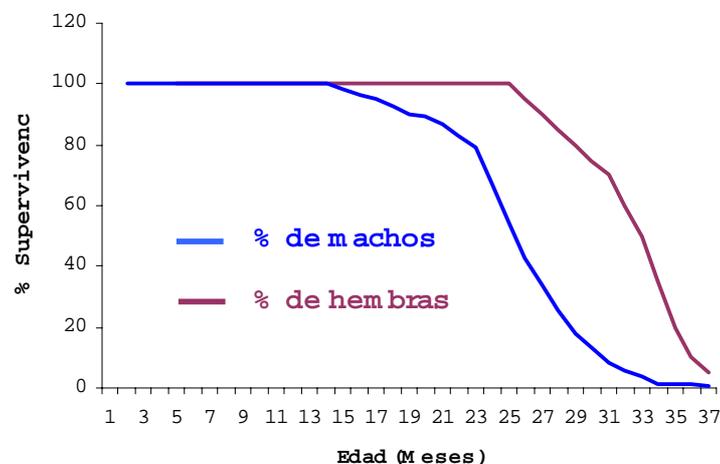
IV. RESULTADOS

4.1 CURVA DE SUPERVIVENCIA DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

Con el propósito de comprobar en nuestro laboratorio los estudios ya publicados acerca de la mayor longevidad de las hembras con respecto los machos (Fernández-Ballesteros, 1999; Wilmoth, 2000), seguimos la evolución de las ratas estabuladas en el animalario de la Facultad de Medicina. Con los datos que obtuvimos de las defunciones de las ratas tanto machos como hembras, construimos una curva de longevidad.

La Figura IV.1 muestra la curva de longevidad de ratas Wistar machos y hembras, sometidas a las mismas condiciones de estabulación en el animalario de la Facultad de Medicina de Valencia.

Figura IV. 1.- Curva de supervivencia de ratas macho y hembra



En primer lugar destaca la forma rectangular de las curvas de ambos géneros. Éstas pertenecen a las curvas tipo I o convexas, las cuales caracterizan a las especies con baja tasa de mortalidad hasta alcanzar una cierta edad en que aumenta rápidamente. Tal es el caso de la mayor parte de los grandes mamíferos, incluido el hombre, si se encuentran en buenas condiciones de vida, como es el caso de nuestra sociedad y también de las ratas estabuladas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

En segundo lugar se observa que la vida media de las ratas hembras es superior a las de las ratas machos. Así, la vida media de las ratas macho es de 24 meses, mientras que las ratas hembra viven una media de 29 meses. Esta diferencia de 5 meses de vida supone que las ratas hembra viven un 14.5 % más que las ratas macho, en función del porcentaje total de supervivencia.

Por tanto, experimentalmente comprobamos que la longevidad media de las ratas hembra es superior en comparación con las ratas macho. Los machos envejecen a un ritmo superior en comparación con las hembras.

Sin embargo, podemos comprobar que la longevidad máxima es comparable en ambos géneros.

Una vez establecidas las diferencias de longevidad media entre ambos géneros, nuestro objetivo fue estudiar posibles diferencias de estrés oxidativo que pudieran justificar las diferencias de envejecimiento observadas. Como ha sido indicado en la sección de Introducción de la presente tesis, existe una estrecha relación entre envejecimiento y estrés oxidativo (Harman y cols., 1956).

Para ello determinamos diversos parámetros de estrés oxidativo en mitocondrias aisladas de diversos tejidos procedentes de machos y

hembras, puesto que el estrés oxidativo generado en las mitocondrias ocupa un papel relevante en el envejecimiento (Miquel y cols. 1980).

4.2 TAMAÑO Y COMPLEJIDAD DE MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO Y CEREBRO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

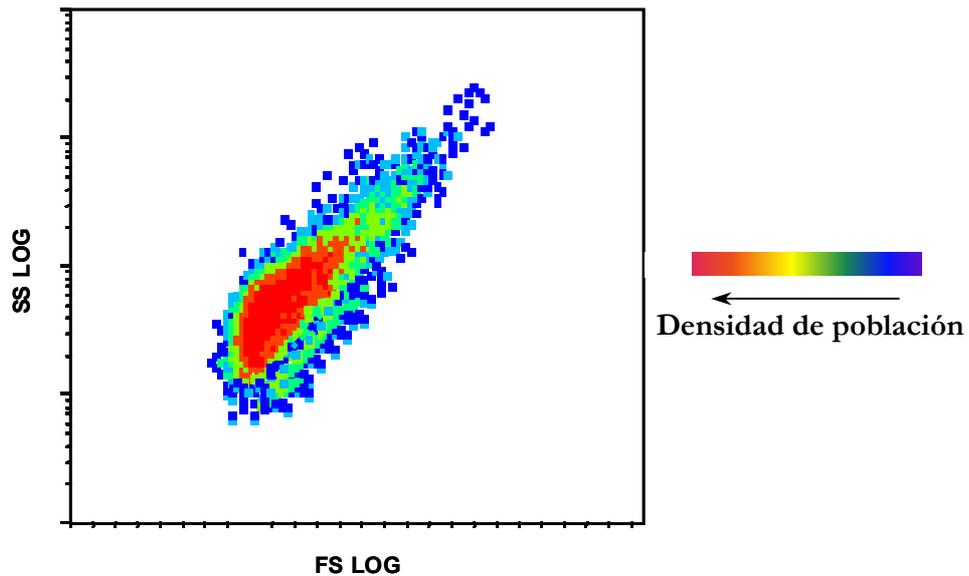
Como hemos señalado en el apartado de Métodos de la presente tesis, aislamos mitocondrias de hígado y de cerebro de ratas machos y hembras. En el caso de las mitocondrias cerebrales, durante el proceso de aislamiento separamos las mitocondrias sinápticas de las no sinápticas.

Con el objeto de observar la población mitocondrial obtenida tras el proceso de aislamiento, analizamos por citometría de flujo las mitocondrias aisladas de los diversos tejidos en ambos géneros.

Para cada uno de los tejidos estudiados en ambos géneros, analizamos por citometría de flujo la población de mitocondrias aisladas, comprobando la existencia de una única población.

La Figura IV.2 representa la población mitocondrial obtenida a partir del hígado de un macho joven.

Figura IV.2.- Imagen representativa de la población mitocondrial hepática.



Una vez comprobado que existía una única población mitocondrial, analizamos el tamaño y la complejidad de las mitocondrias.

En la Tabla IV.1 podemos comprobar que el **tamaño mitocondrial** no difiere entre machos y hembras en ninguno de los casos estudiados, es decir, mitocondrias hepáticas, mitocondrias sinápticas y mitocondrias no sinápticas.

Tabla IV.1.- Tamaño de mitocondrias aisladas de hígado y de cerebro de ratas machos y hembras.

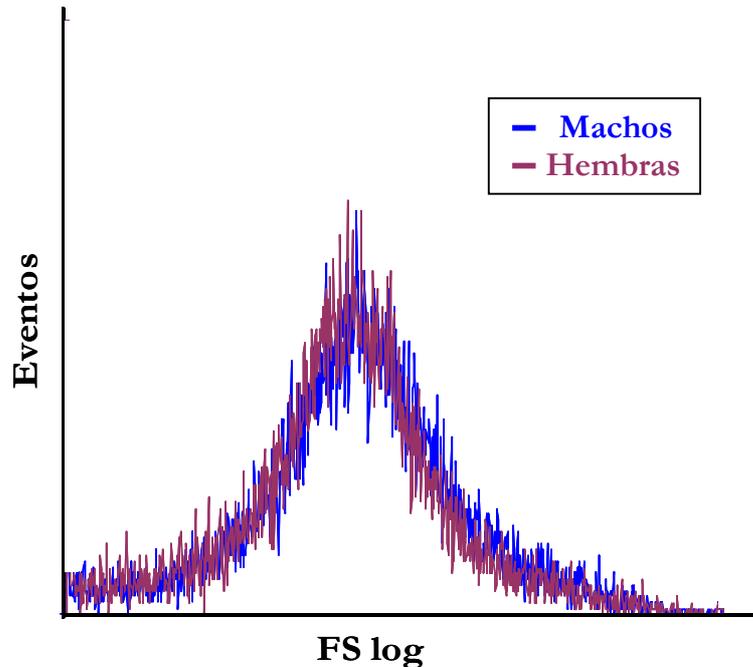
Mitocondrias	Machos	Hembras
Hepáticas	29±1 (n=8)	29±1 (n=8)
Cerebrales No-Sinápticas	35±4 (n=6)	34±4 (n=10)
Cerebrales Sinápticas	32±6 (n=5)	34±4 (n=5)

Los valores expresados en la tabla son la media \pm SEM con el número de animales indicado entre paréntesis. En ninguno de los casos existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Esta tabla nos ilustra además acerca de la diferencia de tamaño existente entre las mitocondrias hepáticas y cerebrales, siendo éstas últimas de mayor tamaño que las primeras.

La Figura IV.3 nos muestra una imagen representativa del tamaño de mitocondrias aisladas de hígado de machos y hembras, donde se demuestra que no existen diferencias de tamaño entre las mitocondrias de un género y otro.

Figura IV.3.- Imagen representativa del tamaño de mitocondrias aisladas del hígado de ratas machos y hembras.



La **complejidad mitocondrial** se determina por citometría de flujo a través de la medida de la dispersión de la luz a 90° respecto al haz de luz láser, siendo parámetro un índice de la complejidad estructural mitocondrial.

La Tabla IV.2 nos muestra la complejidad de mitocondrias procedentes del hígado de ratas machos y hembras. Como podemos observar, el tamaño mitocondrial no difiere entre machos y hembras en ninguno de los casos estudiados, es decir, mitocondrias hepáticas, mitocondrias sinápticas y mitocondrias no sinápticas.

Tabla IV.2.- Estructura o complejidad de mitocondrias aisladas de hígado y de cerebro de ratas machos y hembras.

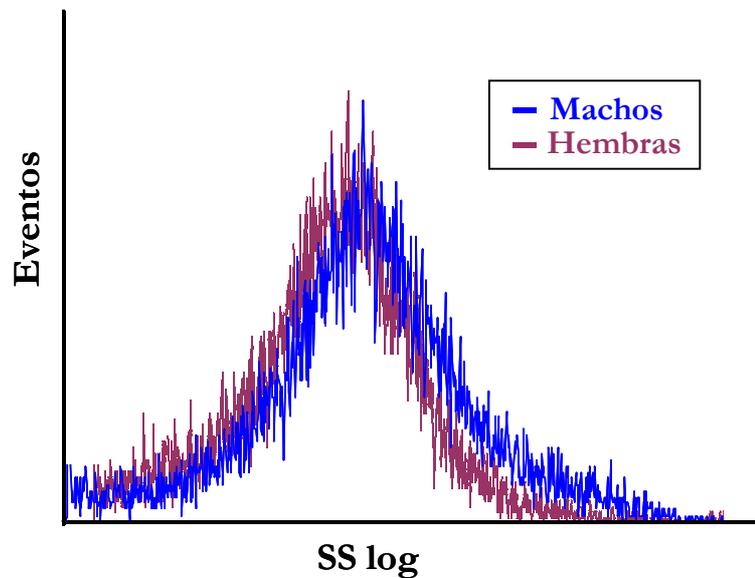
Mitocondrias	Machos	Hembras
Hepáticas	11±3 (n=7)	13±4 (n=7)
Cerebrales No-Sinápticas	14±2 (n=6)	15±3 (n=8)
Cerebrales Sinápticas	20±1 (n=4)	22±2 (n=5)

Los valores expresados en la tabla son la media \pm SEM con el número de animales indicado entre paréntesis. En ninguno de los casos existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Una vez más, podemos comprobar diferencias de complejidad entre mitocondrias aisladas de los diversos tejidos, hepáticas y cerebrales, siendo éstas últimas de mayor complejidad que las primeras.

La Figura IV.4 nos muestra una imagen representativa de la dispersión la luz a 90° respecto al haz de luz láser que nos informa sobre la complejidad de mitocondrias aisladas de hígado de machos y hembras, donde se demuestra que no existen diferencias de complejidad mitocondrial entre las mitocondrias de un género y otro.

Figura IV.4.- Imagen representativa de la complejidad de mitocondrias aisladas del hígado de ratas machos y hembras.



4.3 CONSUMO DE OXÍGENO POR MITOCONDRIAS HEPÁTICAS AISLADAS DE MACHOS Y HEMBRAS.

El consumo de oxígeno ha sido considerado como determinante de la longevidad de las especies, de modo que un mayor consumo de oxígeno aumenta la producción de radicales libres, y por tanto conduce a una disminución de la longevidad (R. Pearl, 1928). Sin embargo, existen dos especies en las que esta

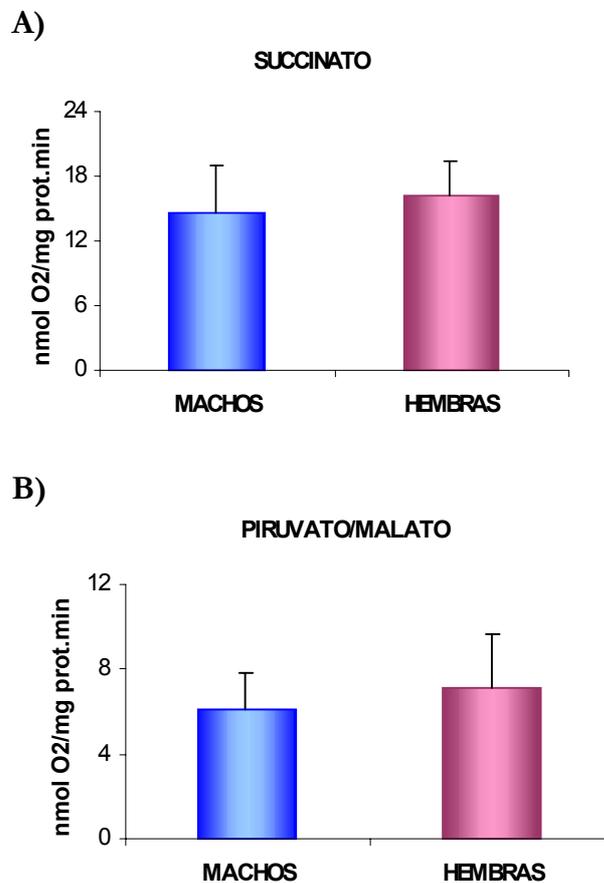
relación no se cumple: los pájaros y los primates consumen grandes cantidades de oxígeno, y a su vez son muy longevas. La explicación de esta paradoja es que la producción mitocondrial de hidroperóxidos no es proporcional a la cantidad de oxígeno consumido, sino que depende de la eficacia de las mitocondrias a la hora de consumir ese oxígeno. (G. Barja y cols., 1994; R. Pérez-Campo y cols., 1998). Por ello, debe considerarse como determinante de la máxima longevidad de las especies la tasa de producción de ROS y no la tasa de consumo de oxígeno.

La Figura IV.5 representa el consumo de oxígeno o tasa de respiración de mitocondrias aisladas de hígado procedente de ratas macho y hembra. Éste ha sido determinado en estado 4 de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, es decir en ausencia de ADP, suministrando sustratos que donan sus electrones al complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como el succinato (A), y sustratos donantes de electrones del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como el piruvato y el malato (B).

Como podemos comprobar, las mitocondrias aisladas de hígado de ratas macho consumen en estado 4 cantidades similares de oxígeno, expresados en nmol O₂/mg proteína. minuto, que las mitocondrias procedentes del hígado de las ratas hembras. Ello ocurre tanto suministrando donantes electrónicos del complejo II (succinato) como del complejo I (piruvato/malato) de la cadena respiratoria mitocondrial.

Es decir, no existen diferencias en la tasa de respiración mitocondrial en estado 4 entre mitocondrias procedentes del hígado de ratas macho y hembra de la misma edad cronológica.

Figura IV.5.- Consumo de oxígeno mitocondrial en estado IV de mitocondrias hepáticas de machos y de hembras suministrando sustratos que donan sus electrones al complejo II (A: succinato) o al complejo I (B: piruvato-malato) de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra para el caso de los machos es de 4 ratas, y de 3 para el de las hembras. En ninguno de los casos existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

4.4 TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS.

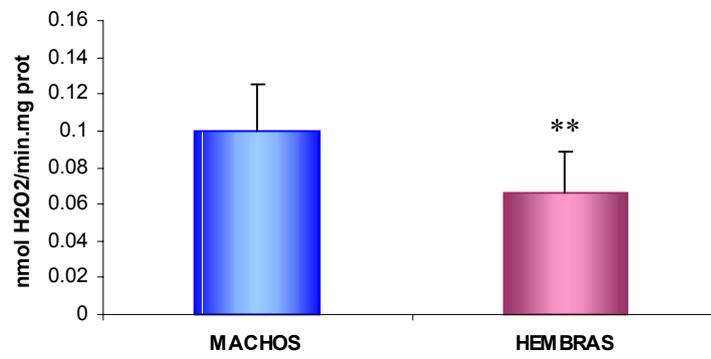
Como hemos señalado anteriormente, la tasa de producción de ROS puede considerarse como determinante de la longevidad de las especies. (D. Harman, 1986; R.S. Sohal y R. Weindruch, 1996; G. Barja, 1999).

Con esta premisa, nos planteamos determinar la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de machos y hembras, como posible factor responsable de la diferencia de longevidad existente entre ambos grupos experimentales.

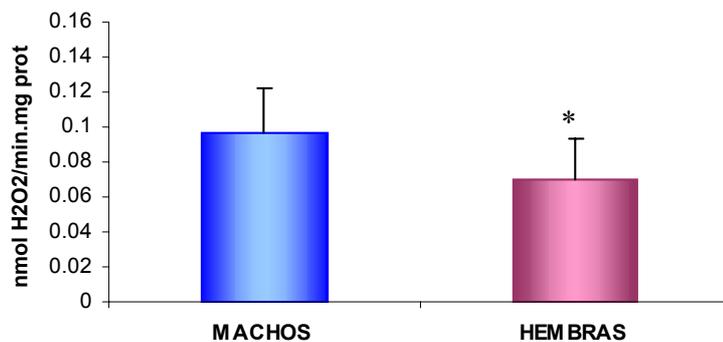
La Figura IV.6 muestra la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas del hígado de ratas macho y hembra jóvenes. Ésta ha sido medida, como en el caso del consumo de oxígeno, en estado 4 de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, suministrando sustratos que donan sus electrones al complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como el succinato (A), y sustratos donantes de electrones del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como el piruvato y el malato (B).

Figura IV.6.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de machos y hembras, suministrando donantes de electrones del complejo II (A) Succinato y del complejo I (B) Piruvato-malato de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, respectivamente.

A) Succinato



B) Piruvato-Malato



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra para el caso de los machos es de 13 ratas, y de 14 para el de las hembras. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ frente a los machos.

Como se puede observar, las mitocondrias hepáticas de las ratas macho producen una cantidad significativamente superior de peróxido de hidrógeno que las obtenidas a partir del hígado de las ratas hembra. En el caso de aportar sustratos donantes de electrones del complejo II (succinato) de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, las mitocondrias de los machos producen un 34% más de peróxido de hidrógeno que las procedentes de las hembras. Cuando suministramos donantes de electrones del complejo I (piruvato y malato) de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, las mitocondrias de los machos producen un 28% más de peróxido de hidrógeno que las de las hembras.

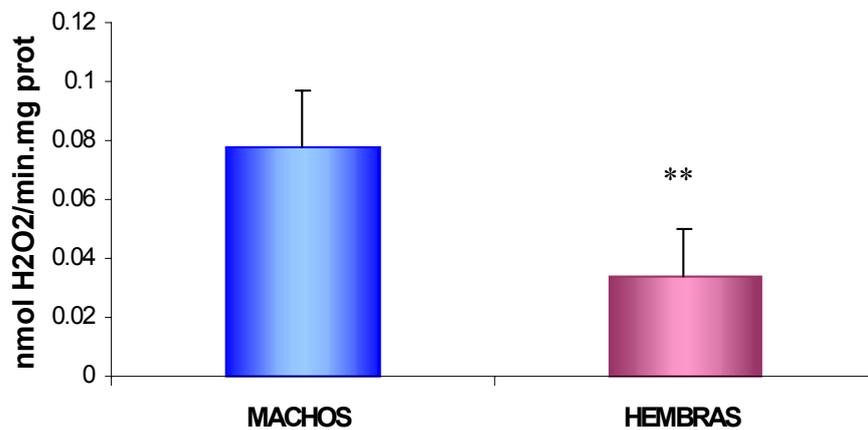
Así pues, con una misma tasa de respiración mitocondrial (ver Figura IV.5), las mitocondrias procedentes del hígado de ratas hembras utilizan el oxígeno de modo más eficaz que las procedentes del hígado de ratas machos, generando así una menor tasa de producción de radicales libres.

4.5 TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS CEREBRALES DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS.

Basándonos en la idea de Miquel que propone que el envejecimiento debe ser estudiado en células de tejidos post-mitóticos (Miquel, J., 1980), decidimos estudiar la velocidad de generación de peróxidos en el cerebro, puesto que es el único tejido en el que coexisten células post-mitóticas (neuronas) y células con capacidad de dividirse (glia).

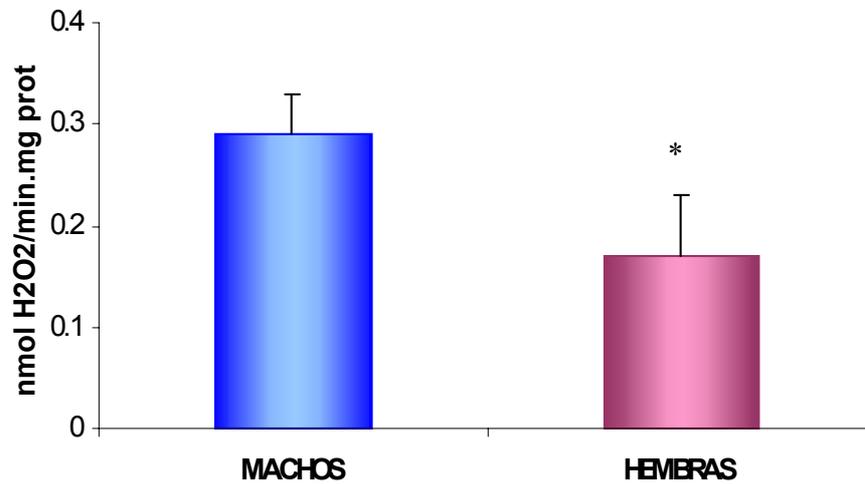
La Figura IV.7A y IV.7B representan la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias procedentes del cerebro de ratas macho y hembra jóvenes. Durante el aislamiento de las mitocondrias, separamos las mitocondrias sinápticas (ver Figura IV.7A) de las mitocondrias no sinápticas (ver Figura IV.7B) mediante centrifugación diferencial (ver apartado 2.1.2. de la sección Materiales y Métodos de la presente tesis) y se determinó la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en ambas por separado. Como en el caso anterior, esta tasa de producción se midió en estado 4 de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, suministrando sustratos que donan sus electrones al complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como el succinato, y sustratos donantes de electrones del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como el piruvato y el malato.

Figura IV.7A.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias cerebrales no sinápticas suministrando piruvato-malato a la cadena de transporte electrónico mitocondrial.



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra para el caso de los machos es de 9 ratas, y de 5 para el de las hembras. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como ** $p < 0.01$ frente a los machos.

Figura IV.7B.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias cerebrales sinápticas suministrando succinato a la cadena de transporte electrónico mitocondrial.



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra para el caso de los machos es de 5 ratas, y de 4 para el de las hembras. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como * $p < 0.05$ frente a los machos.

La Figura IV.7A nos muestra que las mitocondrias no sinápticas de las ratas macho producen un 56% más de peróxido de hidrógeno que las obtenidas a partir del cerebro de las ratas hembra, aportando sustratos donantes de electrones del complejo I (piruvato y malato) de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Asimismo, en la Figura IV.7B se comprueba que este hecho también se reproduce en las mitocondrias sinápticas, aportando succinato como sustrato, y obteniendo, en este caso, una diferencia del 41% a favor de los machos.

Además, si nos fijamos en la Figura IV.6 de nuevo, podemos comprobar cómo la tasa de producción de peróxidos es mayor en las mitocondrias sinápticas (procedentes de células post-mitóticas) aisladas de cerebro que en las obtenidas a partir de hígado.

Es más, las diferencias de producción de peróxidos entre ambos géneros son mayores en el caso de las mitocondrias cerebrales en comparación con las obtenidas en las mitocondrias hepáticas.

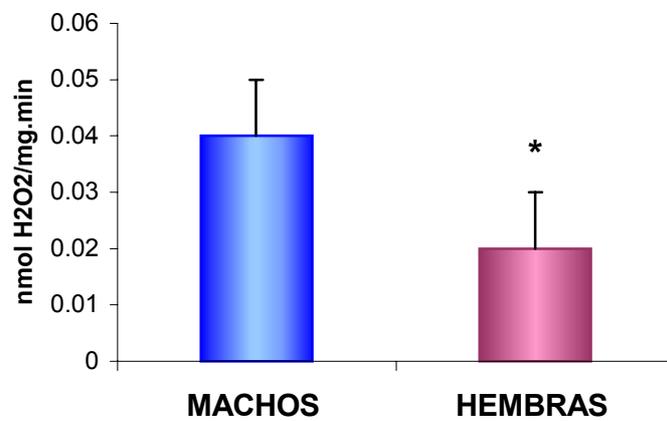
4.6 TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATONES MACHOS Y HEMBRAS.

Una vez establecidas las diferencias de producción de radicales libres entre machos y hembras en ratas Wistar, decidimos extender el estudio a otra especie animal, para comprobar que el fenómeno encontrado no es específico de una sola especie animal.

La Figura IV.8 representa la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones OF1 machos y hembras jóvenes. Ésta se determinó en estado 4 de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, suministrando sustratos que donan sus electrones al complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como el succinato.

Como podemos comprobar, una vez más las mitocondrias procedentes de los machos producen peróxido de hidrógeno en mayor cantidad que las de las hembras, demostrando que este hecho no es particular de una única especie (*Rattus norvegicus*), sino que se reproduce en otras especies como son los ratones (*Mus musculus*).

Figura IV.8.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos y hembras jóvenes.



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 4 ratones para ambos grupos experimentales. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como * $p < 0.05$ frente a los machos.

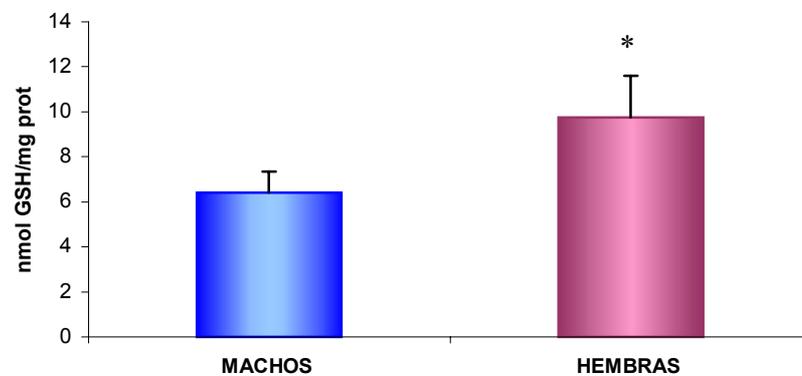
4.7 NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE MACHOS Y HEMBRAS.

En vista de que la producción de radicales libres por las mitocondrias procedentes de los machos es siempre superior a la de las hembras, nos planteamos estudiar posibles diferencias en los niveles de antioxidantes.

Así, determinamos en mitocondrias aisladas de hígado de ambos géneros los niveles de glutatión reducido, uno de los principales antioxidantes endógenos no enzimáticos, cuyas propiedades han sido descritas en la sección de Introducción de la presente tesis.

Como podemos observar en la Figura IV.9, las hembras poseen una mayor cantidad de glutatión reducido en el seno de sus mitocondrias en comparación con los niveles encontrados en las mitocondrias hepáticas de los machos. Así pues, las hembras están más protegidas frente al estrés oxidativo que los machos.

Figura IV.9.- Niveles de GSH en mitocondrias hepáticas de machos y hembras.



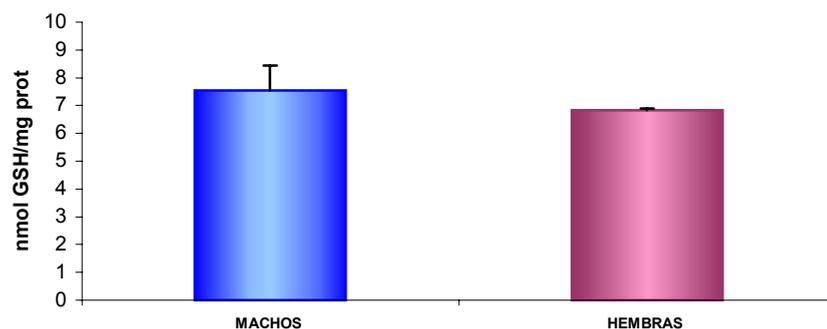
Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 4 ratas para ambos grupos experimentales. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como * $p < 0.05$ frente a los machos.

4.8 NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN HOMOGENADOS HEPÁTICOS DE MACHOS Y HEMBRAS.

Estudiamos los niveles de glutatión reducido en homogenados hepáticos.

Al determinar los niveles de este antioxidante en homogenados de hígado de ratas machos y hembras, no obtuvimos diferencias significativas entre ambos géneros (ver Figura IV.10). Este hecho realza la importancia de la mitocondria en la generación de radicales libres, y por tanto, en el proceso de envejecimiento, justificando la teoría expuesta por Miquel en los años 80 (Miquel, J. y cols., 1980).

Figura IV.10.- Niveles de GSH en homogenados hepáticos de machos y hembras.



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 5 ratas para ambos grupos experimentales. No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

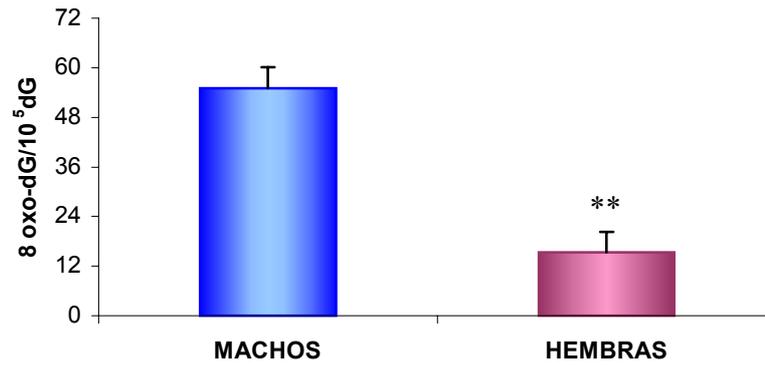
4.9 DAÑO OXIDATIVO AL DNA MITOCONDRIAL DE HÍGADO EN MACHOS Y HEMBRAS.

Otro parámetro de estrés oxidativo muy importante, y relacionado con la longevidad, es el daño oxidativo al DNA mitocondrial (Barja y cols., 2002). Aislamos DNA mitocondrial de hígado de ratas de ambos géneros y se determinó el daño oxidativo mediante de la medida de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (los radicales libres forman este compuesto cuando atacan a la guanosina del DNA).

La Figura IV.11 muestra que el DNA mitocondrial de los machos está un 72 % más oxidado que el de las hembras.

Una vez más otro parámetro de estrés oxidativo aparece elevado significativamente en los machos con respecto a las hembras.

Figura IV.11.- Daño oxidativo al DNA mitocondrial de hígado



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 4 ratas para ambos grupos experimentales. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como ** $p < 0.01$ frente a los machos.

4.10 EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE GLUTATIÓN PEROXIDASA EN HÍGADO DE MACHOS Y HEMBRAS.

Una vez establecidas las diferencias de estrés oxidativo entre machos y hembras, nos planteamos la existencia de una posible base molecular que diera explicación a los resultados obtenidos.

Extrajimos RNA de hígado de ratas machos y hembras de la misma edad cronológica, y determinamos la expresión génica de varias enzimas antioxidantes estrechamente relacionadas con la mitocondria: la glutatión peroxidasa (GPx) y la manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD, ver apartado 4.11 de la presente tesis) mediante retrotranscripción – amplificación (RT-PCR).

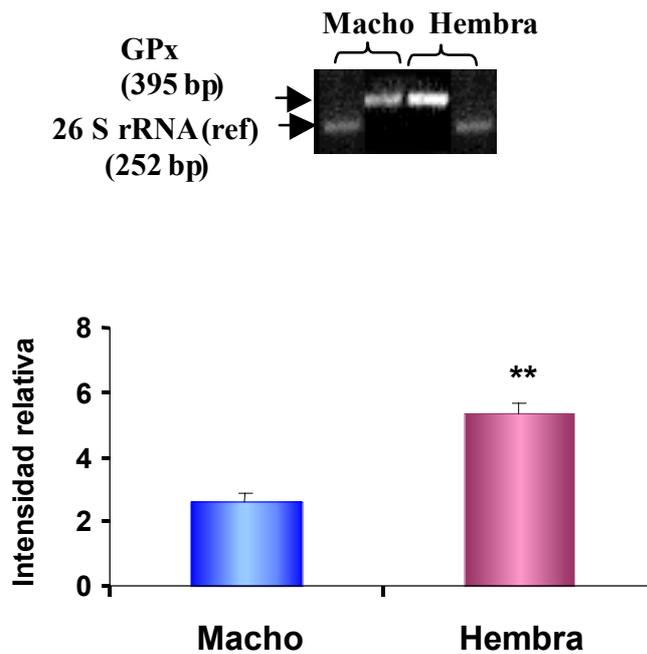
En la Figura IV.12A podemos comprobar que la expresión de la glutatión peroxidasa está aumentada en el hígado de las hembras en comparación con el de los machos. La densitometría y posterior análisis estadístico de los resultados nos muestra que esta diferencia es significativa

Con el fin de determinar si las diferencias de expresión génica se traducían en una distinta actividad enzimática de la glutatión peroxidasa, aislamos mitocondrias de hígado de ratas de ambos géneros, y medimos la actividad de esta enzima. En la Figura IV.12B podemos observar que las mitocondrias hepáticas de las ratas hembra presentan una mayor actividad glutatión peroxidasa que las

de los machos. Ello nos indica que sí que existe una concordancia entre la expresión génica y la actividad enzimática en el caso de la enzima glutatión peroxidasa.

Figura IV.12.- Expresión (A) y actividad (B) de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa en hígado de machos y hembras.

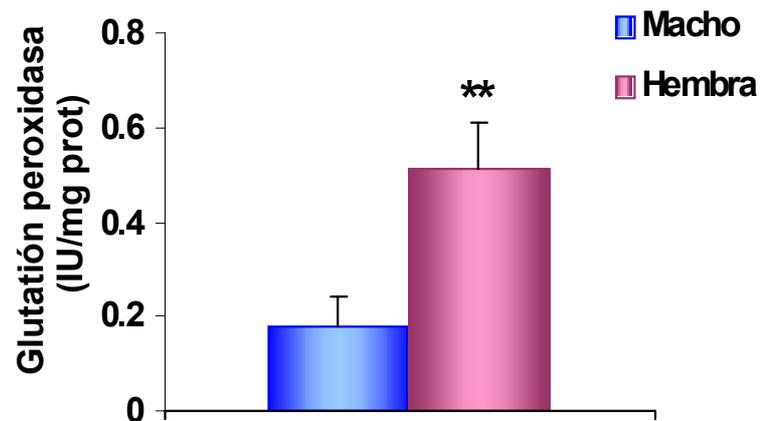
A) Expresión



Los valores tras análisis densitométrico de los resultados se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 3 ratas para ambos grupos experimentales. La

significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como ** $p < 0.01$ frente a los machos.

B) Actividad enzimática



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 5 ratas para ambos grupos experimentales. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como ** $p < 0.01$ frente a los machos.

4.11 EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE MANGANESO-SUPERÓXIDO DISMUTASA EN HÍGADO DE MACHOS Y HEMBRAS.

Como mencionamos anteriormente, también determinamos la expresión génica de la enzima antioxidante mitocondrial manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD) mediante RT-PCR en hígado de ratas macho y hembra.

La Figura IV.13A nos muestra que la expresión de esta enzima es mayor en el hígado de las ratas hembra en comparación con el de las ratas macho. Una vez más, la densitometría y posterior análisis estadístico de los resultados, revelan que estas diferencias son significativas.

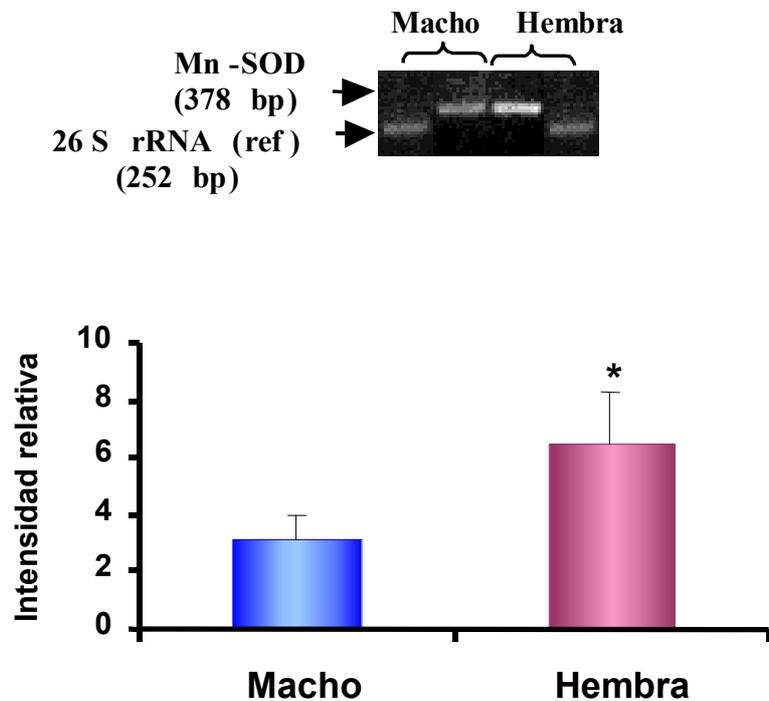
Este resultado fue corroborado por **RT-PCR cuantitativa en tiempo real**, obteniendo que en el genoma de las hembras la Mn-SOD está sobre expresada 2.7 veces más en comparación con el de los machos.

De nuevo, quisimos comprobar si las diferencias de expresión de la Mn-SOD entre machos y hembras iban acompañadas de diferencias de actividad enzimática. Aislamos mitocondrias de hígado de ratas de ambos géneros y determinamos la actividad de la Mn-SOD. Como podemos comprobar en la Figura IV.13B, las mitocondrias hepáticas de las ratas hembra poseen una actividad superóxido dismutasa significativamente superior respecto a las

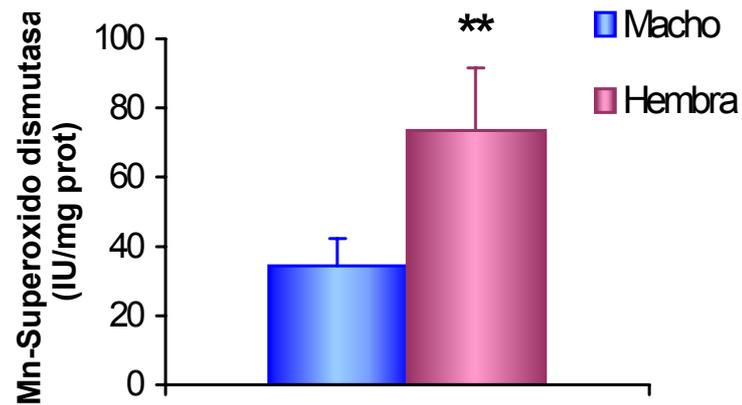
mitocondrias aisladas de hígado de ratas macho. Por tanto, en el caso de la enzima antioxidante Mn-SOD una mayor expresión génica de la enzima en el hígado de las ratas hembra, se traduce en una mayor actividad enzimática en sus mitocondrias.

Figura IV.13.- Expresión (A) y actividad (B) de la enzima antioxidante Mn-superóxido dismutasa en hígado de machos y hembras.

A) Expresión



Los valores tras análisis densitométrico de los resultados se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 3 ratas para ambos grupos experimentales. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como * $p < 0.05$ frente a los machos.

B) Actividad enzimática

Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 5 ratas para ambos grupos experimentales. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como ** $p < 0.01$ frente a los machos.

4.12 EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ENVEJECIMIENTO 16S rRNA EN HÍGADO DE MACHOS Y HEMBRAS.

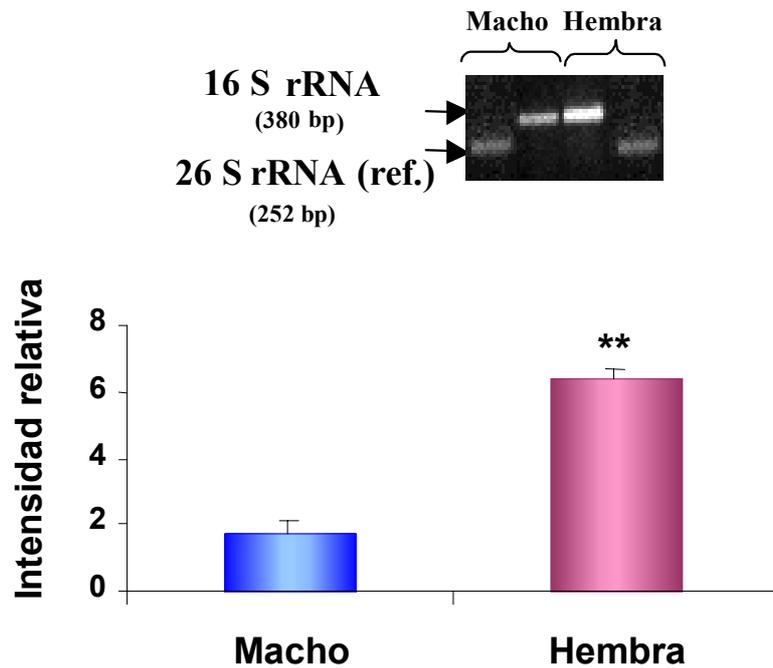
Otro gen cuya expresión decidimos estudiar por su relación con el envejecimiento celular, fue la subunidad 16S del RNA ribosomal, codificado en el genoma mitocondrial.

Como se ha anticipado en la sección de Introducción de la presente tesis, existen datos en la bibliografía que demuestran una correlación inversa entre la expresión de esta subunidad y el estrés oxidativo (Crawford, D.R. y cols. 1997). Es más, la expresión de este gen ribosomal disminuye significativamente con el envejecimiento, y este descenso se correlaciona con la curva de supervivencia obtenida en moscas *Drosophila* (Calleja, M. y cols. 1993). Por todo ello, podríamos considerar la expresión del 16S rRNA mitocondrial como un marcador de envejecimiento mitocondrial.

Así, aislamos RNA de hígado de ratas de ambos sexos y determinamos la expresión de este gen mediante RT-PCR.

En la Figura IV.14 podemos observar que de acuerdo con nuestros resultados, efectivamente la expresión de este gen está disminuida en el hígado de los machos con respecto a las hembras de la misma edad cronológica. La densitometría y posterior análisis estadístico de los resultados indican que esta diferencia es significativa.

Figura IV.14.- Expresión de la subunidad 16S rRNA mitocondrial en hígado de machos y hembras.



Los valores tras análisis densitométrico de los resultados se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 3 ratas para ambos grupos experimentales. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como ** $p < 0.01$ frente a los machos.

4.13 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TELOMERASA EN HÍGADO DE MACHOS Y HEMBRAS.

Según ha sido señalado en la sección de Introducción de la presente tesis, la actividad de la enzima telomerasa se relaciona con el proceso envejecimiento (Leri, A. y cols., 2000): Esta enzima se encarga principalmente de reponer el telómero que recubre y protege los extremos de los cromosomas, de modo que éste no se acorte y la célula pueda dividirse correctamente. El desgaste del telómero limita la duración del ciclo vital celular de la mayoría de los tipos de células, conduciendo a la activación de los procesos de apoptosis o muerte celular programada. La telomerasa, es un enzima capaz de restaurar la secuencia del telómero, asegurando la completa replicación de los cromosomas.

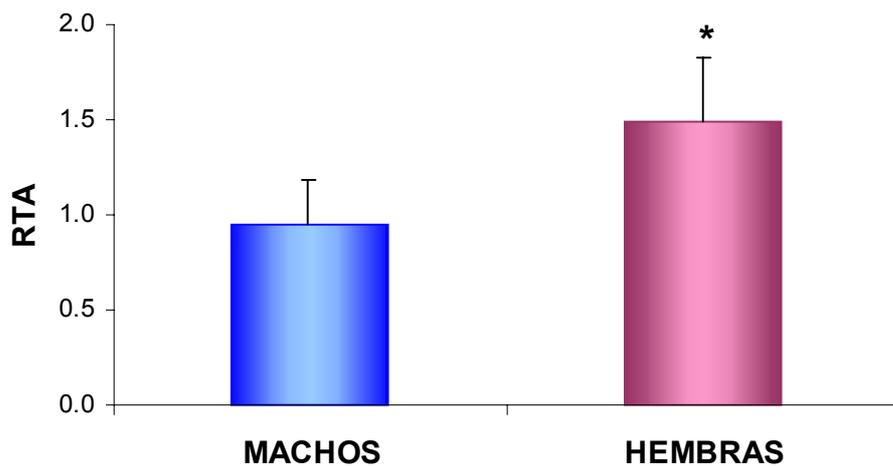
Estudiamos la actividad enzimática de la telomerasa en hígado de machos y hembras como otro índice de envejecimiento.

La Figura IV.15 muestra la actividad de esta enzima en términos de actividad telomerasa relativa (RTA), en referencia a un control positivo constituido por una secuencia de 8 telómeros. (Ver apartado 2.15 de la sección Materiales y Métodos de la presente tesis).

Como podemos comprobar en dicha figura, la actividad telomerasa está aumentada en el hígado de las hembras con respecto al de los machos.

Además debemos destacar cómo esta actividad es muy baja en ambos sexos, puesto que no se trata de un tejido con células germinales, y por tanto la actividad de esta enzima no debe ser elevada. Su elevación provocaría el crecimiento desordenado de las células y por tanto el desarrollo de cáncer.

Figura IV.15.- Actividad enzimática de la telomerasa en hígado de machos y hembras.



Los valores se expresan como la media \pm SEM. El tamaño de la muestra es de 5 ratas para el grupo de las hembras y de 4 para el de los machos. La significación estadística entre los grupos experimentales se expresa como * $p < 0.05$ frente a los machos.

4.14 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ESTRADIOL EN LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA MAMARIA (MCF-7)

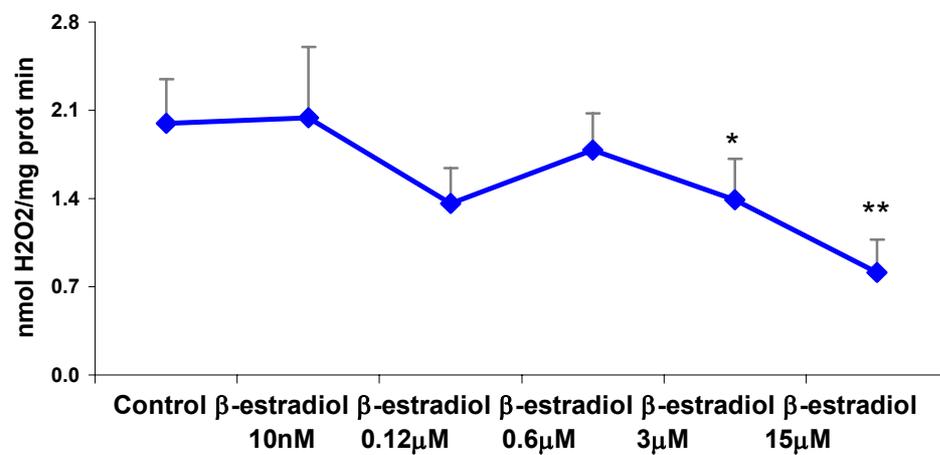
Una vez establecidas las diferencias de estrés oxidativo entre machos y hembras, nos cuestionamos cuál podría ser la razón que sustenta la mayor protección de las hembras frente al daño oxidativo con relación al sexo opuesto.

Dado que la producción de hormonas sexuales es una clara diferencia entre sexos, y que existen numerosos estudios acerca del papel antioxidante de los estrógenos, decidimos realizar estudios *in vitro* incubando células con estradiol y determinando parámetros de estrés oxidativo.

Así pues, empleamos células MCF-7, una línea celular procedente de tumor de glándula mamaria, ricas en receptores estrogénicos.

Incubamos las células con estradiol a distintas concentraciones y diferentes tiempos, y medimos los niveles de peróxido de hidrógeno. La Figura IV.16 resume los resultados obtenidos. Los niveles de H₂O₂ disminuyen a medida que aumentamos la concentración de 17β-estradiol, alcanzando su máximo a la concentración de 15 μM. Así pues, podemos afirmar que el estradiol actúa como antioxidante *in vitro* de modo dependiente de concentración.

Figura IV.16.- Efecto de la concentración de estradiol en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7).

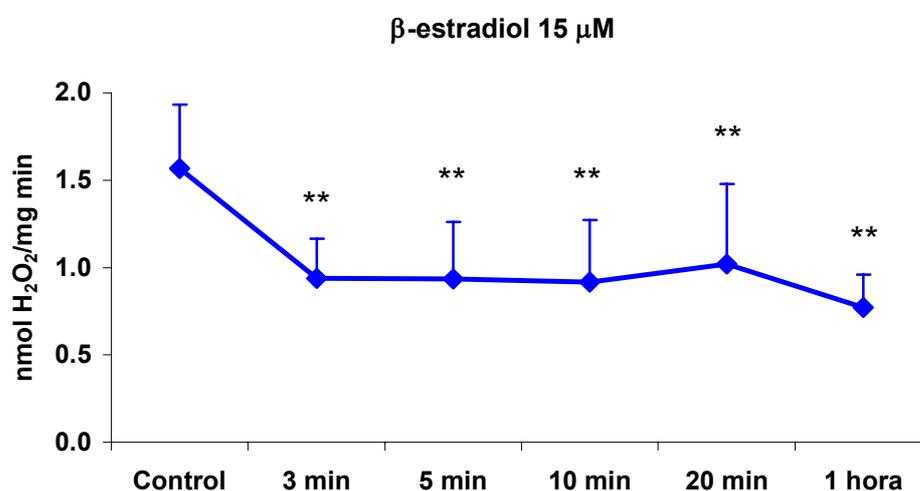


Los valores de los resultados se expresan como la media \pm SEM. Cada punto es la media de 8 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ frente al control.

4.15 DEPENDENCIA DEL TIEMPO EN EL EFECTO DEL ESTRADIOL EN LOS NIVELES DE H₂O₂ EN CÉLULAS MCF-7.

La Figura IV.17 indica que el efecto antioxidante del estradiol a elevadas concentraciones es muy temprano, dándose ya a los 3 minutos de incubación con 17 β -estradiol 15 μ M, y prolongándose durante tiempos de incubación más largos de hasta 1 hora.

Figura IV.17.- Dependencia del tiempo en el efecto del estradiol en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7).



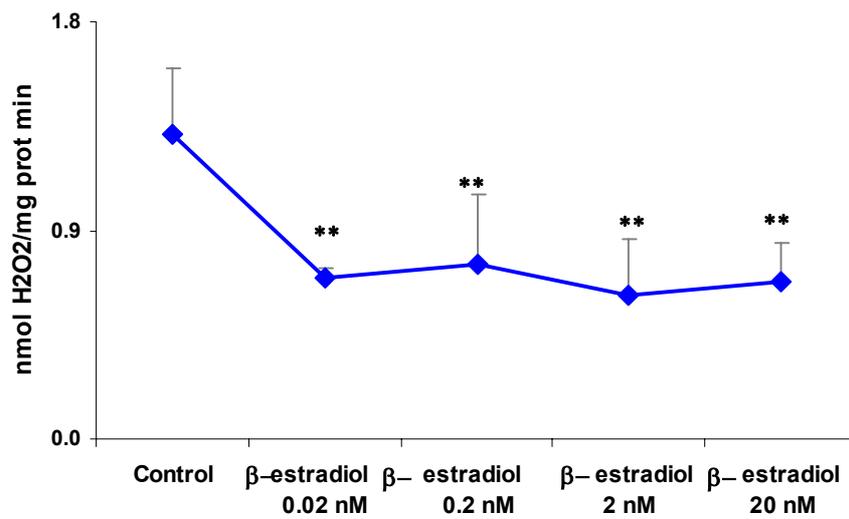
Los valores de los resultados se expresan como la media \pm SEM. Cada punto es la media de 9 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

4.16 EFECTO DEL ESTRADIOL A BAJAS CONCENTRACIONES EN LOS NIVELES DE H₂O₂ EN CÉLULAS MCF-7 INCUBADAS DURANTE 48H

Como se ha expuesto en el capítulo de Introducción de la presente tesis, los niveles de estrógenos que encontramos en el plasma de una mujer en edad fértil son del orden de 20 pg/ml (lo que supone alrededor de 0.073 nM). Así pues, las concentraciones empleadas en los apartados anteriores no se corresponden muy bien con la situación fisiológica de las mujeres, y los efectos hallados se deben más bien al efecto antioxidante *per se* que le confiere su estructura fenólica a la molécula de estradiol. Por ello, decidimos incubar las células previamente mencionadas, con concentraciones dentro del rango fisiológico, pero en este caso durante tiempos más prolongados de 48 horas.

En la Figura IV.18 podemos observar que en este caso, a concentraciones muy bajas de estradiol, los niveles de H₂O₂ disminuyen. Las células fueron incubadas durante 48 horas con esta hormona, y las concentraciones que a tiempos cortos no eran efectivas en la protección frente a los radicales libres (ver Figura IV.16), pasaron a serlo cuando incubamos las células durante más tiempo e incluso a concentraciones inferiores a las empleadas en los experimentos de período de incubación corto.

Figura IV.18.- Efecto del estradiol a bajas concentraciones en los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 incubadas durante 48h



Los valores de los resultados se expresan como la media \pm SEM. Cada punto es la media de 8 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

4.17 PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL.

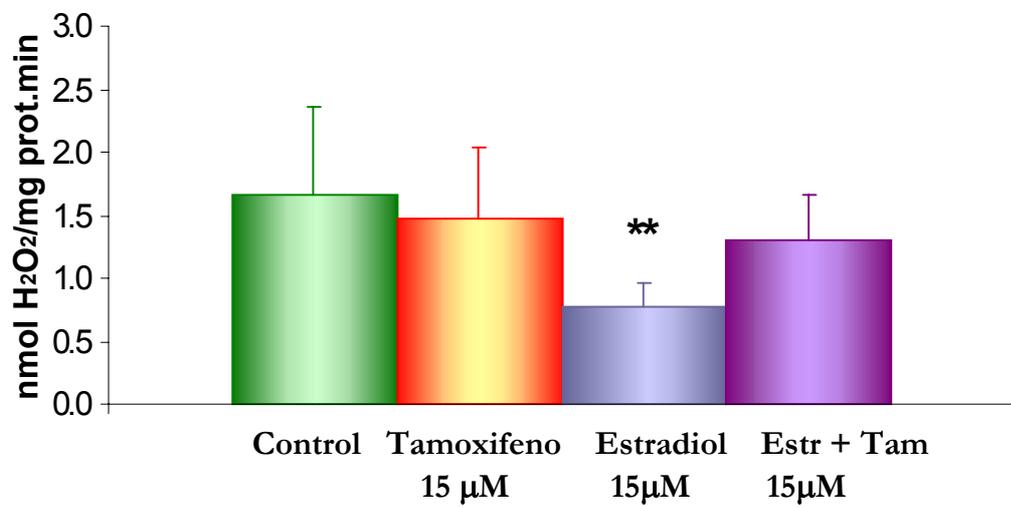
Una vez determinada la influencia de la concentración y del tiempo en el efecto antioxidante del estradiol, estudiamos la posible implicación de los receptores estrogénicos.

Para ello incubamos durante 1 hora células MCF-7 en distintas condiciones:

- 1.- **17 β -estradiol 15 μ M:** como podemos observar en la Figura IV.19 disminuyó significativamente los niveles de peróxido de hidrógeno.
- 2.- **Tamoxifeno 15 μ M:** un modulador de los receptores de estrógenos que en estas células actúa como antagonista, y que como comprobamos en la Figura IV.19 por sí solo no afecta los niveles de H₂O₂.
- 3.- Sin embargo, al añadir conjuntamente **estradiol y tamoxifeno** en las mismas condiciones, observamos que los niveles de peróxidos regresan a los niveles obtenidos en las células control.

Por tanto, el efecto de los estrógenos sobre los niveles de peróxido de hidrógeno está mediado por receptores estrogénicos y es antagonizado por el tamoxifeno.

Figura IV.19.- Efecto del estradiol y el tamoxifeno en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7).



Los valores de los resultados se expresan como la media \pm SEM. La media obtenida es el resultado de 7 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

4.18 EFECTO ANTIOXIDANTE DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA. PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS.

Una vez determinada la influencia de la concentración y del tiempo en el efecto antioxidante del estradiol, y la implicación de los receptores estrogénicos, nos planteamos el estudio del posible efecto antioxidante de moléculas estructuralmente similares como son los fitoestrógenos, más concretamente la genisteína.

Para ello incubamos durante 1 hora células MCF-7 en distintas condiciones:

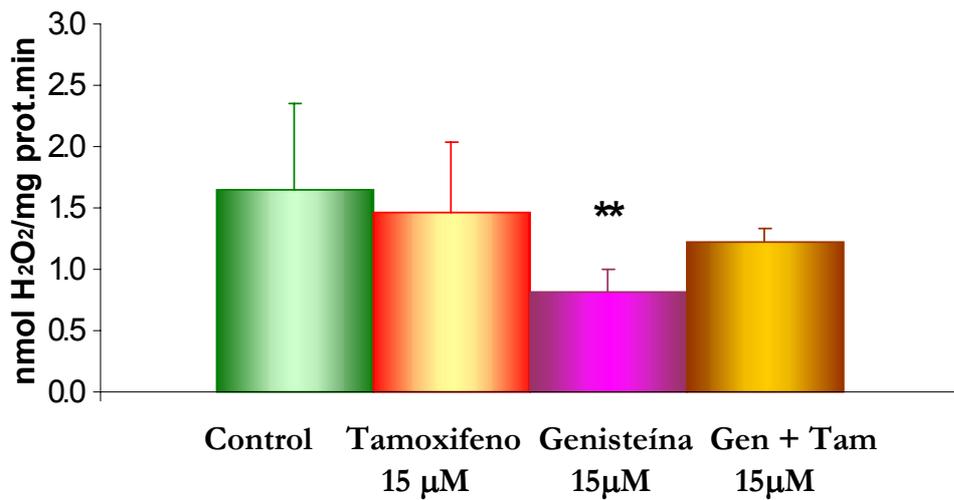
1.- **Genisteína 15 μM** : como podemos observar en la Figura IV.20 disminuyó significativamente los niveles de peróxido de hidrógeno.

2.- **Tamoxifeno 15 μM** : un modulador de los receptores de estrógenos que en estas células actúa como antagonista, y que como comprobamos en la Figura IV.19 por sí solo no afecta los niveles de H_2O_2 .

3.- De nuevo, al añadir conjuntamente **genisteína y tamoxifeno** en las mismas condiciones, observamos que los niveles de peróxidos regresan a los niveles obtenidos en las células control.

Así pues, los fitoestrógenos como la genisteína reproducen los efectos antioxidantes del estradiol, disminuyendo los niveles de peróxido de hidrógeno a través de su interacción con los receptores estrogénicos y por tanto, es antagonizado por el tamoxifeno.

Figura IV.20.- Efecto del fitoestrógeno genisteína y del tamoxifeno en los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7)



SEM. La media obtenida es el resultado de 6 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

V. DISCUSIÓN

6.1. LONGEVIDAD Y SEXO.

La longevidad media de las hembras en muchas especies es superior a la de los machos (Asdell y cols., 1967; Borrás y cols., 2003).

Este hecho se conoce desde hace mucho tiempo, y también se observa en la especie humana, que por razones obvias es la que más nos interesa. Así pues, en España, según datos del Instituto Nacional de Estadística, la población de mujeres mayores de 55 años es de alrededor de 6 millones, mientras que la de hombres es de 4.7 millones.

Para explicar la diferente longevidad entre mujeres y hombres se ha recurrido a la intervención de factores extrínsecos a las propias diferencias biológicas, centrandó la atención sobre fenómenos de carácter más bien sociológico como, por ejemplo, el hábito de fumar, el estrés psíquico, el trabajo, la agresividad, etc., cuyas diferencias son patentes entre ambos sexos.

Sin embargo, los hallazgos que se han hecho en la especie humana en cuanto a la diferente longevidad entre sexos, también se reproducen en otras especies animales, lo cual sugiere que este hecho debe atribuirse a fenómenos biológicos básicos y no sólo a fenómenos sociológicos.

En la Tabla 1, se muestra la evolución de la longevidad media en España a lo largo del siglo XX.

Podemos extraer dos reflexiones importantes de los datos que se presentan en esta tabla y que fueron recogidos por el grupo del Prof. Ruiz Torres (Fernández-Ballesteros y cols, 1999).

En primer lugar, se observa la enorme diferencia entre la esperanza de vida a principios del siglo XX y a finales del mismo. La diferencia tanto para machos como para hembras, es del orden de cuarenta años. En efecto, la longevidad media en España para hombres a principios del siglo XX apenas llegaba a los cuarenta años, mientras que a finales del mismo superaba los setenta. Esta diferencia mayor de treinta años probablemente no volverá a presentarse, de acuerdo con los conocimientos actuales. De hecho, si fuéramos capaces de curar todas las enfermedades que afectan a la humanidad, la esperanza de vida se alargaría en aproximadamente unos veinte años, acercándose a la vida máxima. Es decir, podríamos llegar a aproximadamente los cien años de esperanza de vida. Así pues, un alargamiento de la vida de treinta años sería muy improbable. Por otro lado, considerar el alargamiento de la vida máxima es aún más quimérico, puesto que hasta el momento en mamíferos sólo se ha conseguido con la restricción calórica (Sohal, 1996).

Año	Hombres	Mujeres	% aumento mujeres
1900		35.1	3.8
1960		72.2	7.1
1980		78.6	8.4
1992		81.0	9.9
2020		83.8	7.9

Tabla V.1.- Esperanza de vida en la población española durante el siglo XX (Fernández-Ballesteros, 1999).

Por otro lado, en todos los cálculos realizados a lo largo del siglo XX se observa que la esperanza de vida es superior en las mujeres respecto los hombres. En todos los casos, la mujer presenta una esperanza de vida superior al hombre. Además, cabe destacar el hecho de que a principios de siglo, cuando la mayor parte de las personas morían a causa de enfermedades no relacionadas con el envejecimiento, tales como las enfermedades infecciosas, la esperanza de vida de las mujeres era solamente un 3% superior a la de los hombres. Sin embargo, a finales de siglo, precisamente cuando la mayor parte de la población llegaba a edades avanzadas próximas a las de la longevidad máxima, la esperanza de vida en la mujer era de hasta un 10% superior a la del hombre. Este hecho es destacable puesto en durante ese período las personas morían de enfermedades claramente debidas al envejecimiento, y no a enfermedades infecciosas, guerras, etc.

Como hemos señalado con anterioridad, y tal y como se muestra en el apartado de resultados de la presente tesis, este hecho ocurre tanto en animales como en la especie humana. Así pues, las diferencias de longevidad entre sexos tienen que deberse a fenómenos biológicos básicos y no sólo deben asociarse a fenómenos sociológicos.

El interés de este trabajo se centra, por tanto, en conocer los mecanismos básicos por los cuales la hembra vive más que el macho.

Sin embargo, este no es el único objetivo del trabajo, puesto que además presenta interés el empleo del envejecimiento diferencial entre sexos como un modelo para entender el propio envejecimiento. Si sabemos por qué la mitad de la población tiene una longevidad media alrededor de un 10% superior a la

otra mitad, podremos quizá entender fenómenos básicos asociados al envejecimiento.

De estos dos aspectos se deduce además un tercero que puede ser también muy interesante. Los estudios sobre el envejecimiento diferencial entre sexos nos permitirían en el futuro una posibilidad de intervención. En efecto, si, como discutiremos en adelante, la diferencia en la tasa de envejecimiento entre el macho y la hembra se debe en parte a la acción de los estrógenos, podríamos plantear la posibilidad de utilizar fitoestrógenos o compuestos similares que no posean los efectos no deseables de los estrógenos, para aumentar la longevidad de las especies animales y sobre todo, la humana.

En este sentido, cabe destacar el interés que ha despertado últimamente el uso de los fitoestrógenos en varios aspectos relacionados con la salud de la población. Ello nos permite intuir que los fitoestrógenos puedan ser utilizados de un modo beneficioso para estudios encaminados a aumentar la longevidad de la mitad de la población, es decir de los hombres. Asimismo, la posibilidad de utilizar fitoestrógenos en mujeres postmenopáusicas y alargar así su esperanza de vida, no debe ser desdeñada.

6.2. TEORÍA DEL ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES. IMPORTANCIA EN LA LONGEVIDAD.

Desde hace más de un siglo, los científicos han intentado proponer teorías que explicaran de la manera más concluyente posible los fenómenos del envejecimiento en animales y en seres humanos, y además que permitieran entender algunas de las enfermedades asociadas al mismo.

Así, por ejemplo, Medvedev propone más de doscientas teorías asociadas al envejecimiento (Medvedev, 1990).

Otras, como la teoría del envejecimiento de Orgel, son más restrictivas y proponen que el envejecimiento se causa por acúmulo de errores catastróficos, es decir, errores en mecanismos de reparación hacen que no se puedan reponer los fallos que ocurren en varias moléculas de modo aleatorio. Estos errores aumentarían por tanto la frecuencia de otros errores y se produciría el fenómeno catastrófico del envejecimiento. Sin embargo, ha sido demostrado que esta teoría es falsa.

A mitad de siglo XX, Rebeca Gershtman, una investigadora argentina, propuso que el envejecimiento se asociaba a alteraciones moleculares debidas a los radicales libres. Esa teoría fue elaborada por Denham Harman. Harman postuló la Teoría de los Radicales Libres en el Envejecimiento en 1956 (Harman, 1956). La contribución de Harman fue proponer una teoría

coherente y completa sobre el envejecimiento basándose en la acción deletérea de los radicales libres.

Esta teoría fue posteriormente refinada por Jaime Miquel. En efecto, Miquel propuso que las mitocondrias eran a su vez causa de la producción de radicales y diana de las acciones deletéreas de los mismos (Miquel, 1980). La teoría mitocondrial del envejecimiento se desarrollará en el punto siguiente de esta discusión.

Una de las principales conclusiones y ventajas de la teoría de los radicales libres del envejecimiento es que permite la intervención. En efecto, la administración de antioxidantes podría paliar los daños asociados al envejecimiento y por tanto aumentar la vida media. Esto fue demostrado concluyentemente por Miquel quien administró sustancias antioxidantes ricas en compuestos tiólicos y demostró que se aumentaba la vida media de las moscas *Drosophila*.

En el grupo de investigación que dirige el Dr. Viña se demostró este hecho. Se administró antioxidantes tales como el glutatión o la N-acetilcisteína a moscas *Drosophila* y se observó un alargamiento de la vida media de las mismas. Así pues, la curva de supervivencia de estas moscas se rectangularizó (Viña, J. 1990).

Por tanto, podemos postular que como consecuencia de la teoría de los radicales libres asociada al envejecimiento, es posible plantear acciones terapéuticas que nos induzcan a aumentar la vida media de la población.

La teoría de los radicales libres se ha visto reforzada por una serie grande de hechos experimentales. Por ejemplo, Orr y Sohal demostraron que moscas *Drosophila* que sobreexpresaban catalasa o superóxido dismutasa no mostraban un aumento en su vida media (Orr y cols., 1994). Sin embargo, las moscas que eran

dobles transgénicas, es decir que sobreexpresaban catalasa y superóxido dismutasa a la vez, mostraban un aumento en la vida media. Este hecho es de gran interés ya que provee de evidencia experimental que muestra que la defensa antioxidante contra los radicales libres es un determinante fundamental para la longevidad, al menos la longevidad media.

En este sentido, los resultados obtenidos en la presente tesis indicarían que las hembras se comportan como dobles transgénicos sobreexpresando superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa y por tanto teniendo una mayor esperanza de vida en comparación con los machos (Borrás y cols., 2003).

Por otro lado, cabe destacar que dada la corta vida media de las especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido, el peroxinitrito, y especialmente el radical hidroxilo, que como se ha visto en la sección de Introducción de la presente tesis, tiene una vida media en las células del orden de la millonésima de segundo, el lugar de generación de los radicales libres es muy importante para entender el daño celular que ocasionan los mismos. Las mitocondrias son el principal origen celular que genera radicales libres y por tanto su papel en la lesión celular merece un capítulo aparte.

6.3. PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES. IMPORTANCIA EN LA LONGEVIDAD MEDIA Y MÁXIMA.

Los trabajos clásicos de Chance y colaboradores demuestran que el 2% del oxígeno consumido por el organismo se convierte en radicales libres (Boveris, 1983). Esto supone que el organismo produce varios kilos de agua oxigenada al año.

Hay que precisar, sin embargo, que la producción que esa cifra del 2% se calcula cuando las mitocondrias están en estado 4 (es decir en ausencia de ADP). Cuando las mitocondrias están en actividad fosforilante, es decir utilizando activamente el oxígeno para generar ATP, la producción de radicales libres disminuye. El hecho de que la formación de radicales libres por las mitocondrias siga un proceso inverso a la actividad fosforilante (y por tanto a la velocidad de paso de electrones por la cadena respiratoria) se debe a que cuando los electrones pasan activamente desde el NAD o desde el FADH al oxígeno, los coenzimas se mantienen oxidados. Es el grado de reducción de los coenzimas y por tanto su capacidad de oxidarse lo que determina la capacidad de generación de radicales libres.

Jaime Miquel sobre la base de estos hechos y, naturalmente, apoyándose en la teoría de radicales libres de Harman, postuló que las mitocondrias son el órgano productor y el órgano diana de

la acción deletérea de los radicales libres asociados al envejecimiento (Miquel, 1980). Posteriormente, los trabajos de Sohal y también los de Barja de Quiroga han demostrado que la tasa de producción mitocondrial de radicales libres determina fundamentalmente la longevidad máxima (Sohal y cols., 1991; Barja y cols., 2000).

Cabe destacar que existe una controversia sobre el papel de los antioxidantes enzimáticos (por ejemplo la superóxido dismutasa mitocondrial y glutatión peroxidasa) en la determinación de la vida media y máxima de las especies. De hecho, la tasa de producción de radicales libres por las mitocondrias que se observa es la diferencia entre la propia producción y la detoxificación por las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa mitocondrial. Por tanto, cuando hablamos de la tasa neta de producción por mitocondrias lo que hablamos es de la producción (fundamentalmente en los complejos de la cadena respiratoria uno y tres) y la detoxificación mediante la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Así, por tanto, la longevidad de las especies (fundamentalmente la longevidad máxima pero también media) viene determinada por la diferencia entre la producción mitocondrial de radicales libres y la detoxificación de los mismos por las propias enzimas antioxidantes presentes en estos orgánulos.

Así pues, los resultados de la presente tesis en cuanto a producción de peróxido de hidrógeno por las mitocondrias, es el resultado de lo que producen menos lo que se detoxifica. Los resultados en la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes aumentadas en hembras frente a machos, explican la menor

producción neta de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias de las hembras.

Naturalmente, los radicales libres no son los únicos determinantes del envejecimiento. Hay otros muchos factores a tener en cuenta. Por ejemplo, la telomerasa parece ser que tiene un papel importante en el mantenimiento de la capacidad proliferativa de las células. Esto, se verá más adelante en esta discusión.

6.4. EL PAPEL ANTIOXIDANTE DE LOS ESTRÓGENOS. IMPORTANCIA SOBRE LA LONGEVIDAD.

La estructura química de los estrógenos, fundamentalmente del 17 β -estradiol permite atribuirle un papel antioxidante a esta molécula. El anillo A del estradiol presenta un grupo tiólico y presenta también dobles enlaces conjugados. Esta peculiaridad inmediatamente sugiere la posibilidad de una acción antioxidante. En efecto, esta acción antioxidante *in vitro* ha sido demostrada en muchas oportunidades. Citaremos sólo el caso de los trabajos de Ruiz Larrea (Ruiz-Larrea y cols., 1997).

Sin embargo, consideraciones cuantitativas nos hacen dudar de la eficacia del estradiol como un antioxidante químico *in vivo*. La cantidad de estradiol que se administra en clínica a mujeres postmenopáusicas es del orden de 50 microgramos al día. Esto contrasta con la dosis de vitamina E, quizá el antioxidante más conocido que se administra en clínica. La dosificación que se plantea de vitamina E como antioxidante en casos de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es de 1.600 miligramos al día. Esto puede considerarse como mega dosis. Sin ser tan extremistas, la cantidad de vitamina E que se recomienda habitualmente en tratamientos a largo plazo como antioxidante es de 400 miligramos al día. Esto supone una dosis 8.000 veces superior a la de estradiol. En el caso de que el estradiol tuviera una actividad antioxidante *per se* su potencia debería ser 8.000

veces superior a la de la vitamina E. Consideraciones químicas elementales descartan esta posibilidad.

Por tanto, los efectos potentes del estradiol como antioxidante, a concentraciones fisiológicas, que se han descrito en el capítulo de Resultados de la presente tesis, hacen pensar que esta hormona debe estar actuando por mecanismos no directamente implicados con su estructura química antioxidante, sino más bien con su acción hormonal.

En el capítulo de Resultados de la presente tesis se comprueba también que la acción del estradiol está mediada por interacción con los receptores estrogénicos. Esta acción se ve bloqueada por los moduladores de los receptores estrogénicos tales como el tamoxifeno. Por tanto, la acción antioxidante del estradiol se debe a su interacción con los receptores.

Igualmente, en la sección de Resultados de la presente tesis se demuestra que el estradiol actúa mediante la activación de genes antioxidantes. Hemos observado la activación de la expresión de los genes de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. La actividad de las enzimas sigue paralela a los cambios en la transcripción de los genes de las mismas. El estradiol actúa por tanto activando la expresión de genes antioxidantes que se comportan como genes de supervivencia.

Así pues, los efectos probables del estradiol a las concentraciones en que se encuentran en el organismo, (y posiblemente de los fitoestrógenos) hay que buscarlos no en su acción como antioxidantes químicos sino en su acción como inductores de la expresión de enzimas que actúan como antioxidantes

Puesto que los estrógenos actúan como antioxidantes, y según la teoría de los radicales libres asociada al envejecimiento,

ello retrasa el envejecimiento, los estrógenos podrían ser la base de la mayor longevidad de las hembras respecto a los machos. En este sentido, cabe destacar tres estudios existentes en la bibliografía.

El primero de ellos fue publicado en 1967 por Asdell y cols., y resaltaba el papel de las hormonas esteroideas sobre la longevidad (Asdell y cols., 1967).

Otro trabajo destacable, publicado en la revista “The Lancet” en 1999, afirma que existe una correlación directa entre la concentración de estrógenos presente en suero y la apariencia de las mujeres, así, aquellas que poseían unos niveles de estrógenos mayores, eran infravaloradas en cuanto a su edad (en cierto sentido poseían una edad biológica menor que la cronológica), y aquellas que tenían unos niveles de estrógenos más bajos, se les consideraba más mayores de lo que en realidad eran (poseían una edad biológica mayor que la cronológica). En este caso no se midió longevidad, pero sí estado general de las mujeres, y estaban mejor las que más concentración de estrógenos en suero poseían (Wildt, 1999).

El otro estudio que destacamos, fue publicado por un grupo de Suecia, en el que estudiaron la longevidad de mujeres a las que se les practicaba una ooforectomía bilateral a temprana edad y no se les aplicó terapia hormonal sustitutiva (THS). Los resultados que obtuvieron fueron que la edad media de dichas mujeres no variaba conforme a la media nacional, sin embargo, estas mujeres morían de problemas cardiovasculares o cánceres. Así pues, no encontraron cambios en la longevidad, pero sí encontraron un patrón distinto en cuanto a la morbimortalidad (Nilsson, 2003).

Sin embargo, a nuestro entender, este estudio se queda corto, en cuanto a que no comparan el grupo anterior con

mujeres a las cuales se les practicaba la misma operación, pero se les indicaba como prescripción THS. Además, para la determinación de la longevidad media del grupo control se incluyó a todas las mujeres, las que murieron por causas no naturales a edad temprana, y que por tanto estaban en etapa menárquica, las que estaban en la primenopausia, las que llegaban a la menopausia, las que recibían THS... Por tanto, queda en el tintero saber si estas mujeres habrían vivido más que la media.

6.5. PARÁMETROS BIOLÓGICOS DE ENVEJECIMIENTO.

Desde hace mucho tiempo, se está buscando la identificación de parámetros biológicos de envejecimiento. Estos son parámetros de cualquier tipo (físicos, químicos, biológicos) que nos marquen la edad biológica real de una persona o de un animal frente a la edad cronológica.

Una persona puede tener una edad biológica mucho más avanzada que su edad cronológica.

Los parámetros biológicos de envejecimiento deben de seguir una serie de condiciones. Deben ser de fácil acceso, es decir poco o nada invasivos. Deben ser progresivos, es decir cambiar paulatinamente con la edad. Deben de reflejar cambios fundamentales en el proceso del envejecimiento, es decir, no deben reflejar cambios banales. Por ejemplo, la aparición de arrugas cutáneas no es un parámetro biológico de envejecimiento porque no refleja cambios fundamentales del envejecimiento del individuo. Y por último deben indicar de una manera lo más fidedigna posible la edad biológica del individuo.

Durante varias décadas, el Dr. Calvin Lang en la Universidad de Kentucky ha estado postulando que el glutatión es un parámetro biológico de envejecimiento (Hazelton y cols., 1984). Observó Lang que niveles altos en glutatión tanto en mujeres como en hombres se correspondían con buen estado de salud y predecían una longevidad mayor. Lang medía los valores de glutatión en sangre.

Por otro lado, trabajos del grupo de Marco en Madrid demostraron que la expresión de la molécula de RNA 16S ribosómico podría compararse como un parámetro de envejecimiento ya que su expresión decaía con la edad y seguía la forma típica de la llamada curva de envejecimiento (Calleja y cols., 1993). Además este parámetro disminuye también conforme aumenta el estrés oxidativo (Crawford, 1997). Naturalmente, la expresión de esta subunidad ribosomal de RNA no es un buen parámetro de envejecimiento en clínica porque es invasivo. Se requiere tener una biopsia de un tejido clave en el envejecimiento como puede ser el cerebro o el hígado o el corazón.

Sin embargo, nosotros podemos utilizar este parámetro de envejecimiento desde el punto de vista experimental. La hipótesis general sería que las hembras, que tienen una longevidad superior a los machos, se comportan como si fueran más jóvenes que éstos. Por tanto, hembras de la misma edad cronológica deben tener mejor los parámetros biológicos de envejecimiento. Esto se cumple, según los resultados obtenidos en la presente tesis, en el caso de glutatión. En efecto, las hembras tienen un nivel de glutatión mitocondrial superior a los machos. Pero además, también se cumple en el caso de la expresión del 16S rRNA. Los experimentos que se reflejan en la sección de Resultados de la presente tesis, muestran que la hipótesis efectivamente fue correcta. La expresión de 16S rRNA en hembra es superior a la de los machos de la misma edad cronológica. Por tanto podemos decir que las hembras tienen edad biológica inferior a la de los machos a la misma edad cronológica. Esto es coherente con la mayor longevidad de la hembra frente al macho.

6.6. TELOMERASA. SU FUNCIÓN MÁS ALLÁ DE LA ELONGACIÓN DE LOS TELÓMEROS.

Hace aproximadamente quince años, Carol Greider y Elizabeth Blackburn en California resolvieron el problema de la longitud de los telómeros (Blackburn y cols., 1989). Se sabía del desarrollo clásico de la biología molecular y desde los trabajos de Arthur Kornberg que la DNA polimerasa no puede replicar toda la molécula de DNA (Kornberg, 1969). El final de la molécula de DNA no puede ser completamente duplicado por la DNA polimerasa. Por ello existen los telómeros, que protegen los extremos de las cadenas de DNA, impidiendo a su vez su fusión. Cada vez que se duplica la célula la longitud del telómero se acorta (salvaguardando información genética). Por tanto, deberíamos estar provistos de mecanismos que permitiesen alargar el telómero y mantener la longitud constante a pesar de las muchas lesiones celulares, para que la célula pueda seguir duplicando todo su material genético sin perder información y por tanto funciones.

Este no suele ser el caso en células somáticas normales. De hecho, la longitud de los telómeros se acorta con cada división celular. Esto explica por otro lado los trabajos clásicos de Hayflick que demostró en los años 60 que las células somáticas normales tales como los fibroblastos humanos tienen un número limitado de divisiones (Hayflick, 1968).

Carol Greidel y Elizabeth Blackburn describieron la presencia de una enzima, la telomerasa, que es una transcriptasa inversa que alarga los telómeros añadiendo una serie repetitiva de seis oligonucleótidos (Blackburn y cols., 1989). La función principal de la enzima telomerasa es alargar los telómeros cuando estos se acortan en las divisiones celulares.

Sin embargo, ésta no es su única función. Trabajos fundamentalmente de María Blasco en el Centro Nacional de Biotecnología en Madrid que ha estudiado las características fenotípicas de ratones knock-out y que sobreexpresan telomerasa demuestran que la telomerasa tiene funciones más allá de su función principal en el mantenimiento de los telómeros (Blasco y cols., 2003).

En efecto, los ratones knock-out de telomerasa presentan una longevidad acortada. Por tanto, la telomerasa parece tener un papel importante en la longevidad y en la senescencia.

Por otro lado, los ratones que sobreexpresan esta enzima tiene una mayor susceptibilidad a la carcinogénesis química.

Nos movemos por tanto en un equilibrio entre longevidad acortada (knock-out) y mayor susceptibilidad a los cánceres (sobreexpresión). Parece ser por tanto que la expresión de unos niveles óptimos de telomerasa nos mantendría en el punto de equilibrio entre la aparición de cánceres y la longevidad acortada.

Nuestros resultados que muestran que las hembras tienen una mayor actividad de telomerasa que los machos parecen indicar que la hembra está mejor preparada a efectos de longevidad que el macho pero que podría tener una mayor susceptibilidad a los cánceres especialmente aquellos derivados de la acción hormonal tales como el cáncer de mama o de útero.

Estos resultados concuerdan con un estudio publicado por el grupo de Leri y cols. en el año 2000, en el que concluyen que la actividad telomerasa aumenta en los cardiomiocitos de las ratas hembras conforme envejecen, y sin embargo, disminuye con el envejecimiento en los machos (Leri y cols., 2000).

Se requieren más estudios, que se está iniciando en este laboratorio, para explicar la interacción compleja entre la telomerasa y la longevidad.

6.7. FITOESTRÓGENOS.

IMPORTANCIA EN LA LONGEVIDAD.

De los resultados de la presente tesis podemos concluir que los estrógenos confieren una mayor longevidad a la hembra frente al macho.

Sin embargo, desde el punto de vista de la aplicación es delicado recomendar la administración de estrógenos a las mujeres postmenopáusicas por los problemas que puedan aparecer en enfermedades asociadas al envejecimiento y no en el envejecimiento en sí.

La discusión sobre la viabilidad y conveniencia de la terapéutica hormonal sustitutiva mediante estrógenos a mujeres postmenopáusicas se sale de los principales objetivos de esta tesis.

Además, por su enorme poder feminizante está totalmente fuera del caso el recomendar la administración de estrógenos a machos.

Por tanto, nos planteamos la posibilidad de intervención mediante la administración de moléculas miméticas de los estrógenos en sus efectos favorables para longevidad y que sin embargo no presenten el poder feminizante, y los inconvenientes de los mismos.

Los fitoestrógenos son los candidatos ideales para esta función. Como se ha señalado en la sección de Introducción de la presente tesis, son un grupo complejo de moléculas estructuralmente similares a los estrógenos y que se piensa que

tienen también un poder un antioxidante *in vitro* (ver Tabla I. 8 de la Introducción).

Como hemos reiterado en varios capítulos de esta tesis, el poder antioxidante *per se* del estradiol no es relevante en el contexto de la longevidad dado que la concentración de estas moléculas en plasma es muy inferior a la requerida para que ejerzan su acción (ver Figura IV.16). Por otro lado, la administración de concentraciones elevadas de estradiol conllevarían efectos colaterales muy indeseables, por lo que no es planteable.

Cuando las células se incuban durante tiempos más prolongados de 48 horas (ver Figura IV.18), el estradiol a concentraciones comparables a las fisiológicas, sí posee efecto antioxidante. Ello revela el que el estradiol, no actúa como antioxidante *per se*, sino que debe desencadenar otros procesos de señalización celular, hasta la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes, y con ello la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno. Por ello, se necesita un período más largo hasta el procesamiento de las muestras, de modo que dé tiempo a que todos estos fenómenos se desencadenen. Estos fenómenos están siendo objeto de estudio actualmente en nuestro laboratorio.

Así pues, los fitoestrógenos mimetizan estos efectos, y además no presentan un papel feminizante de la importancia de los estrógenos. De hecho, se piensa que su papel feminizante puede ser tan poco importante que pueda considerarse la posibilidad de administrar fitoestrógenos a machos.

La experiencia común en Japón muestra que cuando se administra una dieta muy rica en fitoestrógenos (como la japonesa que se basa de un modo muy importante en la soja) no aparecen fenómenos de feminización en la población masculina. La soja es

extraordinariamente rica en algunos fitoestrógenos como la genisteína. Experimentos que se demuestran en la sección de Resultados de la presente tesis nos permiten plantear la posibilidad de que los fitoestrógenos actúan a través de los receptores de estrógenos y que causan una muy considerable disminución en la producción de radicales libres y en el nivel de especies reactivas de oxígeno en células aisladas (ver Figura IV.20).

La posibilidad de que los fitoestrógenos puedan ser utilizados como agentes antienvjecimiento disminuyendo la tasa de producción de radicales libres e induciendo una serie de enzimas asociadas a la longevidad, tales como las enzimas antioxidantes está siendo explorada en este momento en el laboratorio.

**VI. SUMMARY OF RESULTS
AND
DISCUSSION**

6.1. DIFFERENT LIFE EXPECTANCY BETWEEN MALES AND FEMALES OF VARIOUS SPECIES

Life expectancy over time by gender in Spain during the period 1900 – 1992 is shown in Table VI.1 (Fernández-Ballesteros, 1999). Two important features can be seen. On one hand, life expectancy has increased from around 34 years to approximately 80 years of age during the 20th century. This is the highest increase in life expectancy in the human species in recorded history. Another increase of about 45 years is highly unlikely to occur again. Indeed, if we accept a maximal life span for humans of around 110 years, then, even if all diseases were cured and all humans reached the maximal life span, one would expect an increase of up to 30 years. Therefore, the dramatic increase in life span, which has taken place in the 20th century, is very unlikely to occur again.

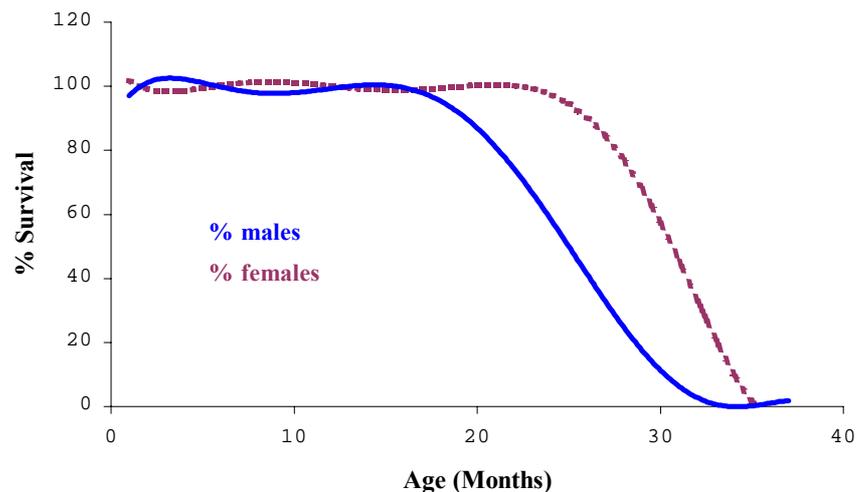
Table IV.1.- Life expectancy in Spain between 1900-2020

YEAR	MEN	WOMEN	DIFFERENCE (%)
1900	33.8	35.1	3.8
1960	67.4	72.2	7.1
1980	72.5	78.6	8.1
1992	73.7	81.0	9.9
2020	77.7	83.8	7.8

Data are taken from Fernández-Ballesteros et al. 1999.

Another important feature of Table VI.1 is that in all cases females have lived longer than males. Moreover, when, earlier in the century, both men and women died of diseases unrelated to ageing, the increase of average life span of women was only 3.8% higher than in men. However, when at the end of the century, women died of diseases related to ageing, their average life span was almost 10% higher than that of men. The higher longevity of females *versus* males could be attributed to social reasons. However, this is not a phenomenon specific to humans. A survival curve of Wistar rats in our laboratory is shown in Figure VI.1. In this case, also, females lived considerably longer than males. Average life span for female rats was 15% higher than for males. Thus, the increase in average life span in women over men is unlikely to be attributable to social reasons and basic biological phenomena may be underlying this fact (Borrás et al., 2003).

Figure VI.1.- Survival curve of Wistar rats

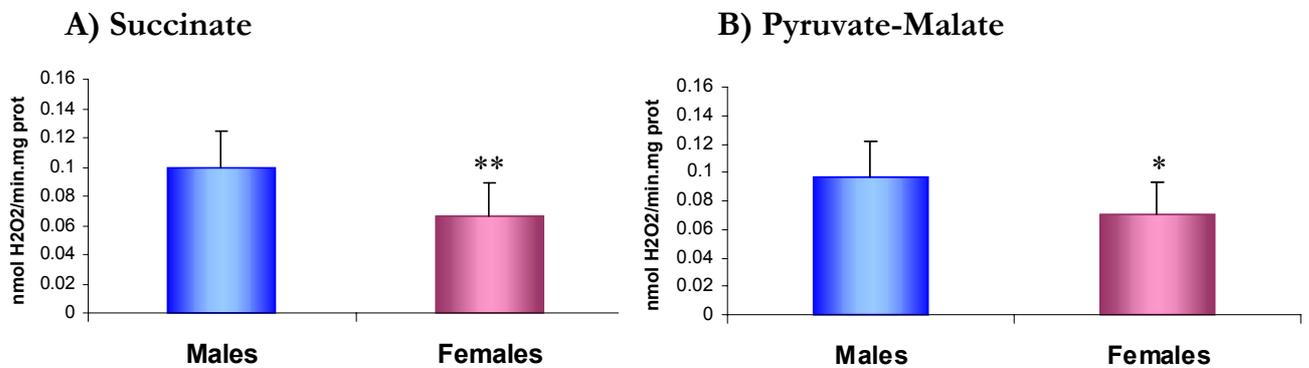


Female rats live longer than male rats. Rats were kept under standard conditions in the Faculty of Medicine, University of Valencia.

6.2. OXIDANT PRODUCTION BY MITOCHONDRIA FROM MALES AND FEMALES

Hepatic mitochondria from females produce approximately 50% the amount of oxidants produced by mitochondria from males (see Figure VI. 2 A & B). This occurred when mitochondria were incubated with piruvate and malate or with succinate as respiratory substrates. We conclude that estrogens could be responsible for the lower production of mitochondrial oxidants in females versus males.

Figure VI.2- Oxidant production by hepatic mitochondria from males and females.



Peroxide generation is higher in liver mitochondria from male rats than in mitochondria from female rats. The rate of peroxide production was measured in isolated liver mitochondria from Wistar rats (4-6 months-old) following the procedure described by Barja (Barja et al, 1999). Liver mitochondria were isolated as described by Rickwood et al (Rickwood et al, 1987). The number of experiments was 12-14 for liver mitochondria. The statistical difference is indicated as follows: * P < 0.05; ** P < 0.01 vs male rats.

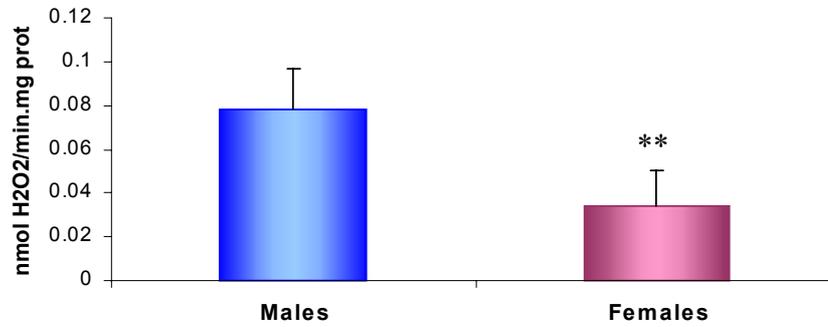
6.3. MITOCHONDRIA FROM POST-MITOTIC TISSUES PRODUCE MORE HYDROGEN PEROXIDES THAN THOSE FROM MITOTIC TISSUES

Miquel has emphasised the idea (Miquel y cols., 1980) that ageing should be studied in cells from post-mitotic tissues. Mitosis causes a renewal of cell components and therefore cell senescence is better studied in post-mitotic tissues. The brain provides a unique model in which post-mitotic cells (neurons) and mitotic cells (glia) co-exist. Synaptic (neuronal) and non-synaptic (glial) mitochondria may be isolated by differential centrifugation (Lai y cols., 1979).

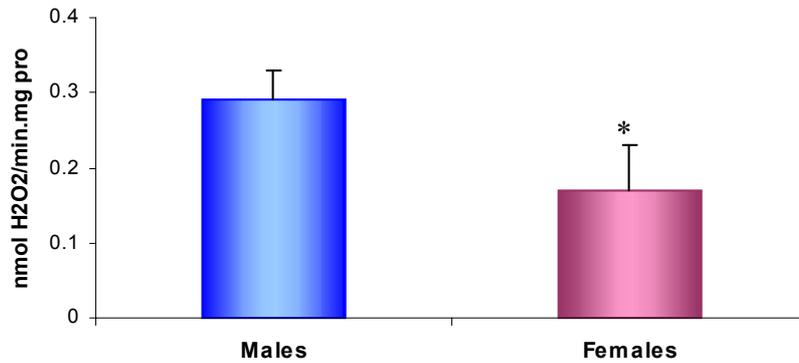
Hydrogen peroxide production from synaptic mitochondria was more than fivefold higher than that from non-synaptic mitochondria (see Figure VI 3A/3B). In both cases mitochondria from males always produced a consistently and significantly higher level of oxidants than those from females. This fact occurs both when mitochondria were incubated with either succinate or with piruvate and malate as respiratory substrate (see Figure VI 3A/3B). In a similar fashion, when we compared hydrogen peroxide production by hepatic mitochondria with that from synaptic mitochondria, we found that the latter had a much higher rate of hydrogen peroxide production than the former (see Figure IV 4.).

Figure VI.3.- Oxidant production by non-synaptic and synaptic mitochondria

A) Non-Synaptic mitochondria

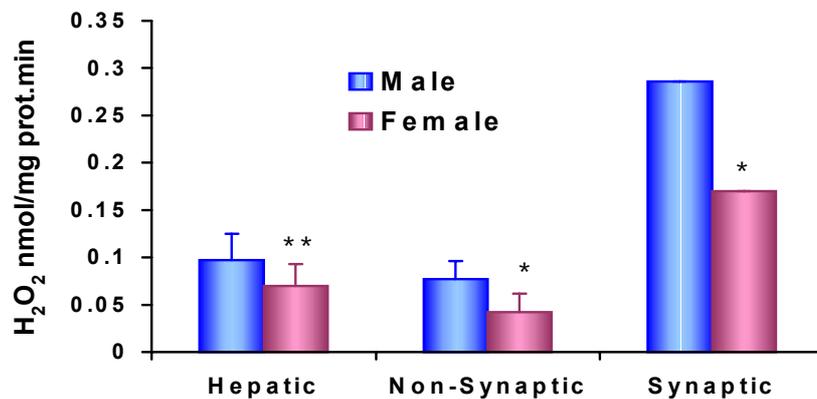


B) Synaptic mitochondria



Peroxide generation is higher in brain mitochondria from male rats than in mitochondria from female rats.

Figure VI.4.- Higher rate of hydrogen peroxide production in synaptic mt than in hepatic mt.



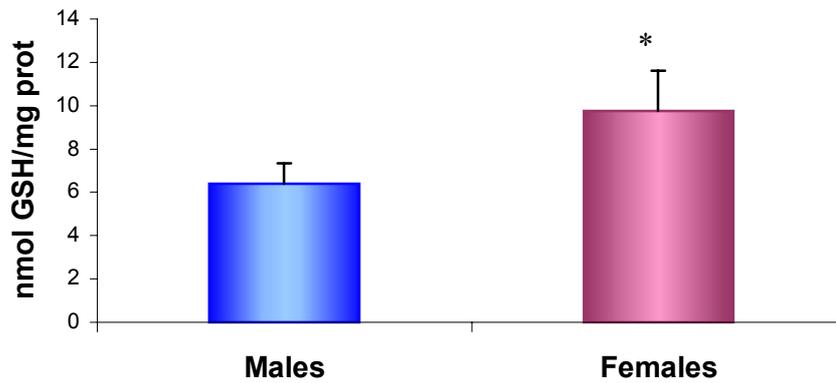
6.4. MITOCHONDRIAL GSH, BUT NOT TOTAL CELLULAR GLUTATHIONE IS HIGHER IN FEMALES THAN IN MALES.

The glutathione redox system constitutes a major intracellular endogenous defence mechanism against oxidation (Viña, 1990). Indeed, intracellular GSH levels in hepatocytes are about five micromoles per gram of tissue, i.e., a value similar to that of glucose (Viña, 1978). Early studies by Jocelyn (Jocelyn, 1975) and by Meister (Meister, 1995) showed that mitochondrial glutathione is critical in the maintenance of normal cell function. This has also been emphasised by Fernández Checa and Kaplowitz (Fernández-Checa et al., 1998). We found that ageing causes a significant decrease in glutathione levels in mitochondria. In fact, most of the oxidation of glutathione that can be observed in cells is due to oxidation of the mitochondrial compartment (García de la Asunción et al, 1996).

Levels of mitochondrial glutathione in males are 40% lower than that of females (see Figure VI.5). However, total liver glutathione levels are similar in both genders.

This, together with the facts reported in Figures VI. 2 and VI.3, emphasizes the protective role of estrogens against mitochondrial free radical damage associated with ageing.

Figure VI.5.- Glutathione levels by hepatic mitochondria from males and females.

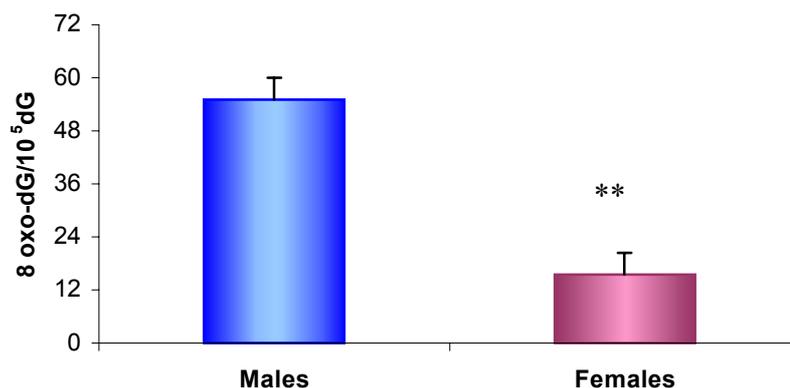


GSH levels are lower in liver mitochondria from male rats than in those from females. GSH levels were determined as described by Brigelius et al. (Brigelius et al, 1983).

6.5. MITOCHONDRIAL DNA OXIDATIVE DAMAGE IS MUCH HIGHER IN MALES THAN IN FEMALES.

In our previous aging studies, we observed that oxidation of mitochondrial glutathione correlates with oxidative damage to mitochondrial DNA (García de La Asunción et al, 1996). The same occurs in apoptosis (Esteve et al., 1999). Thus, we checked whether males had a higher level of oxidative damage to mitochondrial DNA than females. Indeed this is the case and the level of 8-oxo-dG in hepatic mitochondrial DNA is fourfold higher than that found in females (see Figure VI.6).

Figure VI.6.- Mitochondrial DNA damage in liver from males and females.



Mitochondrial DNA oxidative damage is higher in liver from male rats than in liver from female rats. Isolation of mitochondrial DNA and measurement of 8-oxodeoxyguanosine levels –as an index of oxidative damage- were performed as described by García de la Asunción et al (García de la Asunción et al, 1996).

Loft and colleagues published in 90s that urinary excretion of 8-oxo-dG is higher in males than in females (Loft et al, 1992). In a similar fashion, Proteggente et al reported that oxidative damage to DNA is higher in males than in females. However damage to mitochondrial DNA was not measured (Proteggente et al., 2002).

The group of Ames was first to report that mitochondrial DNA oxidation is associated with ageing (Ames et al., 1993). Our group confirmed these findings and, as mentioned earlier, observed that there is a direct relationship between oxidation of glutathione and oxidation of DNA in mitochondria (García de la Asunción et al., 1996). More recently Barja and his co-workers found an increase in mitochondrial, but not in nuclear DNA inversely associated with longevity (Barja et al., 2000). Long-lived species show a lower level of oxidation of mitochondrial DNA than short-lived ones (Richter et al, 1978).

6.6. ESTRADIOL INCREASES THE EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT, LONGEVITY GENES.

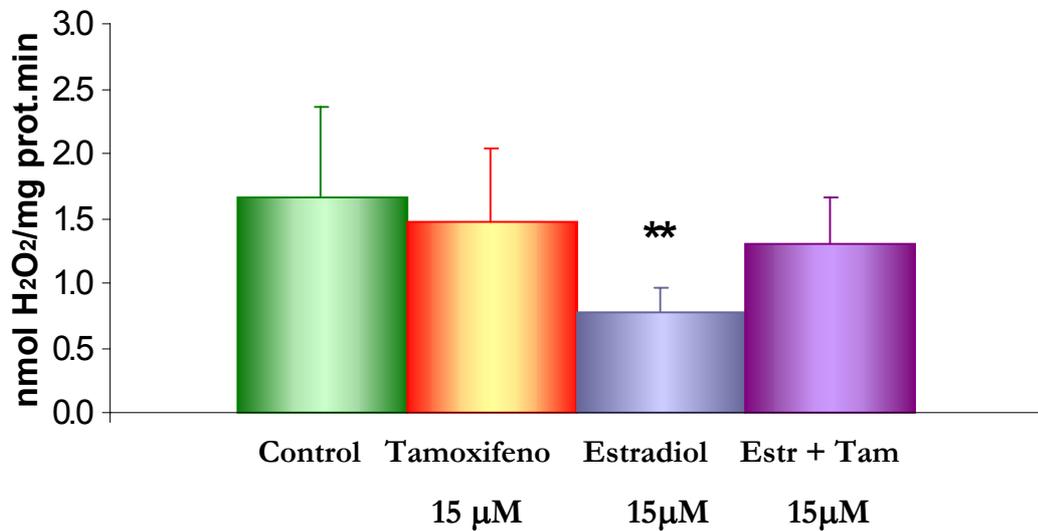
The beneficial effects of estradiol have been widely documented. In particular, estradiol has been shown to have a cardioprotective role (Arnal et al, 1996). The possible importance of estradiol in the prevention of Alzheimer's disease has been proposed but is not widely accepted (Henderson et al, 2000). Moreover, estrogens have a powerful *in vitro* antioxidant effect.

However, the possible effects of estradiol on longevity *in vivo* are unlikely to be due to its chemical antioxidant properties. In fact, the recommended dose of estradiol as part of estrogen replacement therapy is of 50 micrograms per day. However, a widely recommended dose of vitamin E as an antioxidant supplement is 400 milligrams per day, i.e. 8,000 times more than that of estradiol. Therefore, to have significant antioxidant properties due to its chemical structure, estradiol should be 8,000 times more potent an antioxidant than vitamin E. This is clearly not the case. Therefore, we reasoned that the beneficial effects of estrogens in preventing oxidant production by mitochondria might not be due to its chemical properties, but to the induction of the expression of antioxidant genes.

To check this hypothesis we tested whether the effect of estradiol on hydrogen peroxide levels in cells is mediated by receptors. To this end, we used tamoxifen (the estrogen receptor antagonist) and checked its effects on hydrogen peroxide levels in a mammary tumor gland cell line (MCF-7 cells). Estradiol causes

a significant decrease in the levels of H₂O₂ in cells (in agreement with our findings *in vivo*). Tamoxifen significantly blocked this effect (see Figure VI.7).

Figure VI.7.- Hydrogen peroxide levels in mammary gland tumour cells (MCF-7) treated with estradiol and/or tamoxifen



Hydrogen peroxide levels are lower in cells pre-incubated during 1 hour with 15µM estradiol. The addition of 15µM tamoxifen prevents this effect. Hydrogen peroxide levels were measured in MCF-7 cells following the procedure described by Barja (Barja et al, 1999).

Thus, we checked whether estradiol acting via its interaction with estrogen receptors, increased the expression of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase.

Pinto and Bartley first reported the fact that glutathione peroxidase activity was higher in females than in males in the late 60's (Pinto, R.E., 1969). However, these authors did not relate this fact with the different longevity between males and females.

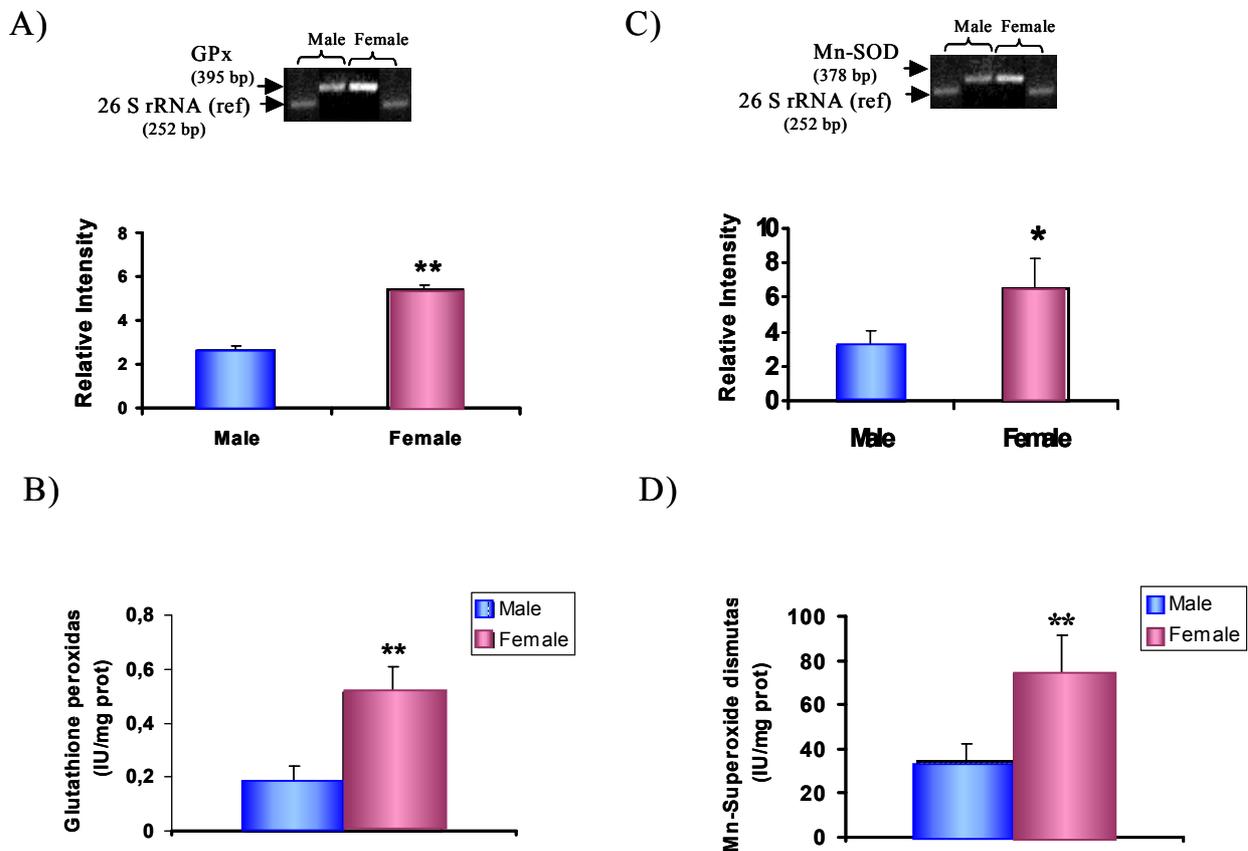
We checked whether this was due to a different gene expression of glutathione peroxidase in females and males. Molecular expression of the glutathione peroxidase gene is significantly lower in males than in females (see Figure IV.8A). Furthermore, these changes in gene expression are translated into a higher activity: Glutathione peroxidase activity in males is approximately 50% of the values found in females (see Figure VI.8B).

In a similar fashion, we tested the effect of gender on gene expression and on enzyme activity of mitochondrial superoxide dismutase. Mn-superoxide dismutase activity in hepatic mitochondria from males is approximately 40% of the value found in females (see Figure VI.8C). This is due to a higher expression of the Mn-SOD gene in females than in males (see Figure VI.8D). Thus, the expression of both superoxide dismutase and of glutathione peroxidase is significantly lower in males than in females.

This is important in the context of previous work by Orr and Sohal (Orr et al, 1994) who showed, in *Drosophila*, that overexpression of superoxide dismutase or catalase alone did not increase average life span. However, *Drosophila* overexpressing both superoxide dismutase and catalase did indeed have a higher

average life span than the controls. In this sense, female rats behave as double transgenics overexpressing both superoxide dismutase and glutathione peroxidase when compared with males. This in itself may explain why the average life span of female rats is higher than that of males.

Figure VI.8.- Expression and activity of Glutathione peroxidase and Mn-superoxide dismutase in liver from male and female rats



Antioxidant defence is higher in liver mitochondria from female rats than in those from males (Borrás et al, 2003). Expression of antioxidant enzymes was studied by RT-PCR using specific oligonucleotides. A) Glutathione peroxidase mRNA expression. B) Glutathione peroxidase (GPx) activity measured as described by Flohe and Gunzler (Flohe et al, 1969). C) Mn-SOD mRNA expression. D) Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) activity was measured as described by Flohe and Otting (Flohe et al, 1969).

6.7. BIOLOGICAL MARKERS OF AGEING INDICATE THAT FEMALES ARE BIOLOGICALLY YOUNGER THAN MALES OF THE SAME CHRONOLOGICAL AGE.

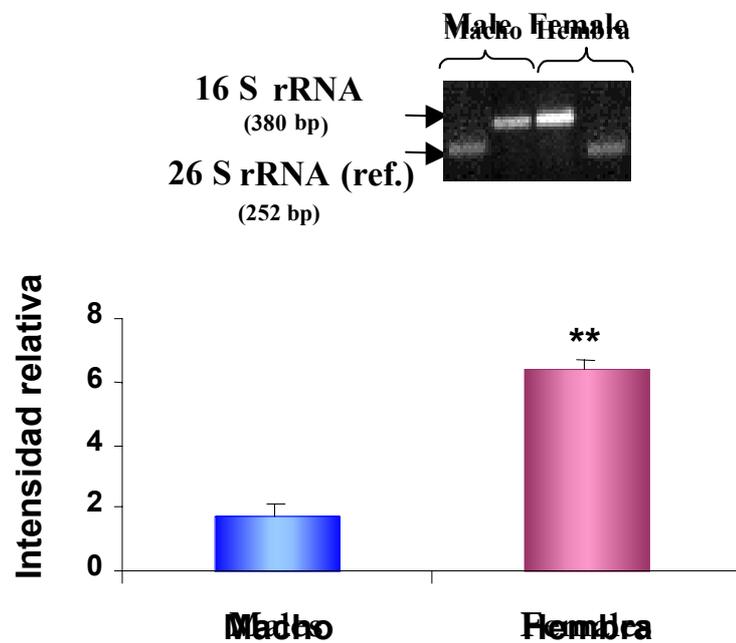
A major challenge of gerontology is to find reliable markers of biological, as opposed to chronological, ageing. In many cases the search for reliable parameters of biological ageing has been sterile. Work by Lang and co-workers have established glutathione levels as a reliable marker of biological ageing (Hazelton et al, 1984). Glutathione levels are significantly higher in females than in males of the same chronological age (see Figure VI.5). Thus, from this point of view females behave as younger than males of the same age.

Another interesting marker of ageing is 16S rRNA. Work by the group of Marco (Calleja et al, 1993) showed an important decrease in mitochondrial transcripts of 16S rRNA with ageing. Moreover, they reported that these changes correlate with the shape of the life span curve.

Work by the group of Davies showed that 16S rRNA degradation is associated with oxidative stress (Crawford et al 1997). Thus we checked the hypothesis that mitochondria from cells of higher biological age should have lower expression of 16S rRNA. If this is the case, mitochondria from female animals should have a higher expression of 16S rRNA than those from males. Indeed, this is the case and 16S rRNA expression in males

was over 700% higher in females than in males (see Figure VI.9). Thus we can conclude that biological markers of ageing indicate that females behave as if they were younger than males of the same chronological age.

**Figure VI.9.- Expression of the biological marker
16S rRNA in liver from male and female
rats.**



Expression of the biological marker 16S rRNA is higher in liver from female rats than in liver from male rats. The mRNA expression was studied by RT-PCR using specific oligonucleotides (see Materials and Methods).

6.8. TELOMERASE. ITS FUNCTION BEYOND THE TELOMERE ELONGATION.

Fifteen years ago Carol Greidel and Elizabeth Blackburn in California solved the problem of the length of telomeres. Indeed, from the classical time of molecular biology it was known that DNA polymerase could not replicate the full DNA molecule (Blackburn y cols., 1989). Pioneering studies by Arthur Kornberg showed that DNA polymerase could elongate DNA strands but could not initiate the replication of the DNA molecule (Kornberg, 1969). Therefore the end of each DNA molecule (in the case of chromosome the telomere), cannot be duplicated by DNA polymerase. This means that each time that the cell duplicates the length of telomere must shorten. Therefore there must be mechanisms, which allow the cell to elongate the telomere and maintain its length constant in spite of many cell divisions.

This is not, however, the case of many normal somatic cells. In fact the length of telomeres shortens with each cell division. On the other hand this explains the classic observation of Hayflick who showed in the 60's that somatic cells such as human fibroblasts have a limited number of cell divisions (Hayflick, 1968).

Greidel and Blackburn discovered an enzyme, telomerase, which is a reversed transcriptase able to elongate telomeres adding a repetitive series of six oligonucleotides (Blackburn et al. 1989). Therefore the main function of telomerase is elongating

telomeres when these are shortened during cell division. This is, however, not the only function of telomerase. Indeed, work by María Blasco at the National Centre of Biotechnology in Madrid has proved that the phenotypic characteristic of knock-out mice and also of transgenic mice that overexpress telomerase shows that telomerase has functions beyond its main role in the maintenance of telomeres (Blasco et al. 2003).

Indeed, telomerase knockout mice show decreased longevity. Telomerase, thus, appears to have an important role in longevity and in senescence.

On the other hand, mice that overexpress telomerase appear to have an increased susceptibility to chemical carcinogenesis.

Thus, there must be equilibrium between shortened longevity (knockout) and increased susceptibility to cancer (overexpression of telomerase). Thus optimal levels of telomerase will be at equilibrium between cancer and decreased longevity.

Our results show that females have an increased longevity than males and also we have found that females have a higher telomerase activity than males and therefore this indicates that the female is better prepared to face a higher longevity than males. However, the females could have an increased susceptibility to carcinogens, particularly those derived of the hormonal action such as mammary or uterine cancer.

These results are in agreement with a study published by Leri et al. (2000) who conclude that telomerase increases in cardiomyocytes in female rats as they grow old. However, it decreases with males.

More studies are required and are indeed being performed in laboratory to explain the interaction between telomerase and longevity.

6.9. CONCLUDING REMARKS

Females live longer than males in many species, including humans. This can be explained on the basis of the mitochondrial theory of ageing. Hepatic or brain mitochondria from females produce significantly less hydrogen peroxides than those from males. On the other hand, they have a higher level of mitochondrial reduced glutathione than those from males. Oxidative damage to mitochondrial DNA, which is related with ageing, is fourfold higher in males than in females. The beneficial effects of estrogens may explain this difference between females and males. The beneficial effects of estrogens are due, not to their chemical antioxidant properties, but rather to their receptor mediated effects on the genome. Expression of antioxidant enzymes such as Mn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase is higher in females than in males. In this respect, females behave as double transgenics overexpressing superoxide dismutase and glutathione peroxidase. The challenge for the future in this field is to find molecules that have the beneficial effects of estradiol but without its feminising effects. Phytoestrogens, or phytoestrogen-related molecules may be good candidates to meet this challenge.

VII. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, podemos extraer las siguientes conclusiones que se enumeran a continuación:

1. Existe una diferencia en la tasa de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno entre machos y hembras. Las mitocondrias aisladas de los machos producen hasta un 100% más de peróxido de hidrógeno que las procedentes de las hembras.
2. Esta tasa de producción de peróxido de hidrógeno es mayor en tejidos postmitóticos (mitocondrias sinápticas), frente a tejidos con capacidad de regeneración (mitocondrias no sinápticas y mitocondrias hepáticas).
3. Las mitocondrias de las ratas hembra contienen niveles superiores de glutatión reducido en comparación con las aisladas de los machos.
4. El daño oxidativo al DNA mitocondrial en las ratas macho es mayor que el de las ratas hembra de la misma edad cronológica.
5. Todo lo expuesto anteriormente podría explicarse basándose en que la actividad y la expresión de la Mn-superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa es mayor en mitocondrias de ratas hembra comparado con las mitocondrias de ratas macho. Las hembras se comportan como dobles transgénicos que sobreexpresan

ambas enzimas, lo cual les confiere una protección especial frente al daño oxidativo.

6. La expresión del marcador biológico de envejecimiento 16S rRNA es mayor en las ratas hembra en comparación con las ratas macho. Partiendo de que ambos géneros poseen una misma edad cronológica, las hembras poseen una edad biológica menor que los machos.
7. La actividad telomerasa está aumentada en las ratas hembra en comparación con las ratas macho. El acortamiento de los telómeros está directamente relacionado con el envejecimiento.
8. Estudios *in vitro* revelan que el efecto antioxidante de los estrógenos a concentraciones comparables a las fisiológicas, está mediado por receptores estrogénicos y por señalización celular a través de la activación de MAPK, y consiguiente inducción de la transcripción génica de enzimas antioxidantes.
9. Los fitoestrógenos como la genisteína son capaces de mimetizar los efectos antioxidantes de los estrógenos. Estas moléculas nos ofrecen por tanto la posibilidad de actuación frente a las agresiones oxidativas en el organismo, eludiendo en su mayor parte, los efectos perjudiciales que lleva consigo la administración de estrógenos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdo KM, Rao G, Montgomery CA, Dinowitz M, Kanagalingam K. (1986) "Thirteen-week toxicity study of d-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats". *Food Chem Toxicol.* 24(10-11) : 1043-50.
- Akman SA, Forrest G, Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH. (1990) "Antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzyme gene expression in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 50(5):1397-402.
- Albertini, R., Rindi, S. et al. (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." *Arch. Biochem. Biophys.* 327(2): 207-214.
- Allen RG, Tresini M. (2000) "Oxidative stress and gene regulation". *Free Radical Biol Med* 28: 463-99.
- Ames, B.N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." *Science* 221: 1256-1264.
- Ames, B.N., Shigenaga, M., Hagen, T.M. (1993) "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922
- Amici, A., Levine, R. L. et al. (1989). "Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions." *J. Biol. Chem.* 264(6): 3341-3346.

- Arnal, J. F., Clamens, S. et al. (1996). "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 U S A* 93(9): 4108-13.
- Aronica, S. M., Kraus, W. L., and Katzenellenbogen, B. S. "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription". (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18), 8517-21
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM. (1998). "Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system". *Arch Biochem Biophys.* 356:133-141.
- Aruoma, O. I. and Halliwell B. (1989). "Inactivation of alfa1antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid." *FEBS Lett.* 244: 76-80.
- Asdell SA, Doornenbal H, Joshi SR, Sperling GA. (1967) "The effects of sex steroid hormones upon longevity in rats". *J Reprod Fertil.* (1): 113-20.
- Asensi, M., Sastre, J. et al. (1994). "A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples." *Analytical Biochemistry.* 217: 323-328.
- Austad S.N. (1997) "Issues in the choice of genetic configuration for animal aging models". *Exp Gerontol.* 32(1-2): 55-63
- Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668.

-
- Barja G. (1999) "Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity". *J. Bioenergetics and Biomembranes* 31 (4), 347-366.
 - Barja G. (2002) "Med Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity" *Free Radic Biol.* 33(9):1167-72
 - Barja G., Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo R. and López-Torres M. (1994) "Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds". *Free Radical Research*, 21, 317-328
 - Barja, G., Herrero A. (2000) "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals". *FASEB J* 14 (2):312-8
 - Barkley K.B., Gregory E.M. (1990) "Tetrameric manganese superoxide dismutases from anaerobic Actinomyces". *Arch Biochem Biophys.* 280(1): 192-200.
 - Barret-Connor E. (1993) "Hormone Replacement". *Am J Geriatr Cardiol.* 2(5): 36-37.
 - Barton, J. P. and Parker, J. E. (1970). "The radiolysis of oxygenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O₂." *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* 2: 159-166.
 - Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxyinitrite: the good, the bad and ugly." *Am. J. Physiol.* 271: C1424-C1437.
 - Beckman, J. S., Ye, Y. Z. et al. (1994). "Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by

immunohistochemistry." *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 375: 81-88.

- Behar, D., Czaspski, G. et al. (1979). "The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical." *J. Phys.Chem.* 74: 3209-3215.

- Behl C., Widmann M., Trapp T. et al. "17-beta-estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro". *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 473-482.

- Bellomo, C., Jewel, S. A. et al. (1982). "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6842-6846.

- Bendich, A. (1997). "Vitamin C safety in humans." *Vitamin C in health and disease.* (L. Packer and K. Funchs Editors). New York: Marcel Dekker.

- Bendich, A., Machlin, L. J. et al. (1986). "The antioxidant role of vitamina C." *Free radical biology and medicine* 2: 419-444.

- Benzi, G. and Moretti A. (1995). "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Rad. Biol. Med.* 19(1): 77-101.

- Berthois, Y., Pourreau-Schneider, N., Gandilhon, P., Mittre, H., Tubiana, N., and Martin, P. M. (1986) "Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems". *J Steroid Biochem* 25(6), 963-72

- Bielsky, B. H. and Gebieki, J. M (1977). "Application of radiation chemistry to biology". Free radicals in biology. P. W.A., Academic Press. 3: 1-19.
- Bird, R. P. and Draper H. H. (1984). "Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination." Methods Enzymol. 105: 299-305.
- Bjorksten J. (1976) "The crosslinkage theory of aging: clinical implications". Compr Ther. 2(2): 65-74.
- Blackburn EH, Greider CW, Henderson E, Lee MS, Shampay J, Shippen-Lentz D. (1989) "Recognition and elongation of telomeres by telomerase". Genome. 31(2): 553-60.
- Blasco M.A. (2003) "Telomeres in cancer and aging: lessons from the mouse". Cancer Lett. 194(2): 183-8.
- Borel, J. P., Monboisse, J. C. et al. (1988). Med. Sci. 5: 304-311.
- Borrás C., Sastre J., Garcia-Sala D., Lloret A., Pallardo F.V., Vina J. (2003) "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. Free Radic Biol Med 34(5): 546-52.
- Boveris, A. and Cadenas, E. (1975). "Mitochondrial generation of hydrogen peroxide anions and its relationship to the actinomycin insensitive respiration." FEBS Lett. 54: 311-316.
- Boveris, A. and Chance, B. C. (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J 143: 707-716.
- Boveris, A., Oshino, N. et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." Biochem. J. 128: 617-630.

- Brand, M. D. and Murphy, M. P. (1987). "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." *Biol. Rev.* 62: 141-193.
- Brandes, R.P., Mugge, A. 1997. "Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta". *Life Sci.* 60 (6): 391 – 396.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M. et al. (1991). "450 Reductase." *Nature* 351: 714-718.
- Breen, A. P. and Murphy, J. A. (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 1033-1077.
- Brigelius, R., Muckel, C. et al. (1983). "Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide." *Biochem Pharmacol* 32: 2529-2534.
- Brunk, U. T., Jones, C. B. et al. (1992). "A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis." *Mutat. Res.* 275: 395-403.
- Burdon RH, Gill V, Boyd PA. (1996) "Hydrogen peroxide and sequence-specific DNA damage in human cells". *FEBS Lett* Apr 1; 383: 150-4.
- Burnet FM. (1970) "An immunological approach to ageing". *Lancet.* 2(7668):358-60.
- Bush, P. A., González, N. E. et al. (1992). "Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185(3): 960-966.

- Cadenas, E., Lertsiri, S. et al. (1996). "Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation in liver and plasma of ODS rats supplemented with alpha-tocopherol and ascorbic acid". *Free Rad. Res.* 26: 485-493.
- Cai Q and Wei H. (1996) "Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice". *Nutr Cancer.* 25:1-7.
- Calleja, M., Peña, P., Ugalde, C., Ferreiro, C., Marco, R., Garesse, R. (1993). "Mitochondrial DNA remains intact during *Drosophila* aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced". *J. Biol. Chem.* 268:18891- 18897
- Carretero, F. (1985) "La citometría de flujo en el control de calidad de la criopreservación". *Biol. Clin. Hematol.* 7: 121-134
- Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. (1987) "Glucose and aging". *Sci Am.* 256(5): 90-6.
- Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. (1979) "Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals". *J Biol Chem.* 254(11): 4764-71.
- Chang, L. Y. (1988). "Molecular immunocytochemistry of the Cu,Zn superoxide dismutase in rat hepatocytes." *J. Cell. Biol.* 107: 2169-2179.
- Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.
- Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E., and Shaul, P. W. (1999) *Journal of Clinical Investigation* 103(3), 401-6

-
- Cilento, G. and Adam, W. (1995). "From free radicals to electronically excited species." *Free. Radic. Biol. Med.* 19(6): 103-114.
 - Ciriolo M.R., Civitareale P., Carri M.T., De Martino A., Galiazzo F., Rotilio G. (1994) "Purification and characterization of Ag,Zn-superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* exposed to silver". *J Biol Chem.* 269(41): 25783-7.
 - Corbin C.J., Graham-Lorence S., McPhaul M., Mason J.I., Mendelson C.R., Simpson E.R. (1988) "Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(23): 8948-52.
 - Corbisier, P. and Remacle, J. (1990). "Involvement of mitochondria in cell degeneration." *European J. Cell. Biol.* 51: 173-182.
 - Cosman F, Shen V, Seibel M et al. (1993) "Estrogen on protection against bone resorbing effects of parathyroid hormone infusion". *Annals Int. Med* 118: 337-43.
 - Cotton, F. A., Wilkinson, G. et al. (1987). *Basic inorganic chemistry*, 2ª Edición, John Wiley & Sons, USA.
 - Crawford, D.R., Wang, Y., Schools, G.P., Kochheiser, J., Davies, K.J.A. (1997). "Down regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress". *Free Rad Biol Med.* 22:551- 559.
 - Cutler RG. (1991) "Antioxidants and aging". *Am J Clin Nutr.* 53(1 Suppl): 373S-379S.
 - Czapski, G. and Goldstein, S. (1995). "The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological

systems: A kinetic approach." *Free. Radic. Biol. Med.* 19(6): 785-794.

- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. (1982) "Free radicals and tissue damage produced by exercise". *Biochem Biophys Res Commun.* 1982 Aug 31;107(4):1198-205.

- Davies, K. J. A. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects." *Journal of Biological Chemistry* 262: 9895-9901.

- Davies, K. J. A. and Lin, S. W. (1988). "Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*." *Free Rad. Biol. Med.* 5: 215-223.

- Davies, K. J. A., Sevanian, A. et al. (1986). "Uric acid-iron iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid." *Biochem. J.* 235: 747-754.

- Dean, R. T., Giese, S. et al. (1993). "Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins." *TIBS.* 18: 437-441.

- Demple B, Halbrook J. (1983) "Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*". *Nature.* 304(5925):466-8.

- Dempster DW, Lindsay R. (1993). "Osteoporosis pathogenesis". *Lancet* 341: 797-805.

- Deno, P. C. (1982). "Free radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent branched DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin." *Chem. Res. Toxicol* 5(3): 311-332.

- Dillard CJ, Tappel AL. (1984) "Fluorescent damage products of lipid peroxidation". *Methods Enzymol.* 105:337-41.

-
- Diplock AT. (1995) "Safety of antioxidant vitamins and beta-carotene". *Am J Clin Nutr.* 62(6 Suppl) : 1510S-1516S.
 - Dizdaroglu M. (1993) "Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry". *FEBS Lett.* 315(1):1-6.
 - Dolphin, D. (1988). "The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. Oxygen radicals in biology and medicine". M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press.: 491-500.
 - Doroshow JH, Akman S, Esworthy S, Chu FF, Burke T. (1991) "Doxorubicin resistance conferred by selective enhancement of intracellular glutathione peroxidase or superoxide dismutase content in human MCF-7 breast cancer cells". *Free Radic Res Commun.* 12-13 Pt 2:779-81.
 - Doroshow, J. and Hochstein, P. (1982). "Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases". *Pathology of Oxygen.* New York, Academic Press: 245-253.
 - Duke MV, Salin ML. (1985) "Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*". *Arch Biochem Biophys.* 243(1):305-14.
 - Dumelin, E. E. and Tappel, A. I. L. (1977). "Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides." *Lipids.* 12: 894-900.
 - Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S., and Kawashima, H. (1997) "Rapid

activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line".
Biochem Biophys Res Commun 235(1), 99-102

- Erdman JW Jr, Bierer TL, Gugger ET. (1993) "Absorption and transport of carotenoids". *Ann N Y Acad Sci.* 691:76-85.

- Eriksson AM, Lundgren B, Andersson K, DePierre JW. (1992) "Is the cytosolic catalase induced by peroxisome proliferators in mouse liver on its way to the peroxisomes?" *FEBS Lett.* 308(2): 211-4.

- Esterbauer, H. and Zollner, H. (1989). "Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products." *Free Rad. Biol. Med.* 7: 197-203.

- Esterbauer, H., Schaur, R. J. et al. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes." *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81-128.

- Esteve, J., Mompó, J., García de la Asunción, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Viña, J.R., Viña, J., Pallardó, F.V. (1999) "Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro". *FASEB Journal* 13, 1055-1064,.

- Estrela, J. M., Saez, G. T. et al. (1983). "The effect of cysteine and N-acetylcysteine on rat liver glutathione." *Biochem. Pharmacol.* 32(22): 3483-3485.

- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., and Wehling, M. (2000) "Multiple actions of steroid hormones a focus on rapid, nongenomic effects". *Pharmacol Rev* 52(4), 513-56.

- Farhat M.Y., Abi-Younes S., Dingaon B., Vargas R., and PW, R. (1996) "Estradiol increases cyclic adenosine

monophosphate in rat pulmonary vascular smooth muscle cells by a nongenomic mechanism". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276(2), 652-657

- Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J. Chem. Soc. Trans.* 65: 899-910.

- Fernández-Ballesteros, R.; Díez-Nicolas, J.; Ruiz-Torres, A. Spain. In: Schroots, J.; Fernandez-Ballesteros, R.; Rudinger, G., (1999) eds. *Aging in Europe*. Amsterdam: IOS Press: 107–121.

- Fernández-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A. (1998) "Mitochondrial glutathione: importance and transport". *Semin Liver Dis*, 18(4): 389-401,

- Finkel T, Holbrook NJ. (2000) "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature* 408: 239-47.

- Fisher, B., Dignam, J., Wolmark, N., Wickerham, D. L., Fisher, E. R., Mamounas, E., Smith, R., Begovic, M., Dimitrov, N. V., Margolese, R. G., Kardinal, C. G., Kavanah, M. T., Fehrenbacher, L., and Oishi, R. H. (1999) "Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial". *Lancet* 353(9169), 1993-2000.

- Flodin N.W. (1984) "The senescence of postmitotic mammalian cells: a cell-clock hypothesis". *Mech Ageing Dev.* 27(1): 15-27.

- Fontcave, M. and Pierre, J. L. (1991). "Iron metabolism: The low molecular mass iron pool." *Biol. Metals.* 4: 133-135.

- Forstrom, J. W., Zakowski, J. J. et al. (1978). "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine." *Biochemistry.* 17: 2639-2644.

- Foster, R. E. and Estabrook, R. W. (1993). "Is oxygen an essential nutrient?" *Annu. Rev. Nutr* 13: 383-403.
- Fraga, C. G., Shigenaga, M. K. et al. (1990). "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4533-4537.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injure." *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species an antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.
- Fridovich, I. (1974). "Superoxide dismutase." *Adv. Enzymol.* 41: 35-97.
- Fridovich, I. (1986). "Oxygen radicias, hydrogen peroxide and oxygen toxicity." *Free radicals in biology.* 1. Pryor W.A. (ed) New York, Academic Press: 239-246.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters." *J. Biol. Chem.* 272(30): 18515-18517.
- Fucci, L., Oliver, C. N. et al. (1983). "Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1521-1525.
- Gadaleta M.N., Lezza A.M.S. and Cantatore, P. (1999) "Mitochondrial DNA deletions". In *Methods in Aging Research*, (ed. B.P. Yu) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 475-511.

-
- Gamcsik MP, Dubay GR, Cox BR. (2002) "Increased rate of glutathione synthesis from cystine in drug-resistant MCF-7 cells". *Biochem Pharmacol* 63(5): 843-51.
 - García de la Asunción, J., Millán, A. et al. (1996). "Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA." *Faseb J* 10(2): 333-8.
 - Giulivi, C., Boveris, A., and Cadenas E. (1995) "Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316, 909-916.
 - Giulivi, G.; Davies, K.J. (1990) "A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin". *J Biol Chem.* 265(32): 19453-60.
 - Godon, C.; Lagniel, G.; Lee, J.; Buhler, J. M.; Kieffer, S.; Perrot, M.; Boucherie, H.; Toledano, M. B. y Labarre, J. (1998). "The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* 273: 22480-22489.
 - Goldstein, S. and Czapski, G. (2000). "Reactivity of peroxyxynitrite versus simultaneous generation of (*NO and O(2)(*(-) toward NADH." *Chem. Res. Toxicol* 13: 736-741.
 - Goldstein, S., G. Czapski, et al. (2000). "Tyrosin nitration by simultaneous generation of NO· and O₂· - under physiological conditions. How the radicals do the job." *J. Biol. Chem.* 275: 3031-3036.
 - González F.J., Matsunaga T., Nagata K., Meyer U.A., Nebert D.W., Pastewka J., Kozak C.A., Gillette J., Gelboin H.V., Hardwick J.P. (1987) "Debrisoquine 4-hydroxylase:

characterization of a new P450 gene subfamily, regulation, chromosomal mapping, and molecular analysis of the DA rat polymorphism". *DNA*. 6(2): 149-61.

- Goodman y Gilman "Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica".

- Gottardis, M. M., and Jordan, V. C. (1987) "Inhibition of tamoxifen-stimulated growth of an MCF-7 tumor variant in athymic mice by novel steroidal antiestrogens". *Cancer Res* 47(15), 4020-4.

- Granger, D. N. and Kubes, P. (1996). "Nitric oxide as anti-inflammatory agent." *Methods Enzymol*. 369: 434-442.

- Greenwald, R. A. and Moy, W. W. (1980). "Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid." *Arthritis Rheum*. 23: 455-463.

- Grisham, M. B. and McCord, J. M. (1986). "Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites." *Physiology of oxygen radicals*. Clinical Physiology series. Bethesda Mariland American physiological society. : 1-18.

- Grisham, M. B., Jourdeuil, D. et al. (1999). "Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation." *Am. J. Physiol*. 276: G315-G321.

- Grootveld, M., Henderson, E. B. et al. (1991). "Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise metabolites of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass by proton-n.m.r. spectroscopy." *Biochem. J*. 273: 459-467.

- Gruber C.J., Tschuggel W., Schneeberger C., Huber J.C. (2002) "Production and actions of estrogens". *N Eng J Med.* 346: 340e
- Gryglewsi, R. J., Palmer, R. M. J. et al. (1986). "Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor." *Nature* 320: 454-456.
- Gu Q., Korach K.S., Moss R.L. (1999) "Rapid action of 17beta estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors". *Endocrinology* 140(2): 660-666.
- Gutteridge, J.M; Stocks, J. (1981) "Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives". *Crit Rev Clin Lab Sci.* 14(4): 257-329.
- Guvakova, M. A., and Surmacz, E. (1997) "Overexpressed IGF-I receptors reduce estrogen growth requirements, enhance survival, and promote E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in human breast cancer cells". *Cancer Res* 57(13), 2606-10.
- Haber, F. and Weiss, J. (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." *Proc. R. Soc. London.* 147: 332-351.
- Hageman, H. H., Bast, A. et al. (1992). "Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: Analytical aspects." *Chem. Biol. Interactions.* 82: 243-293.
- Halliwell B., Aeschbach R., Loliger J., Aruoma O.I. (1995) "The characterization of antioxidants". *Food Chem Toxicol.* (7): 601-17.

- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" *Lancet* 344: 721-724.
- Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50.
- Halliwell, B. and Auroma, O. I. (1991). "DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems." *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989). "Free Radicals in Biology and Medicine". Oxford, Clarendon Press, Reino Unido.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- Harman D. (1956) "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry". *Journal of Gerontology*, 11, 298- 300.
- Harman D. (1981) "The aging process". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(11): 7124-8.
- Harman D. (1986) "Free radical theory of aging: Role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease processes". In *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases* (eds. J.E. Johnson Jr., R. Walford, D. Harman and J. Miquel) Alan R. Liss, New York, pp. 3-49
- Harman, D. (1978). "Free radical theory of aging: Nutritional implications." *Age.* 1: 145-152.

- Harman, D. (2001) “Radicales libres, envejecimiento y enfermedad” Antioxidantes y calidad de vida.
- Harper, A; Kerr, DJ; Gescher, A. and Chipman KJ. (1999) “Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation”. Free Rad Res.; 31149-31160.
- Hassan, H. M. and Fridovich, I. (1977). "Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in Escherichia coli." J. Biol. Chem. 252: 7667-7672.
- Hayflick L. (1968) “Human cells and aging”. Sci Am. 218(3): 32-7
- Hayflick L. (1980) “Recent advances in the cell biology of aging”. Mech Ageing Dev. 14(1-2): 59-79.
- Hazelton, G. A.; Lang, C. A. (1984) “Glutathione levels during the mosquito life span with emphasis on senescence. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.176, 249-256
- Henderson, V., W., Paganini-Hill, A., Miller, B.L., Elble, R.J., Reyes, P.F., Shoupe, D., McCleary, C.A., Klein R.A., Hake, A.M. Farlow, M.R. (2000) “Estrogen for Alzheimer’s disease in women. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial”. Neurology. 54:295 – 301.
- Holmgren, A. (1979). "Glutathione dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from Escherichia coli." J. Biol. Chem. 254: 3664-3671.
- Huynh, H. T., and Pollak, M. (1993) “Insulin-like growth factor I gene expression in the uterus is stimulated by

tamoxifen and inhibited by the pure antiestrogen ICI". *Cancer Res* 53(23), 5585-8.

- Hyder, S. M., Stancel, G. M., Chiappetta, C., Murthy, L., Boettger Tong, H. L., and Makela, S. (1996) "Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifeno". *Cancer Res* 56(17), 3954-60.

- Ischiropoulos, H. (1990). "Effect of aging on pulmonary superoxide dismutases." *Mech. Ageing Dev.* 52: 11-26.

- Ishikawa T, Zimmer M, Sies H. (1986) "Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide". *FEBS Lett.* 200(1): 128-32.

- Janssen, Y. M. W., Van Houten, B. et al. (1993). "Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage." *Lab. Invest.* 69(3): 261-74.

- Jenkins DJA, Kendall CWC, Garsetti M, Rosenberg-Zand RS, Jackson C-J, Agarwal S, Rao AV, Diamandis EP, Parker T, Faulkner D, Vuksan V, Vidgen E. (2000) "Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity- a controlled cross-over trial". *Metabolism.* 49:537-543.

- Jensen B.D. y Horan P.K., (1989) "Flow cytometry: Rapid isolation and analysis of single cells". *Methods in Enzimol.* 171: 549-581; Böck G., 1990 *Flow cytometry (an overview)* *Appl. fluorescence technol.* 2: 11-14)

- Jensen, P. K. (1966). "Antimicyn insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles." *Biochem. Biophys. Acta.* 122: 157-161.

-
- Jocelyn P.C. (1975) "Some properties of mitochondrial glutathione". *Biochim Biophys Acta* 396(3): 427-36,
 - Johns D.R. (1995) "Mitochondrial DNA and disease". *New England Journal of Medicine*, 333, 638-644.
 - Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ (1996) "Reactive oxygen species are downstream mediators of p53 dependent apoptosis". *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11848-52.
 - Jordan V.C., Mittal S., Gosden B., Koch R., Lieberman M.E. (1985) "Structure-activity relationships of estrogens". *Environ Health Perspect.* 61: 97-110.
 - Jordan, V. C. (1976) "Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata". *Eur J Cancer* 12(6), 419-24.
 - Jourdeuil, D., Jourdeuil, F. L. et al. (2001). "Reaction of Superoxide and Nitric Oxide with Peroxynitrite." *J. Biol. Chem.* 276: 28799-28805
 - Kanazawa T, Osanai T, Zhang XS, Uemura T, Yin XZ, Onodera K, Oike Y, Ohkubo K. (1995) "Protective effects of soy protein on the peroxidizability of lipoproteins in cerebrovascular diseases". *J Nutr.* 125:639S-646S.
 - Kappus H., Diplock A.T. (1992) "Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report". *Free Radic Biol Med.* 13(1): 55-74.
 - Kasai, H. and Nishimura, S. (1984). "Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents". *Nucleic Acids Res.* 12: 2137-2145.
 - Kasai, H., Crain, P. F. et al. (1986). "Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing

oxygen radicals and evidence for its repair." *Carcinogenesis*. 7: 1849-1851.

- Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN. (1994) "Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys". *Am J Physiol*. 266(4 Pt 1): E540-7.

- Kennedy T.A., Liebler D.C. (1992) "Peroxy radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure". *J Biol Chem*. 267(7): 4658-63.

- Ketterer, B. (1986). "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." *Xenobiotica*. 16: 957-973.

- Kinnula, V. L., J. D. Crapo, et al. (1995). "Biology of disease: Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung." *Lab. Invest*. 73(1): 3-19.

- Kleinman, D., Karas, M., Danilenko, M., Arbell, A., Roberts, C. T., LeRoith, D., Levy, J., and Sharoni, Y. (1996) "Stimulation of endometrial cancer cell growth by tamoxifen is associated with increased insulin-like growth factor (IGF)-I induced tyrosine phosphorylation and reduction in IGF binding proteins". *Endocrinology* 137(3), 1089-95.

- Knight, J. A., Smith, S. E. et al. (1988). "Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography and determination of reference values for adults." *Clin. Chem*. 34: 1107-1110.

- Knobil E. (1981) "Patterns of hormonal signals and hormone action". *N Engl J Med*. 305(26): 1582-3.

- Korach, K. S. (1994) "Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor". *Science* 266(5190), 1524-7.
- Kornberg A. (1969) "Active center of DNA polymerase". *Science*. 163(874):1410-8.
- Korycka-Dahi, M. and Richardson, T. (1981). "Initiation of oxidative changes in food. Symposium: oxidative changes in milk." *J. Dairy Sciences*. 63: 1181-1208.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1978). "The glutathione status of the cells." *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160.
- Krasavage W.J., Terhaar C.J. (1977) "d-alpha-Tocopheryl poly(ethylene glycol) 1000 succinate. Acute toxicity, subchronic feeding, reproduction, and teratologic studies in the rat". *J Agric Food Chem.* 25(2): 273-8.
- Krishnaraj R. (1992) "Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors. 2. Age-associated, gender-specific partial loss of sensitivity to ATP". *Cell Immunol.* 144(1): 11-21.
- Kristal, B.A., Chen J. and Yu, B.P. (1994) "Sensitivity of mitochondrial transcription to different free radical species". *Free Radical Biology & Medicine*, 16 (3), 323-329.
- Kuge, S. y Jones, N. (1994). "YAP-1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides." *EMBO J.* 13: 655-664.
- Kuiper G.G., Shughrue P.J., Merchenthaler I. (1998) "The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems". *Front Neuroendocrinol.* 19(4): 253-286.

- Lai, J.C.K., Clark, J.B (1979). "Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondrial from mammalian brain". *Meth Enzymol.* 55:51- 60,.
- Lamas, S., Marsden, P. A. et al. (1992). "Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6348-6359.
- Lee AV, Cui X, Oesterreich S. (2001) "Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer". *Clin Cancer Res.* 7(12 Suppl): 4429s-4435s
- Lee C.M., Weindruch, R. and J.M. Aiken (1997) "Age-associated alterations of the mitochondrial genome". *Free Radical Biology & Medicine*, 22 (7), 1259-69.
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA. (2000) "Gene expression profile of the aging brain in mice". *Nature Genet* 25: 294-97.
- Leffers H, Naesby M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, Jorgensen M. (2001) "Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters". *Hum Reprod.* (5):1037-45.
- Leri, A., Malhotra, A., Liew, C. C., Kajstura, J., Anversa, P. (2000) "Telomerase activity in rat cardiac myocytes is age and gender dependent" *J Mol Cell Cardiol* 32(3): 385-90
- Levander O.A., Morris V.C., Higgs D.J., Varma R.N. (1973) "Nutritional interrelationships among vitamin E, selenium, antioxidants and ethylalcohol in the rat". *J Nutr.* 103(4): 536-42.

- Levin, E. R. (1999) "Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor". *Trends Endocrinol Metab* 10(9), 374-377
- Levin, E.R. (2001) "Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors". *J Appl Physiol* 91(4): 1860-7
- Levine M. (1986) "New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid". *N Engl J Med.* 314(14) : 892-902.
- Lewis AD, Hayes JD, Wolf CR. (1988) "Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects". *Carcinogenesis.* 9(7): 1283-7.
- Lewisch, S. A. and Levine, R. L. (1995). "Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis." *Anal. Biochem.* 231: 440-446.
- Liang X, Lu B, Scott GK, Chang CH, Baldwin MA, Benz CC. (1998) "Oxidant stress impaired DNA-binding of estrogen receptor from human breast cancer". *Mol Cell Endocrinol.* 146(1-2): 151-61.
- Linnane, A. W., Marzuki, S. et al. (1989). "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases." *Lancet.*: 642-645.
- Lippman, R. D. (1985). "Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man." *Exp. Gerontol.* 20: 1-5.

-
- Lipton, S. A., Chol, Y. B. et al. (1993). "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds" *Nature*. 364: 626-632.
 - Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tinneland, A., Overvard, K. Poulsen H.E. (1992) "Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index". *Carcinogenesis* 13 2241-2247
 - Lopez-Torres M., Perez-Campo R., Barja G. (1991) "Effect of natural ageing and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, peroxidation, and oxygen consumption in *Rana perezi*". *J. Comp. Physiol [B]*. 160(6): 655-61.
 - Lymar, S. V. and Hurst, J. K. (1995). "Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants." *J. Am. Chem. Soc.* 117: 8867-8868.
 - MacDonell D. (1998) "Mechanism of action of estrogens". Wyeth-Ayerst International Inc. The New Science of HRT Meeting. 6-9.
 - Machlin L.J., Bendich A. (1987) "Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients". *FASEB J.* 1(6):441-5.
 - Makita, T. (1990). "Cytochemical and immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the intima of swine and rat aorta." *Am. N. Y. Acad. Sci.* 598: 510-511.
 - Mangels, A. R., Holden, J. M. et al. (1993). "Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data." *J. Am. Dietetic Assoc.* 93: 284-296.

- Marcocci L., Packer L., Droy-Lefaix M.T., Sekaki A., Gardes-Albert M. (1994) "Antioxidant action of Ginkgo biloba extract EGb 761". *Methods Enzymol.* 234:462-75.
- Marjorie K.J, Charles H.C. (1993) "Systemic Osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factor". *JADA*, 124: 49-56.
- Marklund, S. L. (1982). "Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 7634-7638.
- Marquez D.C., and RJ., P. (2001) *Oncogene* 20(39), 5420-30
- Mason, R. P. (1982). "Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance". *Free radicals biology.* W. A. Pryor. New York, Academic Press: 262-165.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). "Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein)." *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.
- McCord, J. M., Keele, B. B. et al. (1974). "An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci USA* 41: 35-97.
- McMicking, J., Xie, Q. W. et al. (1997). "Nitric oxide and macrophage function." *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.
- Mecocci P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz, D., Shoffner, J.M., Wallace D.C. and Beal M.F. (1993) "Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain". *Annals of Neurology*, 34, 609-616.

- Medvedev, Z. (1990). "An Attempt At a Rational Classification of Theories of Ageing". *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 65:375-398.
- Meister A (1995). "Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency". *Biochim Biophys Acta*, 1271(1): 35-42
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983). "Glutathione." *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Mendelsohn M.E., Karas R.H. (1999) "The protective effects of estrogen on the cardiovascular system". *N Engl J Med*. 340(23): 1801-11.
- Mendelson C.R., Simpson E.R. (1987) "Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells in vitro" *Mol Cell Endocrinol* 52(3): 169-76.
- Métézeau y Delamare, (1988) "Les principales techniques". En: *la cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique*. Medis/Mc Graw-Hill (Paris).
- Miles, A. M., Bohle, D. S. et al. (1996). "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide." *J. Biol. Chem.* 271: 40-47.
- Miquel J, Fleming J, Economos AC. (1982) "Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila*". *Arch Gerontol Geriatr*. 1(2): 159-65.
- Miquel, J. and Fleming, J. (1986). "Theoretical and experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of cell aging". *Free radicals, aging and degenerative diseases*. J. E. J. Johnson, R. Walford and D. Harman. New York., Alan R. Liss: 51-74.

-
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J. and Johnson Jr. J.E. (1980) "Mitochondrial role in cell aging". *Exp. Gerontol.* 15:575-591.
 - Miquel, J., Lundgren, P. R. et al. (1978). "Spectrophotofluorimetric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice." *J. Gerontol.* 33: 5-19.
 - Mitchell JH, Collins AR. (1999) "Effects of a soy milk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men- a pilot study". *Eur J Nutr.* 38:143-148.
 - Miyazawa, T., Fujimoto, K. et al. (1994). "Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography." *Methods Enzymol.* 233C: 324-332.
 - Mobley JA, Brueggemeier RW. (2002) "Increasing the DNA damage threshold in breast cancer cells". *Toxicol Appl Pharmacol.* 180(3): 219-26.
 - Moncada, S., Palmer, R. M. et al. (1986). "Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 9164-9168.
 - Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. (1984) "Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(2): 583-7.
 - Morimoto R, Santoro MG. (1998) "Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection". *Nature Biotechnol* 16: 833-38.
 - Moss R.L., Gu Q. (1999) "Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons". *Steroids* 64(1-2): 14-21

- Nakajima, T., Kitazawa, T., Hamada, E., Hazama, H., Omata, M., and Kurachi, Y. (1995) "17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells". *Eur. J. Pharmacol.* 294, 625-635
- Nakamura, H.; Matsuda, M.; Furuke, K.; Kitaoka, Y.; Iwata, S.; Toda, K.; Inamoto, T.; Yamaoka, Y.; Ozawa, K. y Yodoi, J. (1994). "Adult T cell leukemia-derived factor Yhuman thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide." *Immunol. Lett.* 42: 75-80.
- Nakamura, H.; Nakamura, K. y Yodoi, J. (1997). "Redox regulation of cellular activation." *Annu. Rev. Immunol.* 15: 351-369.
- Nemere, I., and Farach-Carson, M. C. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 248(3), 443-9
- Niki, E., Noguchi, N. et al. (1995). "Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene." *AM. J. Clin. Nutr.* 62 (suppl.): 1322S.
- Nilsson PM, Nilsson E, Svanberg L, Samsioe G. (2003) "Longevity after early surgical menopause-the long-term effect of a permanent cessation of reproductive function and female sex hormone loss". *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 110(1): 63-5.
- Nohl, H. and Jordan, W. (1986). "The mitochondrial site of superoxide formation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 533-539.
- Oberley, L. W. (1988). "Free radicals in diabetes." *Free Rad. Biol. Med.* 5: 113-124.

- Ochoa, S. (1983). "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes." *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 325-349.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W. et al. (1987). "Age-related changes in oxidized proteins." *J. Biol. Chem.* 262: 5488-5491.
- Olson J.A., Krinsky N.I. (1995) "Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators". *FASEB J.* 9(15):1547-50.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E. et al. (1996). "Effects of combination of b-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease." *New Eng. J. Med.* 334: 1150-1155.
- Orgel, L. E. (1965). "The chemical basis of mutation." *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 27: 289-346.
- Orr WC, Sohal RS. (1992) "The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*". *Arch Biochem Biophys.* 297(1): 35-41.
- Orr, W.C., and Sohal, R. (1994). "Extension of Life-Span by Overexpression of Superoxide Dismutase and Catalase in *Drosophila melanogaster*". *Science.* 263:1128-1130.
- Orrenius, S. and Moldeus, P. (1984). "The multiple roles of glutathione in drug metabolism." *Trends. Pharmacol. Sci.* 5: 432-435.
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. (2001) "Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation". *Clin Cancer Res.* 7(12 Suppl): 4338s-4342s

- Pajares, M. A., Corrales, F. et al. (1992a). "How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated?" FEBS Letters. 309(1): 1-4.
- Pajares, M. A., Durán, C. et al. (1992b). "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione." J. Biol. Chem. 267(25): 17598-17605.
- Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA. (2002) "Estrogen receptor beta in breast cancer". Endocr Relat Cancer. 9(1):1-13.
- Palozza, P., Luberto, C. et al. (1997). "Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure." Free Rad. Biol. Med. 22: 1065-1073.
- Parker RS. (1989) "Dietary and biochemical aspects of vitamin E". Adv Food Nutr Res. 33:157-232.
- Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-Usmar V. (2001) "Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging". Free Rad Biol Med. 31:1570-1581.
- Pauling, L. (1973). "Vitamin C, the common cold and the flu." Ed. Freeman S. Francisco.
- Pearl R. (1928) "The Rate of living" University of London Press, London.
- Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. (1998) "The rate of free radical production as a

determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach". *J Comp Physiol [B]*. 168(3): 149-58.

- Philpot, R. M. (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." *Methods. Enzymol.* 206: 623-631.

- Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1977) "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells". *Nature* 265(5589), 69-72

- Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1979) "Estrogen receptors in uterine plasma membrane". *J Steroid Biochem* 11(4), 1471-83

- Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1980) "Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes". *Biochem J* 191(3), 743-60

- Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1984) "Specific internalization of estrogen and binding to nuclear matrix in isolated uterine cells". *Biochem Biophys Res Commun* 123(1), 84-91

- Pinto, R.E., and Bartley, W. (1969) "The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates". *Biochem. J.* 112:109- 115,

- Postlethwait, E. M., Langford, S. D. et al. (1995). "NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." *Free. Radic. Biol. Med.* 19(5): 553-563.

- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR. (1994) "Acclimation, Hydrogen Peroxide, and Abscisic Acid Protect Mitochondria against Irreversible Chilling Injury in Maize Seedlings". *Plant Physiol.* (1994) 105(2): 619-627.

- Proteggente, A.R., England, T.G., Rehman, A., Rice-Evans, C.A., Halliwell, B. (2002) "Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals" *Free Radical Research*, 36, 157-162
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., and Levin, E. R. (1999) "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells". *Mol Endocrinol* 13(2), 307-19
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. (1995) "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids". *Free Radic Res. Apr*; 22(4):375-83.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. (1996) "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food". *Biochem Soc Trans.* 24(3) : 790-5.
- Richman, P. and Meister, A. (1975). "Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione." *J. Biol. Chem.* 250: 1422-1426.
- Richter, C., Park, JW, Ames, B. (1988) "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6465-6467
- Rivett, A. J. (1985). "The effect of mixed-function oxidation of enzymes on their susceptibility to degradation by a nonlysosomal cysteine proteinase." *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 624-632.
- Rodgers EH, Grant MH (1998) "The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth

and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells”. *Chem Biol Interact.* 116(3): 213-28.

- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) “Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial”. *JAMA.* 288(3): 321-33.

- Ruiz- Larrea, M.B., Leal, A.M., Martín, C., Martínez, R., Lacort, M. (1997). “Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes”. *J. Physiol. Biochem. Rev. Esp. Fisiol.* 53:225-230.

- Russell, K. S., Haynes, M. P., Sinha, D., Clerisme, E., and Bender, J. R. (2000) “Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 5930-5

- Sack MN, Rader DJ, Cannon RO 3rd. (1994) “Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women”. *Lancet.* 343(8892) : 269-70.

- Salomon, D. S., Ciardiello, F., Valverius, E., Saeki, T., and Kim, N. (1989) “Transforming growth factors in human breast cancer”. *Biomed Pharmacother* 43(9), 661-7

- Sancar, A. Z. and Sancar, G. B. (1988). "DNA repair enzymes." *Annu. Rev. Biochem.* 57: 29-67.

-
- Sastre J., Rodriguez J.V., Pallardo F.V., Gasco E., Asensi M., Ferrer J.V., Miquel J., Vina J. (1992) "Effect of aging on metabolic zonation in rat liver: acinar distribution of GSH metabolism". *Mech Ageing Dev.* Feb; 62(2): 181-90.
 - Sato, H.; Tamba, M.; Ishii, T. y Bannai, S. (1999). "Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins." *J. Biol. Chem.* 274: 11456-11458.
 - Sawyer, D. T. (1988). "The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HOO^{\cdot} , H_2O_2 and HOO^-) and monooxygen species (O , $O^{\cdot-}$, $\cdot OH$, and OH^-) in water and aprotic solvents". *Oxygen radicals in biology and medicine*. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press. : 11-20.
 - Schnell, N.; Krems, B. y Entian, K. D. (1992). "The PAR1 (YAP1/SNQ3) gen of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism." *Curr. Genet.* 21: 269-273.
 - Schreck, R., Rieber, P. et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kb transcription factor and HIV-1." *EMBO J.* 10: 2247-2258.
 - Setchell and Cassady (1999). "Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health." *J Nutr* 129(3) : 758S-767S
 - Sevanian A, Kim E. (1985) "Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes". *J Free Radic Biol Med.* 1(4):263-71.

- Shaban, H, Borrás, C., Viña, J. and Richter, C. (2002) "Phosphatidylglycerol potently protects human retinal pigment epithelial cells against apoptosis induced by A2E, a compound suspected to cause age-related macular degeneration" *Exp. Eye Res.* 75 (1): 99-108
- Shen, C.C. W. Wertelecki, W.J., Driggers, S.P. LeDoux and G.L. Wilson (1995) "Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells". *Mutation Research*, 337, 19-23.
- Shibutani, S., Takeshita, M. et al. (1992). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* 349: 431-434.
- Shigenaga, M. K., Gibeno, C. J. et al. (1989). "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9697-9701.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. et al. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 10771-10778.
- Shull, S.; Heintz, N. H.; Periasamy, M.; Manohar, M.; M., J. Y.; Marsh, J. P. y Mossman, B. T. (1991). "Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants." *J. Biol. Chem.* 266: 24398-24403.
- Siemankowski LM, Morreale J, Briehl MM. (1999) "Antioxidant defenses in the TNF-treated MCF-7 cells: selective increase in MnSOD". *Free Radic Biol Med.* (7-8):919-24.

-
- Sies H. (1993) "Strategies of antioxidant defense". *Eur J Biochem.* 215(2): 213-9.
 - Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." *Angewandte Chem.* 25: 1058-1071.
 - Silver MH, Jilinskaia E, Perls TT. (2001) "Cognitive functional status of age-confirmed centenarians in a population-based study". *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 56(3): P134-40.
 - Simic, M. G. (1994). "DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis." *Cancer Res.* 54: 1918s-1923s.
 - Simic, M. G. and Taylor, K. A. (1988). "Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms". *Oxygen radicals in biology and medicine.* M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press.
 - Simpkins, J. W., Rajakumar, G., Zhang, Y. Q., Simpkins, C. E., Greenwald, D., Yu, C. J., Bodor, N., and Day, A. L. (1997) "Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat". *J Neurosurg* 87(5), 724-30.
 - Sinaki M, Nwaogwugwu NC, Phillips BE, Mokri MP. (2001) "Effect of gender, age, and anthropometry on axial and appendicular muscle strength". *Am J Phys Med Rehabil.* 80(5): 330-8.
 - Slater, T. F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." *Biochem. J.* 222: 1-15.
 - Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC. (1993) "Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(15): 7255-9.

-
- Sohal, R. S. and Brunk, U. T. (1989). "Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging." *Adv. Exp. Med. Biol.* 266: 17-26.
 - Sohal, R. S. and Sohal, B. H (1991). "Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging." *Mech Ageing Dev* 57(2): 187-202.
 - Sohal R.S. and Weindruch, R. (1996) "Oxidative stress, caloric restriction and aging". *Science* 273, 59-63
 - Sohal, R. S., Sohal, B. H. et al. (1990). "Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species." *Mech Ageing Dev* 53(3): 217-27.
 - Sparrow, C. P. and Olszewski, J. (1993). "Cellular oxidation of low-density lipoprotein by thiols: Superoxide-dependent and -independent mechanisms." *J. Lipid Res.* 34: 2051-2061.
 - Stadtman ER. (1992) "Protein oxidation and aging". *Science*. 257(5074): 1220-4.
 - Stadtman, E. R. (1990). "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences." *Free Rad. Biol. Med* 9(4): 315-325.
 - Stahl W, Sies H. (1993) "Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids". *Ann N Y Acad Sci.* 691:10-9.
 - Stefano, G. B., Prevot, V., Beauvillain, J. C., Cadet, P., Fimiani, C., Welters, I., Fricchione, G. L., Breton, C., Lassalle, P., Salzet, M., and Bilfinger, T. V. (2000) "Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia". *Circulation* 101(13), 1594-7

-
- Stefano, G. B., Prevot, V., Beauvillain, J. C., Fimiani, C., Welters, I., Cadet, P., Breton, C., Pestel, J., Salzet, M., and Bilfinger, T. V. (1999) "Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor." *J Immunol* 163(7), 3758-63.
 - Stewart, J. H. (1994) "End-stage renal failure appears earlier in men than in women with polycystic kidney disease". *Am J Kidney Dis* 24(2), 181-3.
 - Süssens U, Hermans-Borgmeyer I, Borgmeyer U. (2000) "Alternative splicing and expression of the mouse estrogen receptor-related receptor gamma". *Biochem Biophys Res Commun.* 267(2): 532-535.
 - Suter M. and Richter, C. (1999) "Fragmented Mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases". *Biochemistry*, 38(1), 459-464
 - Sutherland, R. L., Hall, R. E., and Taylor, I. W. (1983) "Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells". *Cancer Res* 43(9), 3998-4006.
 - Swan PB. (1997) "To live longer, eat less!" (McCay, 1934-1939). *J Nutr.* 127(5 Suppl): 1039S-1041S.
 - Szego, C. M., and Davis, J. S. (1967) "Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen". *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(4), 1711-8.
 - Tateishi, N., Shiozaki, H. et al. (1977). "Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine." *J. Nutr.* 107: 51-58.

- Tateishi, N., T. Higashi, et al. (1974). "Studies of the regulation of glutathione level in rat liver." *J. Biochem.* 75: 90-103.
- Tchou, J. and Grollman, A. P. (1993). "Repair of DNA containig the oxidatively damaged base 8-oxoguanine." *Mutat. Res.* 299: 277-287.
- Terrádez, P., Asensi, M. et al. (1993). "Depletion of tumor glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: Modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth." *Biochem. J.* 292: 477-483.
- Thelander, L. and Reichart, P. (1979). "Reduction of ribonucleotides." *Ann. Rev. Biochem.* 48: 133-158.
- Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H. (1998) "Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance". *Proc Natl Acad Sci.* 95:3106-3110.
- Tolbert NE, Essner E. (1981) "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes". *J Cell Biol.* (3 Pt 2): 271s-283s.
- Tresguerres, J. A. F. "Fisiología Humana". 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana
- Uchida, K. and Kawakishi, S. (1993). "Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins." *FEBS.* 332(3): 208-210.
- Vance, P. G., Keele Jr., B. B. et al. (1972). "Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. Isolation and characterization of two forms of the enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 247: 4782-4786.

-
- Viña J. (editor) (1990). "Glutathione: Metabolism and Physiological Functions". CRC Pres, Boston (ISBN: 0-8493-3274-5)
 - Viña J., Hems R., Krebs H.A. (1978) "Reaction of formiminoglutamate with liver glutamate dehydrogenase". *Biochem J*; 170(3): 711-3.
 - Viña J., Sastre J., Anton V., Bruseghini L., Esteras A., Asensi M. EXS. (1992) "Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants" 62: 136-44.
 - Viña, J. R., Palacín, M. et al. (1989). "Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation." *Am. J. Physiol.* 257: E916-E922.
 - Viña, J., Hems, R. et al. (1978). "Maintenance of glutathione levels content in isolated rat hepatocytes." *Biochem J* 170(627-630).
 - Viña, J., Sáez, G. T. et al. (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." *Biochem. J.* 212: 39-44.
 - Vitorica J, Satrustegui J. (1986) "Involvement of mitochondria in the age-dependent decrease in calcium uptake of rat brain synaptosomes". *Brain Res.* 378(1): 36-48.
 - Vladimirov, Y. A. (1986). "Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences". *Free radicals, aging and degenerative diseases.* J. E. Johnson, R. Walford, D. Harman, J. Miquel and A. R. Liss: 141-195.
 - VonWowern, N., Kausen, B., Kollerup, G. (1994) "Osteoporosis: A risk factor in periodontal disease". *J. Periodontol* 64: 1134-38.

- Voogd, A., Sluiter, W. et al. (1994). "The increased susceptibility to hydrogen peroxide of the (post-)ischemic rat heart is associated with the magnitude of the low molecular weight iron pool." *Free Rad. Biol. Med.* 16(4): 453-458.
- Walford RL, Weber L, Panov S. (1995) "Caloric restriction and aging as viewed from Biosphere 2". *Receptor.* 5(1): 29-33.
- Watson, C. S., and Gametchu, B. (1999) "Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them". *Proc Soc Exp Biol Med* 220(1), 9-19
- Watts, C. K., Sweeney, K. J., Warlters, A., Musgrove, E. A., and Sutherland, R. L. (1994) "Anti-estrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells". *Breast Cancer Res Treat* 31(1), 95-105
- Wawrzak Z, Duax WL, Strong PD, Weisz J. (1988) "Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other catechol estrogens". *J Steroid Biochem.* 29(4):387-92.
- Weber P, Bendich A, Machlin LJ. (1997) "Vitamin E and human health: rationale for determining recommended intake levels". *Nutrition.* 13(5) : 450-60.
- Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. (1995) "Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein". *Proc Soc Exp Biol Med.* 208:124-130.
- Wei H, Wei L, Frenkel K, Bowen R, Barnes S. (1993) "Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein". *Nutr Cancer.* 20:1-12.

-
- Weindruch R. (1996) "Caloric restriction and aging". *Sci Am.* 274(1): 46-52.
 - Weisger, R. A. and Fridovich, I. (1973). "Superoxide dismutase: Organella specificity." *J. Biol. Chem.* 248: 3582-3591.
 - Wess L, Eastwood MA, Edwards CA, Busuttill A, Miller A. (1996) "Collagen alteration in an animal model of colonic diverticulosis". *Gut.* 38(5): 701-6.
 - Whitten, K. W., Gailey, K. D. et al. (1992). *Química General*. Méjico, Editorial McGraw-Hill.
 - Wildt L, Sir-Petermann T. (1999) "Oestrogen and age estimations of perimenopausal women". *Lancet.* 354(9174): 224.
 - Wilmoth, J.R., Deegan, L.J., Lundstrom, H., Horiuchi, S. (2000). "Increase of maximum life span in Sweden, 1861-1999". *Science.* 289:2366- 2368.
 - Wilson EA, Jawad MJ, Powell DE. (1984) "Effect of estradiol and progesterone on human chorionic gonadotropin secretion in vitro". *Am J Obstet Gynecol.* 149(2): 143-8.
 - Wilson T, March H, Ban WJ, Hou Y, Adler S, Meyers CY, Winters TA, Maher MA. (2002) "Antioxidant effects of phytoand synthetic-estrogens on cupric ion-induced oxidation of human low-density lipoproteins in vitro". *Life Sci.* 70:2287-2297.
 - Wink, D. A. and Mitchel J. B (1998). "The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic an cytoprotective mechanisms of nitic oxide." *Free Radical Biol. Med.* 25: 434-456.

-
- Wispe, J. R., Knight, M. et al. (1986). "Lipid peroxidation in newborn rabbits: Effects of oxygen, lipid emulsion and vitamin E." *Pediatr Res* 20: 505-510.
 - Wispe, J. R., Bell, E. F et al. (1985). "Assesment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbitsby measurements of expired ethane and pentane: influence of parenteral lipid infusion." *Pediatr Res* 19: 374-379.
 - Wolff, S. and Dean R. (1987). "Glucose autooxidation and protein modification. The potencial role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes." *Biochem. J.* 245: 243-250.
 - Wolff, S. P. (1993). "Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications." *Br. Med. Bull.* 49(3): 642-652.
 - Wong, S.H.; Knight, J.A.; Hopfer, S.M.; Zaharia, O.; Leach, Ch.N. Jr.; Sunderman, W. Jr. (1987). "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct". *Clin. Chem.* 33 (2): 214-220.
 - Yashpe-Purer, H. N. y Yashpe, J. (1977). "Regulation of catalase level in Escherichia Coli K12." *J. Microbiol.* 23: 84-91.
 - Yi MJ, Park SH, Cho HN, Yong Chung H, Kim JI, Cho CK, Lee SJ, Lee YS. (2002) "Heat-shock protein 25 (Hspb1) regulates manganese superoxide dismutase through activation of NFkb (NF-kappaB)". *Radiat. Res.* 158 (5): 641-9.
 - Yost, F. J. and Fridovich I. (1973). "An iron containing Superoxide dismutase from E. coli." *Journal of Biological Chemistry* 248: 2905-2908.

- Yu G.L., Bradley J.D., Attardi L.D., Blackburn E.H. (1990) “In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs”. *Nature*. 344(6262): 126-32.
- Zhao L, Cox AG, Ruzicka JA, Bhat AA, Zhang W, Taylor EW. (2000) “Molecular modeling and in vitro activity of an HIV-1-encoded glutathione peroxidase”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(12): 6356-61.
- Zyzek, E., Dufy-Barbe, L., Dufy, B., and Vincent, J. D. (1981) “Short-term effect of estrogen on release of prolactin by pituitary cells in culture”. *Biochem Biophys Res Commun* 102(4), 1151-7

