

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



EFFECTO DEL CONSUMO DE SOJA EN LA LONGEVIDAD DE RATONES OF1 MACHOS

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Kheira Mohamed Abdelaziz

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco

Prof. D. Juan Gambini Buchón

Valencia, 2013

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida del siguiente proyecto y beca:

- Ministerio de Ciencias e Innovación. Plan Nacional de I+D+I 2008-2011. Proyectos de Investigación Fundamental (113819516-19516-4-10). Titulado: Modulación de los genes de longevidad y su importancia en la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento.
- Beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID).



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. **Dña. Consuelo Borrás Blasco**, Profesora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. **D. Juan Gambini Buchón**, Profesor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **Dña Kheira Mohamed Abdelaziz**, Graduada en Nutrición Humana y Dietética por la Universidad de Alicante, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

“EFECTO DEL CONSUMO DE SOJA EN LA LONGEVIDAD DE RATONES OF1 MACHOS”

Para la obtención del título de Doctor

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

Valencia, 2013

Fdo. D. José Viña Ribes Fdo. Dña. Consuelo Borrás Blasco Fdo. D. Juan Gambini Buchón

**A MI FAMILIA EN PARTICULAR
AL PUEBLO SAHARAUI EN GENERAL**

Me haría falta el espacio equivalente a esta tesis para poderle agradecer a tanta gente, con sus nombres propios, el haberme brindado su apoyo.

Así que simplemente, de todo corazón, gracias a todos los que de alguna manera habéis hecho posible la realización de este sueño.

En definitiva, gracias a Dios “إله حمد لله” por la oportunidad y la bendición de contar con las mejores personas tanto en lo personal como en lo profesional.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LONGEVIDAD	3
1.2	EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO	7
1.2.1	Concepto de envejecimiento	7
1.2.2	Consecuencias del envejecimiento.....	9
1.3	TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.....	10
1.4	TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO	11
1.4.1	Radicales libres	12
1.4.1.1	Concepto y origen de radical libre.....	12
1.4.1.2	Clases de Radicales libres	14
1.4.2	Génesis de ROS.....	17
1.4.3	Estrés oxidativo	18
1.4.3.1	Concepto	18
1.4.3.2	Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	19
1.4.3.3	Indicadores de estrés oxidativo.....	22
1.5	TEORÍA MITOCONDRIAL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO	24
1.5.1	Historia.....	24
1.5.2	La mitocondria.....	26
1.5.2.1	La mitocondria: estructura y función.....	26
1.5.2.2	Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales	29
1.5.2.3	Otras acciones de las mitocondrias	31
1.6	ANTIOXIDANTES FISIOLÓGICOS	32

1.6.1	Antioxidantes enzimáticos	34
1.6.1.1	Superóxido dismutasa (SOD).....	34
1.6.1.2	Glutación peroxidasa (GPx).....	35
1.6.1.3	Catalasa	35
1.6.2	Antioxidantes no enzimáticos	35
1.6.2.1	Flavonoides	36
1.6.3	Efecto de los antioxidantes sobre la longevidad	37
1.7	ESTRÓGENOS	38
1.7.1	Definición, tipos y mecanismo de acción.....	38
1.7.2	Acción de los estrógenos sobre las mitocondrias.....	40
1.7.3	Propiedades antioxidantes de los estrógenos.....	41
1.7.4	Terapéutica hormonal sustitutiva.....	43
1.7.5	La doble cara de los estrógenos: efectos beneficiosos y perjudiciales	43
1.7.6	Estrógenos y longevidad	45
1.7.7	SERMs: moduladores selectivos del receptor de estrógeno	46
1.8	FITOESTRÓGENOS.....	47
1.8.1	Definición y clasificación	47
1.8.2	Isoflavonas.....	49
1.8.3	Historia.....	49
1.8.4	Epidemiología	50
1.8.5	Mecanismo de acción.....	51
1.8.6	Farmacocinética de los fitoestrógenos	53
1.8.7	Fitoestrógenos como antioxidantes.....	56

1.8.8	Potenciales efectos de los fitoestrógenos sobre la salud	57
1.8.9	Fitoestrógenos y longevidad	62
2	OBJETIVOS.....	63
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	65
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.1	MATERIALES	69
3.1.1	Animales de experimentación.....	69
3.1.2	Aparatos	71
3.1.3	Reactivos	76
3.2	MÉTODOS.....	78
3.2.1	Curva de longevidad en ratones OF1 machos.....	78
3.2.2	Control de la ingesta de comida y del peso corporal.....	78
3.2.3	Sacrificio de los animales. Extracción y conservación de muestras	79
3.2.4	Determinación de la concentración de isoflavonas en plasma.....	80
3.2.5	Aislamiento de mitocondrias hepáticas.....	83
3.2.6	Determinación del perfil metabólico en plasma y en mitocondrias hepáticas aisladas, mediante resonancia magnética nuclear (¹ H RMN).....	85
3.2.7	Determinación de la tasa de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno.....	88
3.2.8	Determinación de los niveles de peroxidación lipídica en mitocondrias hepáticas aisladas	92
3.2.9	Determinación de la concentración de proteínas.....	96
3.2.9.1	Método de Lowry.....	96

3.2.9.2	Método de Bradford	98
3.2.10	<i>Western blotting</i>	99
3.2.11	<i>Western blotting</i> de proteínas oxidadas.....	104
3.2.12	Aislamiento de RNA.....	107
3.2.13	Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR) en tiempo real.	109
3.2.13.1	Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT)	110
3.2.13.2	Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR a tiempo real).....	112
3.2.14	Actividad enzimática	117
3.2.14.1	Glutación peroxidasa.....	117
3.2.14.2	Manganeso superóxido dismutasa	120
3.2.15	Determinación del consumo de glucosa <i>in vivo</i> mediante Tomografía de Emisión de Positrones (PET)	123
3.2.16	Test de Tolerancia a la Glucosa Oral (TTGO).....	128
3.2.17	Aclaramiento hepático	129
3.2.18	Test de reconocimiento de objetos nuevos.....	130
3.2.19	Coordinación motora.....	132
3.2.20	Fuerza de agarre de los miembros anteriores.....	133
3.2.21	Análisis estadístico de los resultados	135
4	RESULTADOS.....	137
4.1	CURVA DE SUPERVIVENCIA DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA RICA O SIN SOJA.....	139
4.2	CONCENTRACIÓN DE ISOFLAVONAS EN PLASMA	142
4.3	PERFIL METABÓLICO EN PLASMA Y MITOCONDRIAS HEPÁTICAS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹ H RMN)	145

4.4	CONSUMO Y PESO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA RICA EN SOJA O SIN SOJA	147
4.5	PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA	149
4.6	NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA.....	153
4.7	PROTEÍNAS CARBONILADAS EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA	156
4.8	ANÁLISIS DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA.....	159
4.8.1	Glutación peroxidasa.....	159
4.8.1.1	Niveles del mRNA de la GPx	159
4.8.1.2	Niveles de la proteína GPx.....	161
4.8.1.3	Actividad de la enzima GPx	164
4.8.2	Superóxido dismutasa.....	166
4.8.2.1	Niveles del mRNA de MnSOD	166
4.8.2.2	Niveles de la proteína MnSOD.....	169
4.8.2.3	Actividad enzimática de MnSOD	171
4.9	DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA CEREBRAL <i>IN VIVO</i> MEDIANTE PET	173
4.10	TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL EN RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA CON O SIN SOJA.....	176
4.11	ACLARAMIENTO HEPÁTICO EN RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA	177

4.12	RECONOCIMIENTO DE OBJETOS NUEVOS DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA	179
4.13	COORDINACIÓN MOTORA DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA CON O SIN SOJA	181
4.14	FUERZA DE AGARRE DE LOS MIEMBROS ANTERIORES DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADO CON O SIN SOJA.....	182
5	DISCUSIÓN.....	183
5.1	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	185
5.2	CONCENTRACIÓN DE ISOFLAVONAS EN PLASMA	187
5.3	PERFIL METABÓLICO	188
5.4	EFEECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA LONGEVIDAD .	189
5.5	EFEECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTOS Y EL PESO CORPORAL	191
5.6	EFEECTO DE LA EDAD Y EL CONSUMO DE SOJA SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO	193
5.6.1	Efecto de la edad y el consumo de soja sobre la producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias hepáticas aisladas.....	193
5.6.2	Efecto de la edad y el consumo de soja sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias hepáticas aisladas.....	194
5.6.3	Efecto de la edad y el consumo de soja sobre la oxidación proteica en mitocondrias hepáticas aisladas.....	196
5.7	EFEECTO DE LA EDAD Y EL CONSUMO DE SOJA SOBRE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	197
5.7.1	Efecto de la edad y el consumo de soja sobre los niveles del mRNA niveles proteicos y actividad enzimática de GPx	197
5.7.2	Efecto de la edad y el consumo de soja sobre los niveles del mRNA, niveles proteicos y actividad enzimática de MnSOD	198

5.8	EFFECTO DE LA EDAD Y LA SOJA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i>	200
5.9	EFFECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA FUNCIÓN HEPÁTICA	201
5.9.1	Efecto de la edad y la soja sobre la tolerancia a la glucosa	201
5.9.2	Efecto del consumo de soja sobre la función hepática	202
5.10	EFFECTO DE LA EDAD Y EL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE.....	203
5.11	EFFECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA COORDINACIÓN MOTORA Y FUERZA MUSCULAR	204
5.12	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	205
6	SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION	207
6.1	BACKGROUND AND JUSTIFICATION OF STUDY	209
6.2	PLASMA CONCENTRATION OF ISOFLAVONES.....	210
6.3	METABOLIC PROFILE BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (¹ H NMR)	213
6.4	THE EFFECT OF LIFELONG SOYA FEEDING ON LONGEVITY.....	216
6.5	FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT.....	217
6.6	EFFECT OF AGING AND SOYA INTAKE ON OXIDATIVE DAMAGE	220
6.6.1	Hydrogen peroxide production by isolated liver mitochondria.....	221
6.6.2	Oxidative damage to macromolecules	223
6.7	EFFECT OF AGING AND SOYA INTAKE ON ANTIOXIDANT DEFENSE.....	229
6.7.1	Glutathione peroxidase.....	230
6.7.2	Manganese superoxide dismutase.....	235

6.8	EFFECT OF AGING AND SOYA CONSUMPTION ON GLUCOSE UPTAKE BY THE BRAIN <i>IN VIVO</i>	240
6.9	EFFECT OF SOYA ON GLUCOSE TOLERANCE AND HEPATIC FUNCTION.....	243
6.9.1	Oral glucose tolerance	243
6.9.2	Hepatic function.....	245
6.10	BEHAVIORAL AND MOTOR FUNCTION TESTING.....	246
6.10.1	Novel objects recognition	246
6.10.2	Motor coordination and grip strength	247
6.11	LIMITATIONS OF THE STUDY.....	249
7	CONCLUSIONES	251
7.1	CONCLUSIÓN GENERAL.....	253
7.2	CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....	253
8	CONCLUSIONS	255
8.1	MAIN CONCLUSION.....	257
8.2	SPECIFIC CONCLUSIONS	257
9	ANEXOS	259
9.1	ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	261
10	BIBLIOGRAFÍA	265

ÍNDICE DE TABLAS

1 INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1.- Vida media de radicales libres.....	13
Tabla 1.2.- Especies activadas del oxígeno y nitrógeno.	14
Tabla 1.3.- Tipos de SOD y localización celular mayoritaria.	34
Tabla 1.4.- Clasificación y origen de los principales fitoestrógenos.....	48

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1.- Composición de las dietas.....	70
Tabla 3.2.- Resumen del procesamiento de los animales de la curva de longevidad.....	78
Tabla 3.3.- Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.	91
Tabla 3.4.- Descripción de los anticuerpos utilizados para <i>Western blotting</i>	104
Tabla 3.5.- Secuencia de los oligos utilizados en la RT-PCR.	115
Tabla 3.6.- Condiciones del termociclador para la RT-PCR.	116
Tabla 3.7.- Recta estándar de la SOD.	122

4 RESULTADOS

Tabla 4.1.1.- Concentración de genisteína, daidzeína y equol en plasma de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.....	143
Tabla 4.1.2.- Concentración total de genisteína, daidzeína y equol en plasma de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.....	144

6 SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSION

Table 6.1.1.- Concentration of isoflavones in plasma of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	211
Table 6.1.2.- Total concentration of isoflavones in plasma of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.....	212

ÍNDICE DE FIGURAS

1 INTRODUCCIÓN

Figura 1.1.- Modificada de CUTLER RG (1990).....	4
Figura 1.2.- Perfil de supervivencia en distintas especies (Kaeberlein et al., 2001).....	6
Figura 1.3.- Teorías del envejecimiento. Clasificación (Vina et al., 2007a)	10
Figura 1.4.- Control de la longevidad por el estrés oxidativo mitocondrial (Sastre et al., 2003).....	25
Figura 1.5.- Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.	28
Figura 1.6.- Control respiratorio mitocondrial.	30
Figura 1.7.- Estructura básica de los flavonoides.	37
Figura 1.8.- Distribución de receptores estrogénicos (Setchell et al., 1999).	40
Figura 1.9.- Mecanismo de acción propuesto por Borrás et al (Borras et al., 2005).....	42
Figura 1.10.- Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos.....	44
Figura 1.11.- Modulador selectivo ideal del receptor estrogénico.	46
Figura 1.12.- Similitud estructural entre el 17 β -estradiol y la isoflavona genisteína.	48
Figura 1.13.- Estructura química de las tres principales isoflavonas y sus conjugados. .	54
Figura 1.14.- Mecanismo de sobre-expresión de genes antioxidantes por fitoestrógenos.	57

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1.- Esquema de detección de peróxido de hidrógeno.....	88
Figura 3.2.- Esquema de <i>western blotting</i>	103
Figura 3.3.- Modelo de amplificación de PCR a tiempo real.....	114
Figura 3.4.- Esquema del ensayo Superóxido Dismutasa.	120
Figura 3.5.- Molécula de ¹⁸ F-FDG y esquema de su consumo en la célula.	124
Figura 3.6.- Esquema de detección de coincidencias por el equipo PET-CT Albira ARS.	125
Figura 3.7.- Test de reconocimiento de objetos nuevos.	130
Figura 3.8.- Coordinación motora.	132
Figura 3.9.- Test de fuerza de agarre.	134

4 RESULTADOS

Figura 4.1.- Curva de longevidad de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja o sin soja.	141
Figura 4.2.1.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metaboloma del plasma de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.	146
Figura 4.2.2.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metaboloma de las mitocondrias hepáticas de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.	147
Figura 4.3.- Diferencias en la ingesta semanal de ratones que consumen dieta rica en soja o sin soja.	148
Figura 4.4.- Diferencias en el peso de los ratones alimentados con o sin soja.	149
Figura 4.5.1.- Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta sin soja.	151
Figura 4.5.2.- Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta rica en soja.	151
Figura 4.5.3.- Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con y sin soja.	152
Figura 4.6.1.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta sin soja.	153
Figura 4.6.2.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta rica en soja.	154
Figura 4.6.3.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con y sin soja.	155
Figura 4.7.1.- Proteínas carboniladas en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta sin soja.	157
Figura 4.7.2.- Proteínas carboniladas en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta rica en soja.	157
Figura 4.7.3.- Proteínas carboniladas en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con y sin soja.	158

Figura 4.8.1. a.- Niveles del mRNA de la GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja..... 160

Figura 4.8.1. b.- Niveles del mRNA de la GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja. 160

Figura 4.8.1. c.- Niveles del mRNA de la GPx en hígado de ratones OF1 machos..... 161

Figura 4.8.2. a.- Niveles de la proteína GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja. 162

Figura 4.8.2. b.- Niveles de la proteína GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja. 162

Figura 4.8.2. c.- Niveles de la proteína GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja. 163

Figura 4.8.3. a.- Actividad enzimática de GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja. 164

Figura 4.8.3. b.- Actividad enzimática de GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja. 164

Figura 4.8.3. c.- Actividad enzimática de GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja. 165

Figura 4.8.4. a.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja. 166

Figura 4.8.4. b.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja. 167

Figura 4.8.4. c.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos. 168

Figura 4.8.5. a.- Niveles de la proteína MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja. 169

Figura 4.8.5. b.- Niveles de la proteína MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja. 169

Figura 4.8.5. c.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos. 170

Figura 4.8.6. a.- Actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.....	171
Figura 4.8.6. b.- Actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.....	172
Figura 4.8.6. c.- Actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.....	172
Figura 4.9.1.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.....	174
Figura 4.9.2.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.....	175
Figura 4.9.3.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.....	175
Figura 4.10.1.- Test de Tolerancia a la Glucosa Oral en ratones OF1 machos alimentados con dieta rica o sin soja.....	176
Figura 4.10.2.- Test de Tolerancia a la Glucosa Oral en ratones OF1 machos alimentados con dieta rica o sin soja.....	177
Figura 4.11.- Tiempo de parálisis muscular con Zoxazolamina de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica o sin soja.....	178
Figura 4.12.1.- Reconocimiento de objetos nuevos a la hora.....	180
Figura 4.12.2.- Reconocimiento de objetos nuevos a las 24 horas.....	180
Figura 4.13.- Coordinación motora de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.....	181
Figura 4.14.- Test de fuerza de agarre de los miembros anteriores.....	182

6 SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSION

Figure 6.1.1.- Scores plot for the Principal Components Analysis of NMR spectra of plasma of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet	214
Figure 6.1.2.- Scores plot for the Principal Components Analysis of NMR spectra of hepatic mitochondria of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.....	215
Figure 6.2.- The survival curve of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	216
Figure 6.3.- Differences in weekly food intake between male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.....	218
Figure 6.4.- Differences in body weight between male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet	219
Figure 6.5.1.- Hydrogen peroxide production in isolated mitochondria from liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.....	222
Figure 6.5.2.- Hydrogen peroxide production in isolated mitochondria from liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.....	222
Figure 6.5.3.- Hydrogen peroxide production in isolated mitochondria from liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.....	223
Figure 6.6.1.- Lipid peroxidation levels (MDA) in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free diet.....	225
Figure 6.6.2.- Lipid peroxidation levels (MDA) in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-rich diet.....	225
Figure 6.6.3.- Lipid peroxidation levels (MDA) in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.....	226
Figure 6.7.1.- Protein carbonylation in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free diet.	227
Figure 6.7.2.- Protein carbonylation in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-rich diet.	227
Figure 6.7.3.- Protein carbonylation in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.....	228

Figure 6.8.1. a.- mRNA levels of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.	230
Figure 6.8.1. b.- mRNA levels of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.	231
Figure 6.8.1. c.- mRNA levels of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	233
Figure 6.8.2. a.- Protein expression of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.	231
Figure 6.8.2. b.- Protein expression of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.	232
Figure 6.8.2. c.- Protein expression of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	234
Figure 6.8.3. a.- Enzymatic activity of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.	232
Figure 6.8.3. b.- Enzymatic activity of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.	233
Figure 6.8.3. c.- Enzymatic activity of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	234
Figure 6.8.4. a.- mRNA levels of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.	235
Figure 6.8.4. b.- mRNA levels of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.	236
Figure 6.8.4. c.- mRNA levels of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	236
Figure 6.8.5. a.- Protein expression of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.	237
Figure 6.8.5. b.- Protein expression of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.	237
Figure 6.8.5. c.- Protein expression of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	239

Figure 6.8.6. a.- Enzymatic activity of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.	238
Figure 6.8.6. b.- Enzymatic activity of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.	238
Figure 6.8.6. c.- Enzymatic activity of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	239
Figure 6.9.1.- <i>in vivo</i> brain glucose uptake of male OF1 mice fed with soya-free diet.	241
Figure 6.9.2.- <i>in vivo</i> brain glucose uptake of male OF1 mice fed with soya-rich diet.	241
Figure 6.9.3.- <i>in vivo</i> brain glucose uptake of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.	242
Figure 6.10.1.- Blood glucose curves during OGTT in male OF1 mice fed with soya-free and soya-rich diet, at 50% survival.	244
Figure 6.10.2.- Blood glucose curves during OGTT in male OF1 mice fed with soya-free and soya-rich diet, at 10% survival.	244
Figure 6.11.- Time of recovery from the muscular paralysis male OF1 mice fed with soya-free and soya-rich diet.	245
Figure 6.12.1.- Percentage of visits in NOR test after 1 hour.	246
Figure 6.12.2.- Percentage of visits in NOR test after 24 hours.	247
Figure 6.13.- Muscular coordination in male OF1 mice fed soya-free diet o soya-rich diet.	248
Figure 6.14.- Grip strength in male OF1 mice fed soya-free diet o soya-rich diet.	248

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LONGEVIDAD

El término longevidad hace referencia a la esperanza de vida que tienen los individuos de una determinada especie al nacer. Éste incluye dos conceptos diferentes: longevidad media y longevidad máxima (Lopez-Torres et al., 1991). La longevidad media corresponde a un dato estadístico en el cual el 50% de la población permanece viva y la longevidad máxima corresponde a la edad del individuo más longevo de dicha especie.

Si nos referimos a la especie humana vemos que, mientras la longevidad máxima ha permanecido sustancialmente sin cambio durante los últimos 100.000 años (en ~125 años), la longevidad media ha aumentado sensiblemente (~27 años a lo largo del siglo pasado) especialmente en los países occidentales (Hayflick 2000). Este aumento en la vida media, figura 1.1, se debe principalmente, a los hábitos saludables, la adecuada nutrición e higiene, el diagnóstico precoz de enfermedades y el descubrimiento de los antibióticos y las vacunas (Hayflick 2000).

Como consecuencia de ello se ha producido un crecimiento del segmento poblacional de avanzada edad, hecho por el que cobran gran importancia actual las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, los cánceres, la aterosclerosis, y en general, todas aquellas enfermedades que afectan con más probabilidad a este sector de la población.

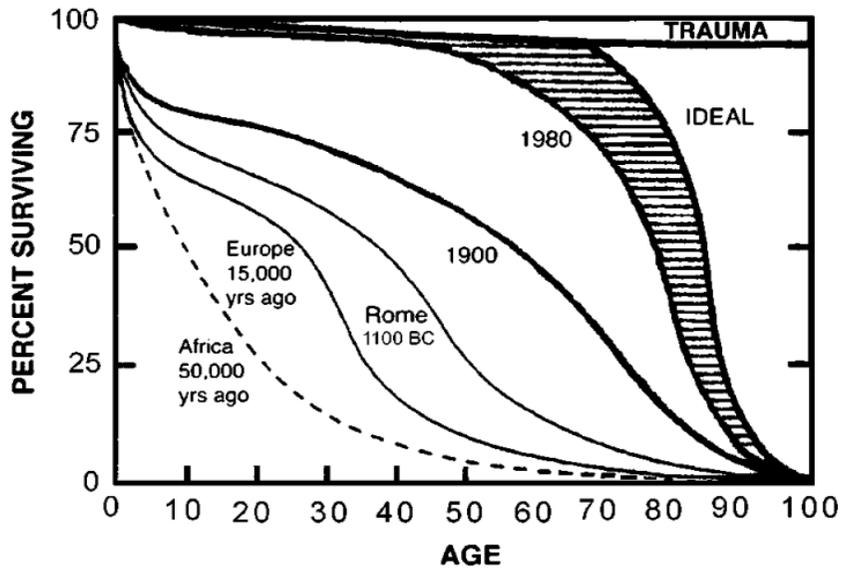


Figura 1.1.- Modificada de CUTLER RG (1990).

En este sentido, desde que el hombre es consciente de su evolución ha intentado prolongar su vida e incluso inmortalizarla. Sin embargo, una vez desechada la quimera de la inmortalidad, se ha centrado en el objetivo de incrementar su supervivencia con mejores condiciones físicas y mentales.

Hasta la actualidad, existen tres regímenes conocidos que pueden incrementar la expectativa de vida animal: (1) disminución de la temperatura ambiente en poiquiloterms (animales de sangre fría) y mamíferos que hibernan y (2) una disminución de la actividad física en los poiquiloterms, ambos disminuyen la tasa metabólica, y (3) la restricción calórica (Sohal et al., 1996; Lee et al., 1999). De modo que un descenso de un 10% de la temperatura ambiente, o bien la eliminación de la capacidad de vuelo en la mosca común, incrementan la expectativa de vida en un 2.5 veces (Farmer et al., 1987). Ambas modificaciones consiguen rebajar el consumo metabólico y se acompañan de un descenso en la producción de radicales libres y del daño oxidativo que puedan sufrir las proteínas y el DNA.

Respecto a la restricción calórica, ya en 1934, McCay y colaboradores, revisado por Swan en 1997 (Swan 1997), describen este fenómeno. Más recientemente, Weindruch y Walford en 1982 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 no llegue a la desnutrición, manteniéndose unos niveles adecuados de vitaminas, minerales y proteínas (Weindruch et al., 1982; Colman et al., 2009). Los animales sometidos a la restricción calórica, siempre y cuando no presenten ningún déficit en macro ni micronutrientes, ven incrementada su supervivencia hasta en un 50% en ratones, y en primates produce una reducción de la temperatura corporal y del gasto energético (Walford et al., 1995; Weindruch 1996b; Bordone et al., 2005). La restricción calórica también podría reducir la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, atrofia cerebral, deficiencias inmunitarias en los monos Rhesus (Roth et al., 2004; Colman et al., 2009).

Un estudio reciente realizado por el grupo de Rafael de Cabo rechaza el efecto beneficioso de la restricción calórica sobre la longevidad, al menos en monos Rhesus. No obstante, sí destaca sus efectos positivos sobre parámetros asociados con enfermedades típicas del envejecimiento, como las metabólicas (diabetes, obesidad), las cardiovasculares y el cáncer (Mattison et al., 2012).

Posibles razones de la variación en el efecto de la restricción calórica sobre la longevidad de los monos son la composición de la dieta y la genética de los monos estudiados (Mattison et al., 2012).

Los investigadores que estudian la restricción calórica en ratones se han acostumbrado a resultados contradictorios, que atribuyen a la diversidad genética entre las cepas (Harper et al., 2006).

Así, cabe destacar que existen factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar a las diferentes longevidades entre individuos. De modo que los factores extrínsecos afectarían principalmente a la vida media, por ejemplo un hábito de vida saludable está correlacionado con una mayor probabilidad de

supervivencia. Sin embargo, en la vida máxima están más implicados los factores intrínsecos, eso lo podemos observar en la figura 1.2 que representa la supervivencia como un parámetro específico de cada especie, en el que claramente existe una implicación genética que explicaría las diferentes tasas de supervivencia.

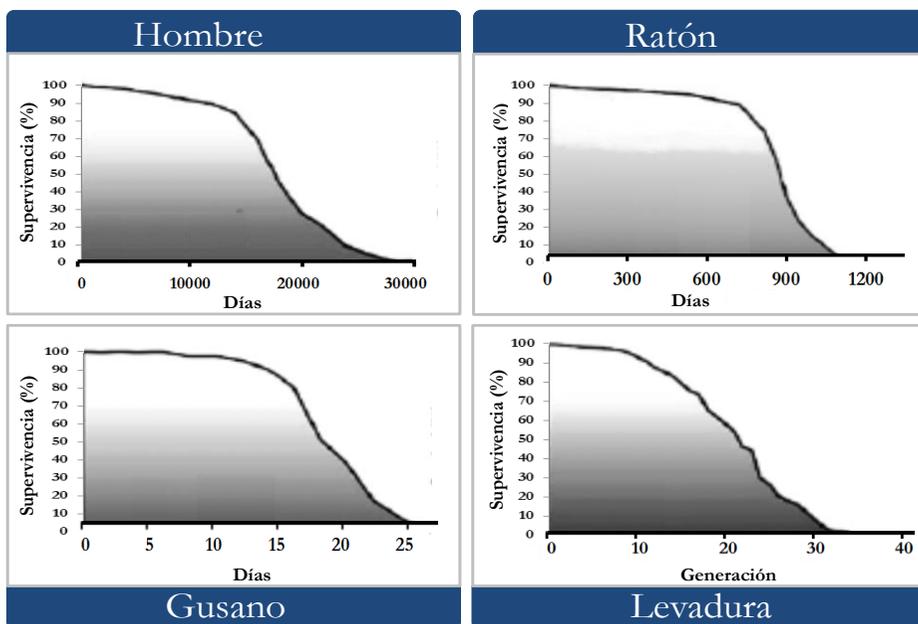


Figura 1.2.- Perfil de supervivencia en distintas especies (Kaeberlein et al., 2001).

Incluso, dentro de la misma especie el factor genético es el que condiciona la respuesta del individuo frente a las influencias exógenas, conduciendo a una mayor predisposición frente a patologías y finalmente la muerte, determinando así la longevidad del individuo (Ginaldi et al., 2000). De ahí la idea de que la alteración de la homeostasia en el organismo envejecido es una consecuencia genética.

No obstante, aunque en un principio el componente genético recibió la mayor atención en las diferencias de longevidad entre individuos (Begun et al., 2000), los mecanismos epigenéticos han emergido contribuyendo claramente a

las alteraciones de la estructura y función del genoma que acompañan al envejecimiento (Gonzalo 2010).

En nuestro laboratorio observamos que las hembras en muchas especies, como ratas o humanos, viven más que los machos debido a que el estrógeno induce la sobre-expresión de genes asociados a la longevidad (Vina et al., 2005b).

1.2 EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

1.2.1 Concepto de envejecimiento

Hasta el momento no existe una definición única ampliamente aceptada para este término. Denham Harman (Harman 1981) lo define como la acumulación de diversos cambios deletéreos que ocurren en las células y los tejidos con la edad avanzada que son responsables del aumento del riesgo de la enfermedad y la muerte. Las principales teorías del envejecimiento son específicas de una causa en particular, proporcionando información útil e importante para la comprensión de los cambios fisiológicos relacionados con la edad. Sin embargo, una visión global de ellas es necesaria al debate de un proceso que todavía está oscuro en algunos de sus aspectos. En este contexto, la búsqueda de una única causa del envejecimiento ha sido sustituida por el punto de vista del envejecimiento como un proceso extremadamente complejo y multifactorial. Por lo tanto, las diferentes teorías del envejecimiento no deben considerarse como mutuamente excluyentes, sino complementarias entre sí en la explicación de algunas o todas las características del proceso normal de envejecimiento.

Según Bernard Strehler (Strehler 1985), reconocido gerontólogo americano, el envejecimiento normal se define 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.

Antes de examinar los factores biológicos en la hipótesis de base del proceso de envejecimiento, es fundamental subrayar que el envejecimiento no es una enfermedad. Con base en este supuesto, Hayflick estima que una posible cura de las principales causas de muerte en la tercera edad (como son, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, cáncer) sólo llevaría a un aumento de 15 años de la esperanza de vida humana (Hayflick 2000). Por lo tanto, incluso en esta condición hipotética, no vamos a ser inmortales, pero tal vez seremos capaces de experimentar cómo la muerte se produce en ausencia de la enfermedad. Debido a que el envejecimiento se asocia negativamente con la capacidad de responder al estrés, y positivamente relacionado con el desequilibrio homeostático y la incidencia de la patología, la muerte sigue siendo la última consecuencia del envejecimiento (Kowald et al., 1996).

La idea de que envejecer requiere tratamiento se basa en la creencia de que ser viejo no es deseable. En las últimas décadas, el envejecimiento ha recibido una connotación negativa y convertida en sinónimo de deterioro, acercándose a la patología, y la muerte. Si nuestra sociedad aprendiese a valorar la vejez a la misma medida que llevan a cabo actualmente para la juventud, la

investigación dirigida a frenar, detener o revertir el proceso de envejecimiento sería tan impensable como la intervención en los procesos de desarrollo de la juventud. En su lugar, lo que es deseable y posible demostrar en todo momento en la vida, es la prevención o resolución de la patología (Hayflick 2004).

1.2.2 Consecuencias del envejecimiento

El proceso de envejecimiento se acompaña de una disminución de la capacidad para mantener la homeostasis con una pérdida progresiva de rendimiento de cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, provocando una mayor vulnerabilidad, que conlleva finalmente al fallecimiento del organismo (Hayflick 1998; de Magalhaes 2005).

Por ejemplo, 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 (Terman et al., 2010). 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 (Naylor et al., 2011).

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 (Alonso-Fernandez et al., 2011).

En definitiva, 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 (Gilad et al., 1995).

1.3 TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Hay muchas teorías que tratan de explicar el complejo proceso de envejecimiento (ver Figura 1.3) (Vina et al., 2007a). En 1990, Medvedev (Medvedev 1990), en una excelente revisión indicó que había más de 300 teorías del envejecimiento y el número va en aumento. En dicha revisión, Medvedev afirmaba lo siguiente: “casi cada descubrimiento importante en biología celular y molecular ha dado lugar a una nueva familia de teorías del envejecimiento o nuevas versiones avanzadas de teorías más antiguas”.

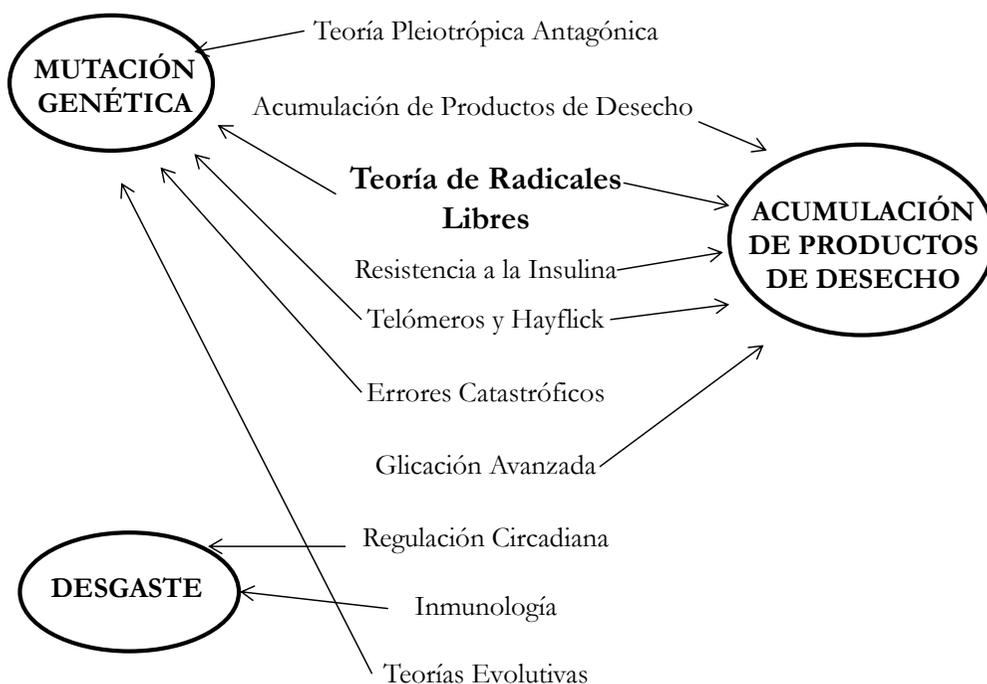


Figura 1.3.- Teorías del envejecimiento. Clasificación (Vina et al., 2007a)

Sin embargo, ninguna ha sido generalmente aceptada por los gerontólogos. Por lo contrario, están de acuerdo con la conclusión de Medvedev de que no es realista la expectativa de que surja una teoría “verdaderamente unificada”, o “causa única” del envejecimiento (Medvedev 1990).

Así, la actual investigación gerontológica incluye desde el análisis de las curvas de supervivencia de las poblaciones y la pérdida de rendimiento de los sistemas fisiológicos hasta un creciente interés en los mecanismos del control genético del envejecimiento y su relación con la longevidad.

El desarrollo de la presente tesis, se sustenta principalmente en la Teoría de envejecimiento por los Radicales Libres, por ello nos centraremos en la misma.

1.4 TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO

La Teoría de los Radicales Libres enunciada por Denham Harman en 1956 (Harman 1956), propone que los radicales libres derivados de oxígeno son los responsables del daño oxidativo que se produce con la edad a nivel celular y tisular. 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.

En su interpretación más estricta, esta teoría predice que una reducción del estrés oxidativo, sea mediante la reducción de la carga prooxidante o el aumento de las defensas antioxidantes, o alguna combinación de ambas, deberían aumentar la vida útil (Salmon et al., 2010).

Existen muchas pruebas experimentales a favor de esta teoría. Los animales viejos presentan mayores índices de oxidación (se acumulan proteínas oxidadas, formas oxidadas del DNA y de lípidos) que los jóvenes (Stadtman 1992; Sohal et al., 1993; Hamilton et al., 2001; Bokov et al., 2004). En principio, esto podría atribuirse a una tasa mayor de radicales libres generados por los organismos viejos.

También, a favor de esta teoría son los descubrimientos de numerosos estudios realizados en diversos organismos, que sugieren que la reducción del estrés oxidativo o el aumento de la resistencia al mismo, están relacionados con la prolongación de la vida (Harman 1978; Miquel et al., 1979; Harrington et al., 1988; Phillips et al., 1989; Orr et al., 1994; Parkes et al., 1998; Finkel et al., 2000; Melov et al., 2000; Ruan et al., 2002; Ishii et al., 2004; Huang et al., 2006; Zou et al., 2007; Kim et al., 2008; Quick et al., 2008; Dai et al., 2009; Shibamura et al., 2009).

A pesar de que la teoría de radicales libres está dentro de las más estudiadas y aceptadas de todas las hipótesis del mecanismo de envejecimiento, varios estudios han generado ambigüedad y controversia de la misma (Muller et al., 2007; Perez et al., 2009a; Perez et al., 2009b; Lapointe et al., 2010; Salmon et al., 2010). Por ejemplo, la gran mayoría de los estudios en ratones no muestran ningún cambio en la vida útil después del incremento o reducción de enzima antioxidante (Huang et al., 2000; Perez et al., 2009b). Tampoco ha sido demostrado que prolongue la vida en ensayos clínicos en humanos, a los que se les administraba sustancias antioxidantes (Howes 2006; Bjelakovic et al., 2007)

Para entender la Teoría de los Radicales Libres en el Envejecimiento pasamos, a continuación, a definir algunos conceptos y términos básicos.

1.4.1 Radicales libres

1.4.1.1 Concepto y origen de radical libre

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia (Halliwell et al., 1989), esto hace que estas especies presenten una gran reactividad. Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida media es normalmente muy corta. La tabla 1.1 muestra ejemplos de la vida media de algunos radicales libres.

Radical	Sustrato	Concentración	Vida media (a 37°C)
HO [•]	LH ^C	1 M	10 ⁻⁹ seg.
RO [•]	LH	100 mM	10 ⁻⁶ seg.
ROO [•]	LH	1 mM	7 seg.
L [•]	O ₂	20 μM	10 ⁻⁸ seg.
Q [•]		-	Días

Tabla 1.1.- Vida media de radicales libres.

Estas especies químicas son abundantes en los sistemas vivos. Es más, algunos autores, como Denham Harman en su estudio sobre el origen y evolución de la vida, proponen a los radicales libres como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta (Harman 2001).

En la naturaleza los radicales libres son mayoritariamente compuestos derivados del oxígeno y se denominan especies reactivas del oxígeno (ROS). Aunque también existen otras especies radicales no derivadas del oxígeno que están tomando interés en los últimos años, como las derivadas del nitrógeno (RNS).

El oxígeno, por una parte da origen a la vida y por otra, por su capacidad de formar distintos radicales libres, es capaz de dañar estructuras esenciales para el desarrollo de ésta, tales como DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos (Sies 1983; Gutteridge 1995; Dean et al., 1997; Cadenas et al., 1998). Además, los radicales libres intervienen en procesos fisiopatológicos como la diabetes y algunos tipos de cáncer (Takada et al., 1982; Okamoto 1985; Klaunig et al., 2004). También intervienen en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Harman 1956) y el ejercicio físico agotador (Davies et al., 1982; Sastre et al., 1992).

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 1.2). 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	O_2^{\bullet}
Radical hidroperoxido	HO_2
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^{\bullet}
Radical alóxido	RO^{\bullet}
Radical peroxilo	ROO^{\bullet}
Óxido nítrico	NO^{\bullet}
Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}

Tabla 1.2.- Especies activadas del 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, entre otros. Éste último es producto de formación de una multitud de reacciones en las que participan los cuatro primeros compuestos mencionados.

1.4.1.2 Clases de radicales libres

Como se ha mencionado antes, existen muchas clases de radicales libres, tanto especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) como las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Algunos de los radicales libres más importantes son:

- Anión superóxido (O_2^{\bullet})
- Radical hidroxilo (OH^{\bullet})

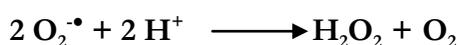
- Radical peroxilo (ROO^\bullet)
- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- Óxido nítrico (NO^\bullet)
- Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet)
- Radicales de átomos derivados de carbono (R^\bullet)
- Radicales de átomos derivados de azufre (RS^\bullet)

Dada su relación con la presente tesis sólo destacaré a los dos primeros y al peróxido de hidrógeno que aunque no sea radical libre sí es especie reactiva de oxígeno.

a) Anión superóxido (O_2^\bullet)

Estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en reacciones catalizadas enzimáticamente, como producto en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (Korycka-Dahi et al., 1981), en las oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.), también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña et al., 1983) o la riboflavina (Barton et al., 1970). Asimismo en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris et al., 1972), siendo potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos.

Se ha estimado que una célula del cuerpo humano produce alrededor de unas 10^{10} moléculas de anión superóxido por día (Ames et al., 1993). Sin embargo, el 99% de las moléculas que se producen se dismutan hacia peróxido de hidrógeno (Cheeseman et al., 1993).



b) Radical hidroxilo (OH[•])

Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} s (Liochev et al., 1994). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal. 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. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton (Fenton 1894).



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss (Haber et al., 1934).



Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre.

c) Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

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 activa de las especies reactivas del oxígeno. Su importancia recae en el hecho de que atraviesa fácilmente 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 O_2^\bullet (Cheeseman et al., 1993; Frei 1994).
- Como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) (Fridovich 1986).
- Por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahi et al., 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 NF κ B y AP-1. Ambos son factores de transcripción capaces de inducir la transcripción de genes tales como el de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) (Yi et al., 2002), interleukina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos (Schreck et al., 1994).

1.4.2 Génesis de ROS

Las especies reactivas de oxígeno pueden producirse de forma endógena o exógena (Freeman et al., 1982; Frei 1994).

Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O_2^\bullet y H_2O_2 (Halliwell 1991).

La vía exógena incluye a los radicales libres procedentes de fuentes externas tales como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), xenobióticos, el ozono, el humo del tabaco, la polución ambiental, iones, metales y radiación. (Ames 1983; Cadenas 1989; Valko et al., 2006).

Mientras que la vía endógena incluye la reacción de Fenton-Haber-Weiss, microsomas o peroxisomas, la membrana plasmática, enzimas solubles y proteínas, los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico, metabolismo del citocromo P450, activación de células inflamatorias y la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Inoue et al., 2003).

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en el interior de la célula. Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de ATP.

Este sistema enzimático se comentará detalladamente en el capítulo 1.5 de la introducción de la presente tesis.

1.4.3 Estrés oxidativo

1.4.3.1 Concepto

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies 1985).

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, ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular (Slater 1984). Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes.

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.

Como consecuencia de lo mencionado anteriormente, se sabe que el estrés oxidativo conlleva consigo daños a las biomoléculas, principalmente lípidos, proteínas y DNA (Bokov et al., 2004).

1.4.3.2 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

a) Daño oxidativo a lípidos

Los lípidos son el componente principal de las membranas biológicas y pueden influir en muchos procesos biológicos que afectan a la supervivencia celular.

El daño oxidativo a lípidos puede ocurrir directamente a través de la reacción directa con ROS o indirectamente por la interacción con aldehídos reactivos.

Los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman et al., 1993), siendo el radical hidroxilo (HO^\bullet), el peróxido (ROO^\bullet), el alcoxilo (RO^\bullet) y el alquílico (R^\bullet) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos.

El proceso de ataque oxidativo a lípidos, denominado peroxidación lipídica, 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 (Halliwell 1994; Krinsky 1994). Esta reacción se produce

preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman et al., 1982; Halliwell 1991; Cheeseman et al., 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 (Krinsky 1994). La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas y en la disminución de la fluidez de las membranas celulares (Lippman 1985; Shigenaga et al., 1994; Spiteller 2002).

En una revisión realizada por Hulbert y colaboradores, observan un incremento de la peroxidación lipídica con la edad y la susceptibilidad de los lípidos a la peroxidación en relación con la composición de la membrana en varias especies de vertebrados (Hulbert et al., 2007).

b) Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas llevan a cabo importantes funciones biológicas y son las macromoléculas más abundantes presentes en las células. La oxidación de proteínas por ROS u otras especies reactivas, conduce a la fragmentación de las cadenas polipeptídicas, oxidación de cadenas laterales de aminoácidos, y/o generación de enlaces cruzados proteína-proteína (Stadtman 2006).

Se calcula que casi un tercio de las proteínas celulares, tanto enzimas como proteínas estructurales, de los animales viejos son disfuncionales como consecuencia del daño oxidativo (Poon et al., 2004).

Por ello, la estimación de la oxidación proteica, ligada a una variedad de modificaciones en los aminoácidos, podría ser un factor importante a la hora de predecir el proceso de envejecimiento y las enfermedades asociadas a éste. Una revisión detallada de las modificaciones de los distintos aminoácidos alterados, los métodos específicos para determinarlos y el impacto que provocan en el metabolismo celular ha sido realizada por Requena et al (Requena et al., 2003) y por Stadtman y Levine (Stadtman et al., 2003).

El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean et al., 1993).

c) Daño oxidativo al DNA

El DNA también es susceptible al daño oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del DNA formándose radical peroxilo. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el DNA dan lugar a un gran número de productos.

La alteración de este tipo que más se observa es la 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-oxodG). Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones G-T (Kasai et al., 1984). La cantidad del nucleósido 8-hidroxi- 2'desoxiguanosina se utiliza como índice del daño oxidativo al DNA (Barja et al., 2000).

El daño oxidativo asociado a proteínas y DNA no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el DNA, 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 et al., 1991; Breen et al., 1995). Por ello, las lesiones oxidativas al DNA parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular (Fraga et al., 1990), sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada (Cui et al., 2012). Sin embargo, otros investigadores no han detectado un incremento en la oxidación

del DNA (8-oxodG) con la edad, ni en roedores (Anson et al., 1999) ni en personas ancianas (Sacheck et al., 2003).

El DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Viguie et al., 1993). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones, algunas se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Viguie et al., 1993).

El DNA mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter et al., 1988; Linnane et al., 1989), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del DNA (Donald et al., 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Shen et al., 1995; Suter et al., 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi et al., 1993). 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 et al., 1989; Ames et al., 1993) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante (Zastawny et al., 1998).

1.4.3.3 Indicadores de estrés oxidativo

Como ya hemos podido observar, el estrés oxidativo es de gran importancia para las células y el organismo por el daño que éste puede causar. Por lo que se han intentado encontrar indicadores que determinen el daño que este estrés oxidativo puede causar a nivel general (citósol) o en particular a nivel de lípidos, DNA o proteínas. Los principales indicadores son: el cociente GSSG/GSH para determinar el daño en el citósol, MDA como indicador de daño a los lípidos, el 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina como índice de daño oxidativo al DNA y los grupos carbonilos como un indicador de daño oxidativo a proteínas (Hageman et al., 1992).

En la presente tesis se detallará con mayor profundidad los dos siguientes, por ser objetivos de nuestro estudio.

a) Malondialdehído (MDA)

El malondialdehído es un indicador de daño oxidativo a lípidos. Se han descrito varios métodos de detección (Bird et al., 1984; Esterbauer et al., 1991), pero la mayoría son poco específicos ya que detectan todos los aldehídos de la muestra al utilizar el ácido triobarbitúrico. Gracias al desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución, se consigue la separación del aducto malondialdehído-ácido triobarbitúrico de otras sustancias que pueden interferir en la determinación (Knight et al., 1988).

En la presente tesis se ha medido el MDA ya que numerosos estudios revelan su incremento con el envejecimiento (Inal et al., 2001; Sverko et al., 2002; Mutlu-Turkoglu et al., 2003; Gil et al., 2006).

b) Grupos carbonilo

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como la lisina, la prolina y la 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 1992; Dalle-Donne et al., 2003). Otros aminoácidos como la histidina, la cisteína y la metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadtman 1992).

Entre todos los tipos de modificaciones debidos a la oxidación proteica, las proteínas carboniladas son las más frecuentes (Dean et al., 1997).

Por ello, se ha propuesto su cuantificación como un buen método para valorar el daño oxidativo proteico y su correlación con el envejecimiento y la severidad de algunas enfermedades (Stadtman 1992).

Este daño se puede determinar mediante dos métodos: marcaje con borohidruro de sodio tritiado o mediante la reacción con fenilhidrazinas. 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 et al., 1987; Lewisch et al., 1995); o también se puede realizar un *Western blotting* de proteínas oxidadas, una vez derivatizadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

1.5 TEORÍA MITOCONDRIAL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO

1.5.1 Historia

Harman sugirió en 1972 que las mitocondrias podrían ser el reloj biológico en el envejecimiento, ya que el consumo de oxígeno parece determinar la velocidad a la que se acumula el daño mitocondrial producido por las reacciones de los radicales libres (Harman 1972).

Más tarde, Jaime Miquel y colaboradores propusieron en 1980 **La Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular** (Miquel et al., 1980). Esta teoría sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los radicales de oxígeno al genoma mitocondrial en células post-mitóticas fijadas (Miquel et al., 1980). Las mitocondrias de las células post-mitóticas consumen O_2 a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (Miquel et al., 1986).

La Teoría Mitocondrial del Envejecimiento se ha probado 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 (Nohl et al., 1978; Sohal et al., 1990a; Sohal et al., 1994a; Sastre et al., 1996; Sastre et al., 1998). Así mismo, 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 (ver Figura 1.4) (Sastre et al., 2000; Sastre et al., 2003). 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 et al., 1990b; Sohal et al., 1991; Ku et al., 1993a; Barja et al., 1994). De este modo, la velocidad de producción de ROS aparece como determinante en el potencial de vida máxima (Perez-Campo et al., 1998).

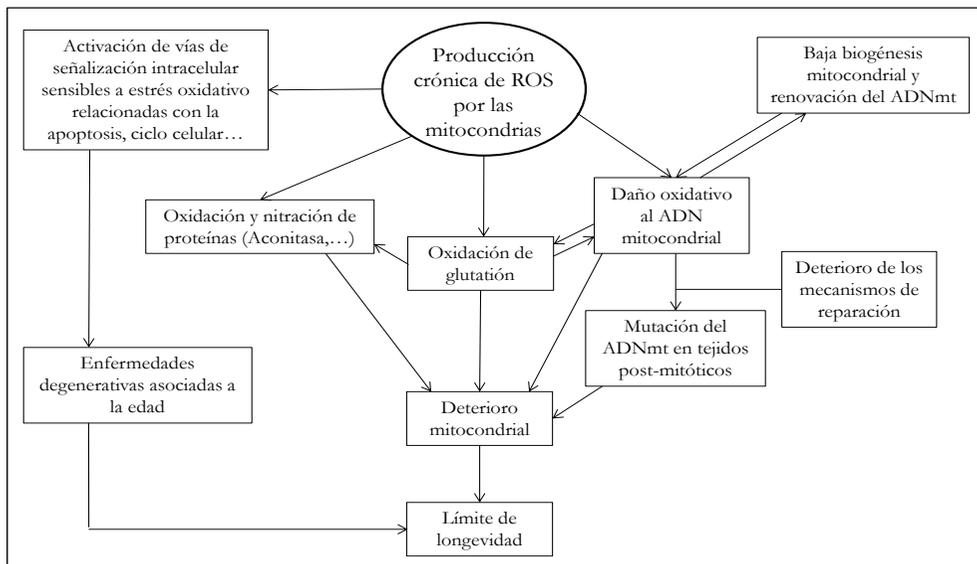


Figura 1.4.- Control de la longevidad por el estrés oxidativo mitocondrial (Sastre et al., 2003).

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 et al., 1980; Shigenaga et al., 1994; Navarro et al., 2007). Así, la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas decrece con la edad en hígado, músculo esquelético y cerebro. En este contexto, en nuestro laboratorio demostramos que el potencial de membrana mitocondrial decrecía con la edad y que aumentaba el tamaño mitocondrial en el envejecimiento (Sastre et al., 1996), mientras que el tratamiento con un extracto antioxidante mejoraba este deterioro en el potencial de membrana (Sastre et al., 1998).

Muchos estudios proporcionan evidencias sustanciales para demostrar una correlación negativa entre la producción mitocondrial de ROS y la longevidad de varias especies (Ku et al., 1993b; Herrero et al., 1998; Brunet-Rossini 2004; Csiszar et al., 2007; Lambert et al., 2007).

A pesar de haber considerado a la mitocondria como la principal fuente cuantitativa de O_2^- y de H_2O_2 en órganos de mamíferos (Chance et al., 1979b); algunos autores se oponen a esa idea al no considerar a la mitocondria fuente activa de dichos elementos *in vivo* (Nohl et al., 2005).

Con todo eso a favor de esta teoría, algunos demuestran lo contrario, por ejemplo: (i) una falta de correlación entre la producción mitocondrial de ROS y la longevidad en varias especies (Miwa et al., 2004; Chen et al., 2007); (ii) los efectos deletéreos más que beneficiosos, sobre la vida útil, de la administración de algunas sustancias antioxidantes en invertebrados hasta humanos (Howes 2006); (Cardillo et al.,) no siempre hay una correlación entre la actividad de enzimas antioxidantes y la longevidad (Perez et al., 2009b; Page et al., 2010).

Para entender bien esta teoría del envejecimiento, se explica en el siguiente apartado “el papel de la mitocondria como fuente y diana de radicales libres”.

1.5.2 La mitocondria

1.5.2.1 La mitocondria: estructura y función

Las mitocondrias son orgánulos celulares de forma ovalada, con una longitud de unas 2 μm y un diámetro de 0.5 μm , el tamaño aproximado de una bacteria.

Estudios de microscopia electrónica revelan la existencia de: una externa y una interna. Por lo tanto existen dos compartimentos: (i) el espacio intermembranal, situado entre la membrana externa e interna y (ii) la matriz que está rodeado por la membrana interna.

En el espacio intermembranal se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol, y alguno de estos complejos presenta actividad cinasa.

Sus membranas ofrecen también diferencias significativas. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas ‘crestas’, con multitud de complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones –CTE–, la ATP sintasa) y proteínas que regulan el paso de metabolitos, como el traslocador de nucleótidos de adenina (ANT, del inglés, *adenine nucleotide translocator*). La membrana mitocondrial interna resulta especialmente impermeable a iones gracias a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar un gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales y, en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6.000 Da debido a la presencia de la proteína porina (Ha et al., 1993), conocida en la actualidad como canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, del inglés, *voltage dependent anion channel*).

A pesar de la existencia de estos compartimentos, que a primera vista parecen estancos, la estructura mitocondrial permite el paso regulado de proteínas mediante procesos controlados por unos complejos proteicos transmembranales –TIM (del inglés, *translocase of the inner membrane*) en la membrana interna y TOM (del inglés, *translocase of the outer membrane*) en la externa– que son capaces de discriminar entre aquellas proteínas que deben dirigirse a la matriz y las que lo harán hasta el espacio intermembranal; en este proceso intervienen algunos miembros de la familia de las chaperonas que se inducen por calor (HSP, del inglés, *heat shock proteins*), como la HSP 70 y la HSP 60 (Hood et al., 2003).

Entre las funciones que se realizan en la mitocondria cabe destacar, según la relación con el tema, la fosforilación oxidativa. La cual tiene lugar en la cadena de transporte electrónico, que es llevada a cabo por un complejo

enzimático en el que se genera poder reductor en forma de NADH y FADH_2^- , que se utiliza en la cadena respiratoria. Acoplado al transporte de los electrones por diferentes niveles redox, y gracias a la energía liberada, tiene lugar la salida de tres protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal, lo que origina un gradiente electroquímico entre los dos compartimentos; ello se traduce en una diferencia de pH de una unidad y en una diferencia de potencial eléctrico de 140 mV, lo que supone un incremento de energía libre (ΔG) de aproximadamente -5 Kcal. Esta energía la utiliza la ATP sintasa (complejo V), localizada en la membrana interna, para fosforilar moléculas de ADP, dando lugar a ATP, a la vez que los protones vuelven a la matriz a favor de gradiente. El funcionamiento correcto de este complejo enzimático es esencial para la vida de la célula, de forma que cualquier alteración en las enzimas que lo componen se puede traducir en enfermedades degenerativas. Son muchos los inhibidores que se conocen de los distintos componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEM), los cuales se utilizan en estudios sobre su funcionamiento (ver Figura 1.5).

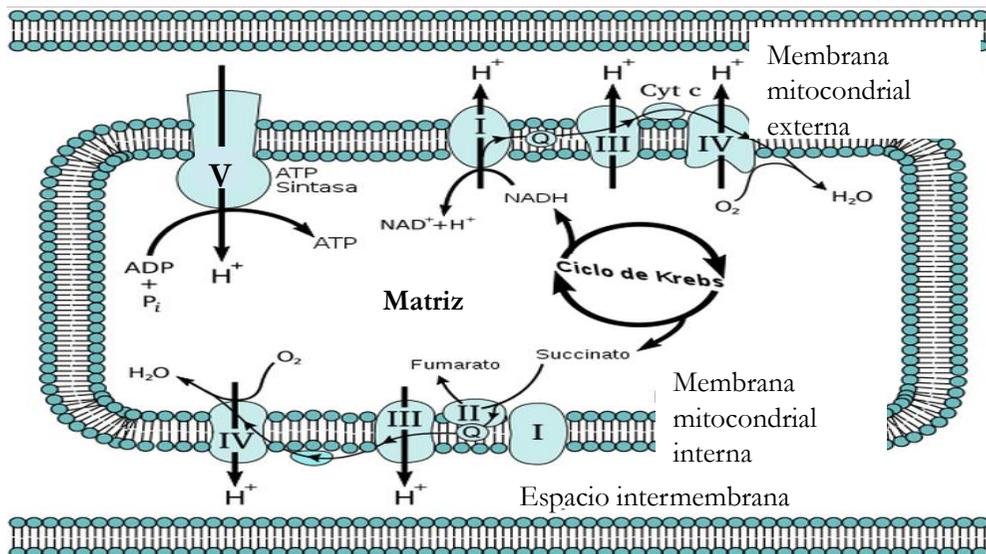


Figura 1.5.- Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

1.5.2.2 Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales

Los radicales libres mitocondriales derivan de los dos radicales libres primarios, el radical superóxido y el óxido nítrico. Además, las mitocondrias en los órganos de los mamíferos son consideradas la principal fuente cuantitativa de O_2^{\bullet} y H_2O_2 (Chance et al., 1979b; Kowaltowski et al., 2009).

Se calcula que entre el 2 y el 3% 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 (Cadenas et al., 1977; Frei 1994). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital 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 et al., 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 et al., 1995). Así pues, se produce O_2^{\bullet} , 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 et al., 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 et al., 1973). Y se ha estimado que

se producen del orden de 10^{10} moléculas de O_2^{\bullet} por célula y por día (Ames et al., 1993).

Utilizando mitocondrias aisladas se puede determinar experimentalmente el consumo de oxígeno por la mitocondria, fenómeno denominado Control Respiratorio (ver Figura 1.6). 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).

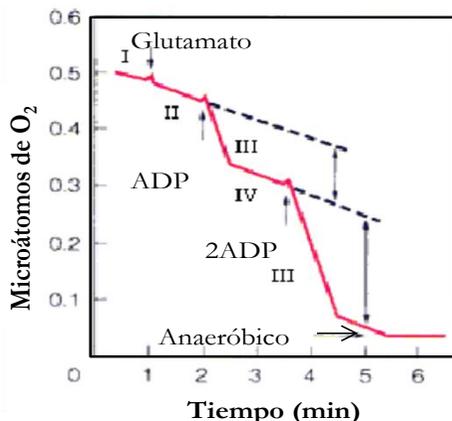


Figura 1.6.- Control respiratorio mitocondrial.

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 et al., 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 O_2 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 O_2^{\bullet} (Skulachev 1996). Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estado intermedio entre el estado 3 y el estado 4 (Brand et al., 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 O_2^{\bullet} por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas et al., 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 et al., 1995). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de HO^{\bullet} a partir de H_2O_2 . 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 et al., 1995).



1.5.2.3 Otras acciones de las mitocondrias

Se sabe que la mitocondria desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis (Nilsen et al., 2006), modulando la homeostasia del calcio intracelular, por ejemplo, además de ser la

central metabólica para la vía de los ácidos grasos, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la urea, biosíntesis de aminoácidos, purinas, esteroides, etc.

Por lo tanto, el contenido mitocondrial y la actividad de la cadena respiratoria es susceptible de ser regulada en función de las condiciones celulares. De modo que deberían de responder a los distintos cambios fisiológicos producidos tanto por hormonas, como por factores de crecimiento, cambios en la actividad fisiológica, etc.

Revisadas ambas teorías, 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 como los estrógenos o análogos de éstos, como los fitoestrógenos de la soja, podría retardar el daño que acompaña al proceso de envejecer. Además, se trata de dos teorías que podrían explicar prácticamente todos los fenómenos descritos en el resto de teorías de envejecimiento propuestas.

1.6 ANTIOXIDANTES FISIOLÓGICOS

Ya que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, la evolución ha ido dotando a estos organismos de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como antioxidante a “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell et al., 1995; Halliwell 1996).

Estas sustancias 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 podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los *antioxidantes primarios* previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa, y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH^\bullet (Halliwell et al., 1989; Mates et al., 1999).

Los *antioxidantes secundarios* son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye entre otros, el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, melatonina, carotenoides, flavonoides naturales (Halliwell et al., 1990; McCall et al., 1999).

Los *antioxidantes terciarios* reparan 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 et al., 1987; Pacifi et al., 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de DNA, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian et

al., 1985).

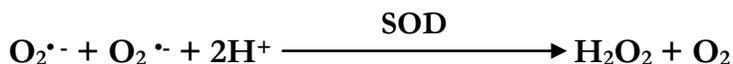
Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

1.6.1 Antioxidantes enzimáticos

1.6.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan and Fridovich, 1977).

Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord and Fridovich, 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord et al., 1974).



Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas (Fridovich 1974), según el grupo prostético metálico ligado al enzima (ver Tabla 1.3).

Enzima	Grupo prostético	Localización celular
Cu,Zn-SOD	Cu,Zn	Citosol y Núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial y Citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

Tabla 1.3.- Tipos de SOD y localización celular mayoritaria.

1.6.1.2 Glutación peroxidasa (GPx)

GPx juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células (Chance et al., 1979a).

Hay dos tipos de GPx, una dependiente del selenio y la otra no. Ambas necesitan del glutatión reducido (GSH) para efectuar las siguientes reacciones:



1.6.1.3 Catalasa

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



1.6.2 Antioxidantes no enzimáticos

También llamados antioxidantes secundarios, según la clasificación desde el punto de vista de la fisiología celular. Una importante proporción de la defensa antioxidante no enzimática se realiza por compuestos esenciales de micronutrientes. Entre otros tenemos, el glutatión, la vitamina E, vitamina C, carotenoides, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y los flavonoides

(Halliwell et al., 1990; Sies et al., 1995; Hensley et al., 2004; Masella et al., 2005; Naziroglu et al., 2005).

Por su relación con la presente tesis, sólo se destaca el grupo de los flavonoides.

1.6.2.1 Flavonoides

Los flavonoides son un 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. Ya en el año 2000 se habían descrito más de 6000 flavonoides diferentes y el número sigue aumentando (Harborne et al., 2000).

Son eficaces antioxidantes capaces de reaccionar con radicales como los radicales peroxilos, el radical hidroxilo y el O_2^{\bullet} , formando el radical fenoxi (Rice-Evans et al., 1995; Rice-Evans et al., 1996).

En este grupo se incluyen distintos subgrupos como los flavanoles (catequinas, epicatequinas), flavonoles (quercetina, miricetina, caemferol), flavanonas (naringenina, taxifolina), flavonas (apigenina, luteolina, hesperetina), isoflavonas (genisteína, daidzeína), o antocianidinas (cianidina, malvidina).

Son muchas las propiedades que se les atribuye a los flavonoides (Figura 1.7) a la hora de interaccionar con radicales libres. Éstas 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.

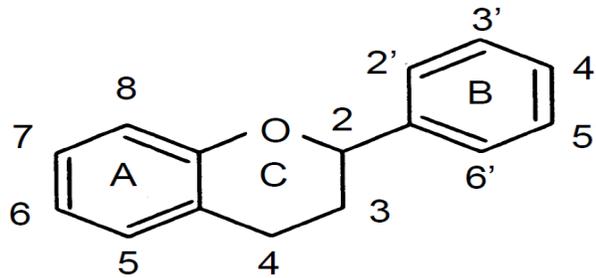


Figura 1.7.- Estructura básica de los flavonoides.

Más adelante me centraré en el papel antioxidante de las isoflavonas siendo este el grupo de los fitoestrógenos más estudiado y del que trata esta tesis.

No obstante, antes de eso se hace imprescindible una pequeña introducción sobre los estrógenos (Apartado 1.7), teniendo en cuenta que los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de las plantas que poseen una débil actividad estrogénica. Dicha actividad es debida a la importante similitud de la estructura de lignanos y las isoflavonas con estrógenos de los mamíferos.

1.6.3 Efecto de los antioxidantes sobre la longevidad

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, como hemos comentado anteriormente, Orr y Sohal crearon 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 et al., 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 sobre-expresión de estas enzimas por separado (Orr et al., 1993). Más recientemente, se ha visto el mismo efecto de la combinación simultánea en la sobre-expresión de Cu/ Zn-SOD y la MnSOD sobre la longevidad de la *Drosophila melanogaster* (Sun et al., 2004).

Sin embargo, son varios los estudios que han demostrado lo contrario, por un lado, la sobre-expresión de enzimas antioxidantes no prolonga la vida ni en ratones (Perez et al., 2009b), ni en la mosca *Drosophila melanogaster* (Mockett et al., 2010). Y por otro lado, que la administración de antioxidantes produce más efectos indeseados que beneficiosos sobre la vida útil de varias especies, desde invertebrados hasta humanos (Howes 2006). Otras revisiones sistemáticas y meta-análisis de la suplementación con antioxidantes tampoco demostraron efecto ninguno sobre la longevidad o incluso que aumentan el riesgo de mortalidad (Bjelakovic et al., 2007).

1.7 ESTRÓGENOS

1.7.1 Definición, tipos y mecanismo de acción

Los estrógenos son moléculas pertenecientes a la familia de las hormonas esteroideas (derivados de los lípidos), siendo el colesterol su precursor.

Son hormonas sexuales femeninas producidas principalmente por los ovarios en mujeres premenopáusicas. 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 et al., 1987).

Hay tres estrógenos naturales, estrona, estriol y el más importante 17β -estradiol. Los estrógenos poseen acciones vinculadas con el aparato reproductor, y acciones relacionadas con el metabolismo.

Una vez secretados, los estrógenos son transportados en el plasma unido a proteínas plasmáticas (70% de los estrógenos están vinculados a la hormona sexual globulina (SHBG), con un adicional del 25% a la albúmina) a las células diana. Las acciones biológicas de los estrógenos son producidas por su interacción con receptores de estrógeno específicos que se encuentran dentro del citoplasma y el núcleo de las células diana. Los receptores estrogénicos (RE) juegan un papel central en el proceso de activación de la transcripción génica por los estrógenos (Osborne et al., 2001). Se han descrito dos subtipos de RE, alfa y beta, que se diferencian tanto en sus propiedades como en su distribución tisular (ver Figura 1.8) (Gruber et al., 2002). A su vez, pueden ser nucleares o de membrana (Razandi et al., 1999). La estructura de ambos en cuanto a sus propiedades de reconocimiento de los estrógenos, unión al DNA y activación de la expresión génica permite suponer que actúan de manera similar (Palmieri et al., 2002).

Cabe destacar que aunque el receptor alfa y el receptor beta guarden 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 et al., 1997; Kuiper et al., 1998b).

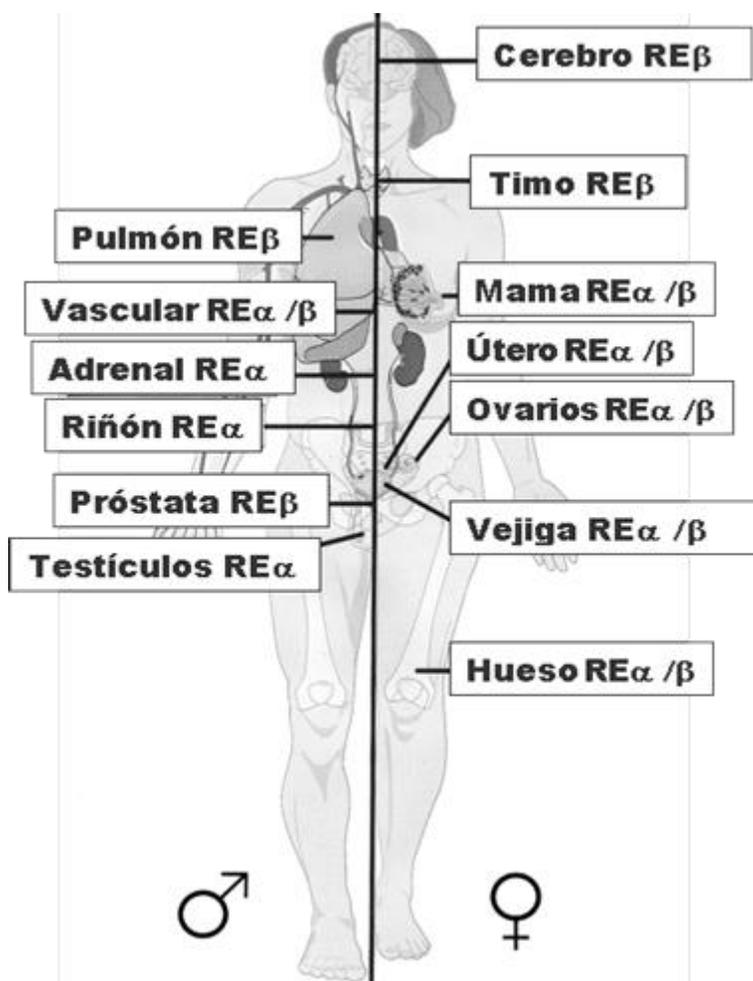


Figura 1.8.- Distribución de receptores estrogénicos (Setchell et al., 1999).

1.7.2 Acción de los estrógenos sobre las mitocondrias

El estradiol desencadena numerosos efectos sobre la mitocondria, mediados tanto por receptores estrogénicos genómicos como de membrana (Nilsen et al., 2006). Hoy en día existen varias líneas de investigación que sugieren que el estradiol y sus receptores están directamente implicados en la conservación y regulación de la estructura de la mitocondria y de la cadena de transporte mitocondrial (Chen et al., 2005; Borrás et al., 2010).

Además, nuestro grupo ha publicado muy recientemente, cómo el estradiol protege la integridad mitocondrial, indicado por un aumento en el potencial de membrana mitocondrial, previene la formación de especies reactivas de oxígeno y también la salida apoptogénica de citocromo C de la mitocondria, por lo que el contenido mitocondrial de citocromo C se mantiene elevado (Borras et al., 2010).

1.7.3 Propiedades antioxidantes de los estrógenos

Debido a su estructura fenólica y su papel protector frente a la peroxidación de membrana fosfolipídica, se ha calificado a los estrógenos como antioxidantes naturales (Sugioka et al., 1987; Subbiah et al., 1993).

Otro trabajo que relaciona el estradiol directamente como una molécula con actividad antioxidante se publicó en 1993 (Ruiz-Larrea et al., 1993), los resultados mostraron una disminución, causada por el estradiol, de la lipoperoxidación en microsomas hepáticos de rata.

Además, según Deroo et al. (Deroo et al., 2004), el estradiol regula la expresión de ciertas tioredoxinas, enzimas que juegan un importante papel en la protección contra el estrés oxidativo, en la regulación de la actividad de factores de transcripción y proliferación. Esta regulación fue mediada por receptores estrogénicos alfa. También, en determinados órganos como el cerebro, se ha comprobado la protección de los estrógenos frente a daños causados por el estrés oxidativo (Behl et al., 1997).

Estudios *in vivo* llevados a cabo en nuestro laboratorio corroboran este hecho, el potente efecto antioxidante de los estrógenos. Al ver que las mitocondrias hepáticas de las ratas Wistar machos generan aproximadamente doble cantidad de peróxidos que las ratas hembras. Esto es completamente revertido cuando se ovariectomizan las hembras, observándose un incremento en la producción de peróxidos y disminución en los niveles de glutatión reducido en las mitocondrias hepáticas de las ratas ovariectomizadas. Mientras

que la reposición hormonal con estrógenos previene este aumento (Borras et al., 2003).

Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado que los estrógenos no son antioxidantes fisiológicamente por su estructura química fenólica, ya que sus bajas concentraciones fisiológicas no explican este efecto, sino que actúan mediante la inducción de la expresión de genes antioxidantes: manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Además, se ha observado que el mecanismo por el cual inducen la expresión de estas enzimas es mediante la activación de receptores estrogénicos, que activan a su vez las vías de señalización de las MAPK y de NFκB (ver Figura 1.9) (Borras et al., 2005).

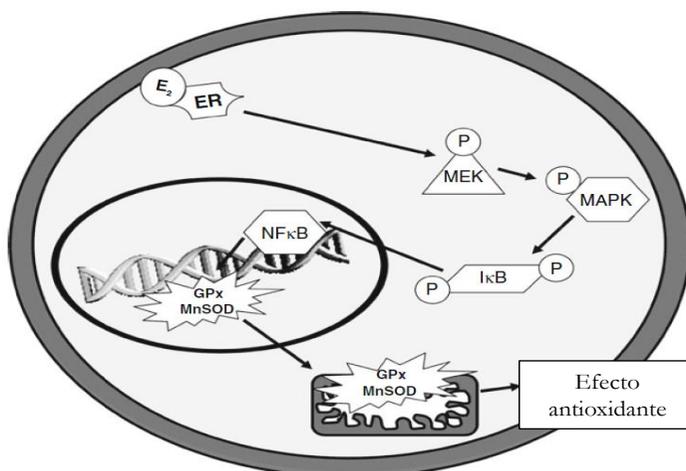


Figura 1.9.- Mecanismo de acción propuesto por Borrás et al (Borras et al., 2005).

1.7.4 Terapéutica hormonal sustitutiva

La menopausia es un período natural en el envejecimiento de la mujer. En él, debido al cese de la función ovárica, el cuerpo deja poco a poco de producir óvulos y hormonas sexuales femeninas (entre ellas estrógenos y progesterona), que son las encargadas de regular el ciclo menstrual. La carencia de estrógenos hace que aumente el riesgo de enfermedades de gran importancia con respecto a la premenopausia, entre ellas la osteoporosis y las enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central, etc.

Para contrarrestar el descenso natural de estrógenos y así prevenir los problemas asociados a él, durante la menopausia se prescriben *terapias hormonales sustitutivas*, por vía oral o subcutánea (a modo de parches), así como tratamientos basados en sustancias que modulan el receptor de estrógeno.

1.7.5 La doble cara de los estrógenos: efectos beneficiosos y perjudiciales

Desde que la terapia hormonal sustitutiva se introdujo hace ya más de 70 años, es constante el flujo de estudios que se siguen elaborando para solventar la controversia que está generando su uso. Sus ambos efectos, perjudiciales y beneficiosos, son bastante evidentes (Paganini-Hill 1996; Minelli et al., 2004).

La figura 1.10 resume los efectos de los estrógenos sobre la mayoría de los tejidos sobre los que actúa.

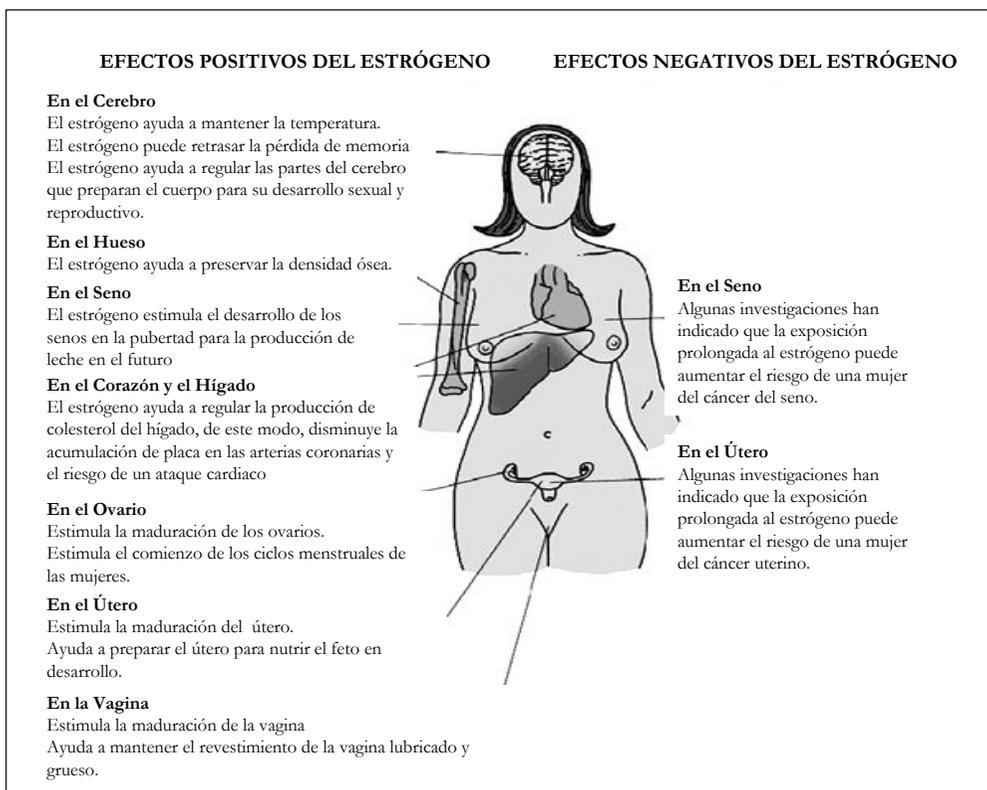


Figura 1.10.- Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos.

La terapia hormonal sustitutiva persigue los siguientes objetivos:

1. Tratar los síntomas vasomotores (sofocos).
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).

En cuanto a sus efectos perjudiciales lo más que se destaca es el riesgo de cáncer endometrial y cáncer de mama. El estudio publicado en JAMA en el año 2002 “Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial”, concluye 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 et al., 2002).

1.7.6 Estrógenos y longevidad

Se ha postulado que las diferencias en la longevidad observadas entre organismos de diferentes sexos dentro de una especie se pueden atribuir a las diferencias en el estrés oxidativo (Borras et al., 2003). En general se acepta que las diferencias se deben a los niveles más altos de estrógeno en las hembras. Así pues, estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que los estrógenos inducen la expresión de genes antioxidantes, la GPx y MnSOD (Borras et al., 2003; Vina et al., 2005b) por la vía ERK1-2/NFκB (Borras et al., 2005).

Si bien, algunos estudios muestran que las ratas hembras tienen una mayor concentración y actividad de antioxidantes o menores niveles de estrés oxidativo que las ratas macho (Borras et al., 2003; Baba et al., 2005), otros no encuentran tal diferencia (Cousins et al., 2003; Jang et al., 2004; Sverko et al., 2004). Esto indica que la regulación de estrógenos pueden aumentar las defensas antioxidantes en algunas, pero no en todas las cepas. Por lo que, para algunos autores el aumento de los niveles de antioxidantes, provocado por el estrógeno, no es determinante de la longevidad (Sanz et al., 2007).

1.7.7 SERMs: moduladores selectivos del receptor de estrógeno

Debido a lo comentado anteriormente respecto a los efectos perjudiciales de las terapias hormonales sustitutivas (THS) y a la discrepancia en su uso, nació la necesidad de crear fármacos que tengan propiedades a la vez agonistas y antagonistas de los estrógenos; dicho de otra forma, que conserven la función beneficiosa del estrógeno en los sistemas cardiovascular, nervioso y óseo, 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.

De momento no se ha encontrado el SERM ideal que cumpla con todas las funciones expuestas en la figura 1.11. (Jordan 2004).

- Disminuir los síntomas de la menopausia (p. ej. reducir los sofocos)
- Reducir la enfermedad de Alzheimer
- Reducción del riesgo de cáncer de mama
- Reducir el colesterol LDL y aumentar el HDL
- Reducción del riesgo de cáncer de útero
- Fortalecer los huesos (Reducir la osteoporosis)



Figura 1.11.- Modulador selectivo ideal del receptor estrogénico.

Y los criterios para evaluar la relación beneficio-riesgo de un SERM particular pueden variar dependiendo de la indicación terapéutica específica. Pero algunos ya están siendo utilizados actualmente para el tratamiento de distintas patologías asociadas a la menopausia, tales como el cáncer de mama y la osteoporosis (Jordan et al., 2001; Taylor 2009).

Los SERMs pueden ser naturales como los **fitoestrógenos** (Brzezinski et al., 1999), o sintéticos como es el ejemplo del **tamoxifeno** (derivado del trifeniletilén, indicado para el tratamiento del cáncer de mama) (Brauch et al., 2009) y el **raloxifeno** (derivado del benzotiofeno, aprobado para el tratamiento de la osteoporosis) (Ettinger et al., 1999) entre otros.

Dada la importancia de los fitoestrógenos en esta tesis, pasamos a comentarlos más detalladamente en el siguiente apartado.

1.8 FITOESTRÓGENOS

1.8.1 Definición y clasificación

Los fitoestrógenos se han definido como cualquier sustancia vegetal o metabolito que induce respuestas biológicas en vertebrados y pueden imitar o modular la acción de los estrógenos endógenos, por lo general mediante la unión a receptores de estrógeno (Shemesh et al., 1972; Verdeal et al., 1980; Madej et al., 2002), hecho que puede ser debido, como se puede apreciar en la figura 1.12, a la gran similitud en sus estructuras químicas (Fowler 1983).

Los fitoestrógenos son compuestos fenólicos, y los principales en los alimentos se pueden dividir en dos grupos, por un lado, los flavonoides que se subdividen en isoflavonas, coumestanos y flavonoides prenilados, y en segundo lugar, los no flavonoides, que comprenden los lignanos (ver Tabla 1.4) (Sunita et al., 2011). El grupo más estudiado son las isoflavonas, principalmente, las derivadas de la soja como son: Genisteína y Daidzeína (Fukutake et al., 1996;

Bingham et al., 1998).

Aunque otras legumbres como los garbanzos y guisantes verdes también contienen isoflavonas, los niveles son por lo menos 2 órdenes de magnitud por debajo de la soja (Liggins et al., 2000).

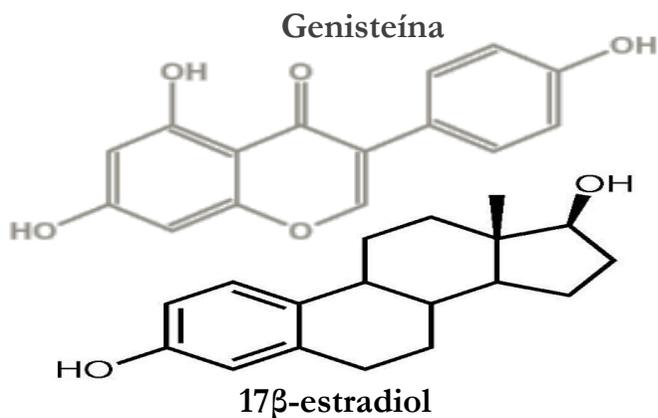


Figura 1.12.- Similitud estructural entre el 17β-estradiol y la isoflavona genisteína.

Grupo	Compuestos	Alimentos
Lignanos	Enterodiol	Granos enteros
	Enterolactona	Cereales Lentejas
Isoflavonas	Genisteína	Granos de soja
	Daidzeína	Harina de soja
	Equol	Tofú
Cumestanos	4'-cumestrol	Alfalfa
	Metoxycumestrol	Coles

Tabla 1.4.- Clasificación y origen de los principales fitoestrógenos.

1.8.2 Isoflavonas

Las isoflavonas son sin duda las que mayor interés despiertan del grupo de los fitoestrógenos. Es tal su supremacía, que a efectos prácticos se superponen los términos “isoflavonas” y “fitoestrógenos” y el uso los ha convertido en prácticamente sinónimos. Casi todos los datos conocidos sobre los fitoestrógenos provienen del estudio de las isoflavonas, especialmente de la genisteína y la daidzeína, que son sus representantes más importantes.

1.8.3 Historia

Ya desde el año 1927 se conoce que los extractos de algunas plantas muestran actividad estrogénica. Esto, sin embargo, no se supo apreciar adecuadamente, ya que en aquel momento se estaba iniciando el conocimiento sobre las funciones fisiológicas de los estrógenos en los mamíferos. Más tarde fue Walz, en 1931 quien descubrió que los alimentos ricos en soja tienen un alto contenido en dichas sustancias con acción estrogénica, especialmente las isoflavonas (Walz 1931). No obstante, los efectos biológicos de las isoflavonas por primera vez llamaron la atención de la comunidad científica en la década de 1940, al identificarse una isoflavona (equol) como factor etiológico de la infertilidad en un grupo de ovejas en Australia occidental que comían una especie de Trébol llamado *Trifolium subterraneum* (Bennetts et al., 1946). Además, estas ovejas presentaron quistes ováricos y endometriosis (Bennetts 1946). En este mismo sentido y tres décadas más tarde, Setchell y colaboradores determinaron que la soja rica en isoflavonas, que formaba parte de la dieta normal de los guepardos en zoológicos estadounidenses, fue un factor en la disminución de la fertilidad en estos animales (Setchell et al., 1987). Es por lo tanto fácil de entender por qué los nutricionistas, pudieron llegar a ver las isoflavonas como antinutrientes.

Curiosamente, en la década de 1950, las isoflavonas fueron objeto de

estudio por la industria de la alimentación animal como promotores del crecimiento, debido a sus posibles efectos estrogénicos reportados en roedores (Cheng et al., 1953; Carter et al., 1955). En los años 1960, la determinación de las afinidades de unión relativas de las isoflavonas para el receptor de estrógeno tipo alfa ayudó a establecer firmemente estos constituyentes de la soja como fitoestrógenos (Folman et al., 1966; 1969).

Posteriormente, se publicaron los resultados de un compuesto estrogénico no esteroideo llamado P1496 (ipriflavona), en el manejo de la sintomatología climatérica (Utian 1973).

El conocimiento profundo y actual que tenemos de los fitoestrógenos arranca de 1982, cuando Axelson, y posteriormente en 1984 Setchell, identificaron isoflavonas en la orina humana (Axelson et al., 1982; Setchell et al., 1984). Y es a partir de allí cuando se iniciaron estudios epidemiológicos para aclarar la importancia de estos compuestos en la dieta.

1.8.4 Epidemiología

Existen varios estudios epidemiológicos y experimentales que demuestran 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 (Adlercreutz 1984; Setchell et al., 1984; Cassidy et al., 1994; Messina et al., 1994; Adlercreutz et al., 1995; Barnes 1998; Lissin et al., 2000; Adlercreutz 2002; Ma et al., 2008a). Estos estudios han comparado la dieta occidental con la dieta oriental, especialmente la de Japón y otros países asiáticos, encontrando que el consumo de productos derivados de la soja, y en especial de isoflavonas, varía ampliamente (Adlercreutz 1990). De hecho, la concentración típica de genisteína en alimentos de soja es de 1 a 2 mg por g de proteína, y los asiáticos consumen 20 a 80 mg de genisteína por día en la dieta habitual, por el contrario,

el promedio americano ingiere sólo de 1 a 3 mg por día (Barnes et al., 1995). Al determinar la concentración de lignanos e isoflavonas en plasma y orina, se ha encontrado relación entre las bajas concentraciones de estos compuestos y la mayor incidencia y prevalencia de las enfermedades anteriormente citadas (Adlercreutz et al., 1993b; Adlercreutz et al., 1997; Shoff et al., 1998). Ello se ve reforzado aún más cuando descubren que inmigrantes japoneses en los Estados Unidos, que cambian sus hábitos dietéticos (Yamamoto et al., 2003), al cabo del tiempo igualan su riesgo con respecto a la población general; esto sugiere que no solamente los factores raciales y genéticos están implicados en el desarrollo de estas enfermedades. Lo que sí se ha visto recientemente es que el efecto de la soja en prevenir el cáncer de mama, es mayor cuando es consumida desde temprana edad (Thanos et al., 2006; Korde et al., 2009).

Por su parte, la experiencia común en Japón muestra que cuando se administra una dieta muy rica en fitoestrógenos no aparecen fenómenos de feminización en la población masculina (Messina 2010).

En conclusión, cabe destacar el interés que ha despertado últimamente el uso de estos compuestos 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, sabiendo que está totalmente fuera del caso el recomendar la administración de estrógenos a machos por su enorme poder feminizante. Asimismo, la posibilidad de utilizarlos en mujeres postmenopáusicas y alargar así su esperanza de vida, no debe ser desdeñada.

1.8.5 Mecanismo de acción

Como ya hemos visto en la definición de los fitoestrógenos, son compuestos de origen vegetal y con una característica estructura difenólica que les confiere una estabilidad excepcional (Adlercreutz et al., 1997). Y que debido a su similar estructura química a la hormona femenina, 17β -estradiol, tienen la

capacidad de unirse a los receptores estrogénicos (Setchell 2001) siendo mayor su afinidad por el ER- β que por el ER- α (Kuiper et al., 1998a). Dado que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos (Bingham et al., 1998), han sido agrupados dentro de los SERMs (Brzezinski et al., 1999). Sin embargo, este no es el único mecanismo por el cual los fitoestrógenos ejercen sus efectos; muchos de ellos no están relacionados con sus propiedades estrogénicas.

Así pues, los mecanismos de acción de estos compuestos se pueden dividir en dos, dependiendo de si son hormono-dependientes (mediados por receptor estrogénico) o no hormonales (independientes de receptor estrogénico) (Magee et al., 2004).

De forma general, entre los varios posibles mecanismos de acción de los fitoestrógenos y aquí me centro en las isoflavonas de la soja, tenemos por una parte, que su actividad estrogénica se cree que es responsable de la mayoría de sus efectos beneficiosos sobre los procesos hormono-dependientes, tales como la reducción de la pérdida de la masa ósea asociada a la osteoporosis, la mejoría de los síntomas menopáusicos y la reducción de los niveles de LDL en plasma (Kuiper et al., 1997; Tikkanen et al., 1998). Por otro lado, también se han descrito algunos efectos no relacionados con el receptor estrogénico. Estos efectos incluyen su actividad antiproliferativa, inhibición de la tirosin kinasa C, DNA topoisomerasa II, actividad antioxidante, inhibición de la angiogénesis y la inhibición de la prostaglandin sintasa (Akiyama et al., 1987; Degen 1990; Fotsis et al., 1993; Markovits et al., 1995; Wei et al., 1995; Arora et al., 1998).

Teniendo que ver con la presente tesis, hacemos hincapié en su capacidad de frenar la producción de radicales libres además de sobre-expresar enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa (Wiseman et al., 2000; Sierens et al., 2001; Adlercreutz 2002; Mahn et al., 2005; Vina et al., 2005b; Borrás et al., 2006).

Más recientemente, en nuestro laboratorio hemos visto que la genisteína imita el efecto protector del estradiol, por un lado, disminuyendo la producción

de oxidantes y por otro, evitando la liberación de citocromo C desde la mitocondria (Borras et al., 2010).

1.8.6 Farmacocinética de los fitoestrógenos

La base para entender los beneficios de las isoflavonas requiere un conocimiento detallado sobre la absorción, distribución, metabolismo, eliminación y biodisponibilidad de estos fitoestrógenos.

Parece que los principales compuestos fitoestrogénicos y sus metabolitos difieren en su actividad biológica, debido al papel crucial que desempeña la microflora intestinal en su metabolismo (Rowland et al., 1999; Setchell et al., 2002; Bowey et al., 2003). Así, todos los estudios de metabolismo después de la ingesta de preparados de soja e isoflavonas muestran grandes variaciones interindividuales de todos los parámetros de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de las mismas (Cassidy et al., 2006b; Nielsen et al., 2007). Y por consiguiente, encontramos mucha variabilidad en su repercusión en la salud.

La mayoría de los fitoestrógenos dietéticos se encuentran como glucósidos. Y los principales glucósidos presentes en la soja son daidzina, genistina y glicitina. Estos compuestos conjugados de glucosa son biológicamente inactivos (Miksicek 1995), pero después de su consumo, dichos glucósidos son probablemente hidrolizados, en parte por el ácido gástrico, y ampliamente biotransformados en el intestino por la acción de las β -glucosidasas que separan el resto glucídico y las convierten en agliconas, que son biológicamente activas; las principales de las soja son la genisteína, la daidzeína y la gliciteína. Las agliconas pueden ser absorbidas en el intestino delgado o metabolizadas a muchos metabolitos específicos, como es el ejemplo del metabolito equol a partir de la daidzeína (ver Figura 1.13) (Setchell et al., 1984; Kelly et al., 1995; Setchell et al., 2002).

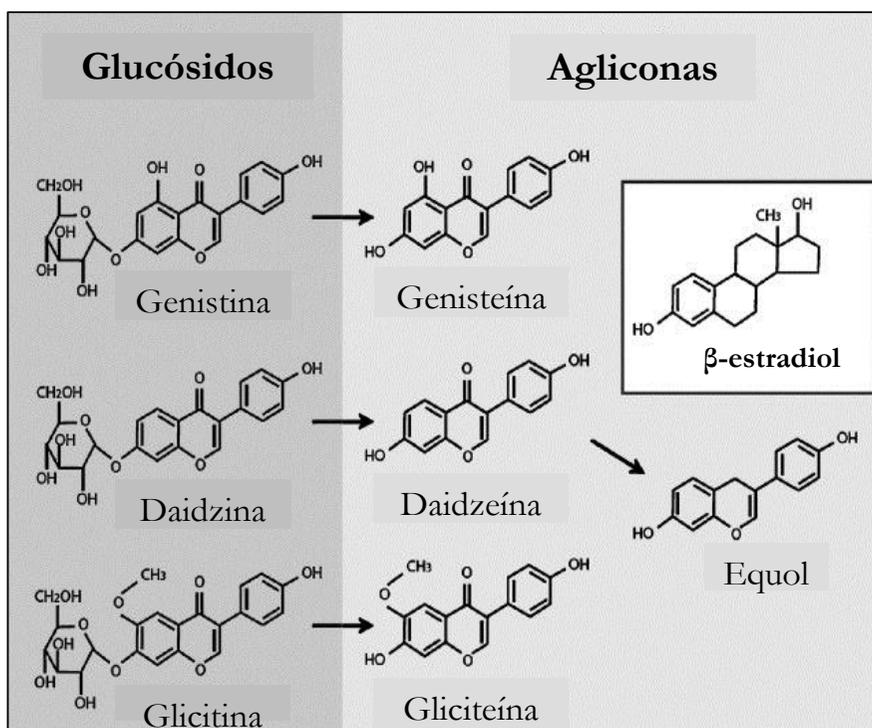


Figura 1.13.- Estructura química de las tres principales isoflavonas y sus conjugados.

Las formas activas (agliconas) genisteína, daidzeína y gliciteína, que son absorbidas por la mucosa intestinal y transportadas por la vena porta al hígado donde, por acción de las enzimas glucuroniltransferasas y sulfotransferasas, forman conjugados de glucurónidos y sulfatos, siendo la glucuronización la principal vía de biotransformación de las isoflavonas (Sfakianos et al., 1997). Tras este primer paso hepático las formas activas pueden pasar a la circulación general o seguir la vía enterohepática por la que vuelven al intestino donde la microflora colónica vuelve a actuar sobre ellas produciendo metabolitos como equol y O-desmetilangolesina (O-DMA), derivados de la daidzeína, o p-etilfenol, derivado de la genisteína (Joannou et al., 1995; Rice et al., 2008).

Esta vía de metabolización es clínicamente relevante para la eficacia de las isoflavonas de soja debido a que la potencia estrogénica del equol es un orden de magnitud más alta que la de su precursor, la daidzeína (Setchell 2000; Atkinson et al., 2005). Así como prácticamente todos los roedores son

productores de equol; en el caso de los humanos hay mucha variabilidad, sólo cerca del 30% población occidental son capaces de metabolizar la daidzeína a equol mientras que la población asiática, como los japoneses, coreanos y chinos incluso más del 60% son productores de dicho metabolito (Morton et al., 2002; Atkinson et al., 2005; Atkinson et al., 2008; Fujimoto et al., 2008).

Además, los productos dietéticos fermentados, donde los glucósidos son hidrolizados a agliconas durante el proceso de fermentación, pueden aumentar la absorción de las isoflavonas (Setchell et al., 2001).

En cuanto a la vida media de las isoflavonas y sus metabolitos por el plasma está entre las 7 y 9 horas en adultos, con un pico máximo dentro de las 4 y 8 horas después de su ingestión (Setchell et al., 2001).

Mientras que su excreción, a través de la orina (mayoritaria) o las heces, empieza durante las 24 horas posteriores a su ingesta (Joannou et al., 1995; Watanabe et al., 1998). De ahí que se suele recomendar su consumo en varias y menores tomas a lo largo del día y no en única, aunque alta dosis diaria (Setchell et al., 2003).

Por lo tanto, para el estudio de la farmacocinética de las isoflavonas hay que considerar factores que influyen en la absorción y metabolismo de los fitoestrógenos, y que incluyen la dieta y la microflora intestinal, entre otros (Rowland et al., 2003), que precisamente de ello depende sus posibles efectos sobre el organismo.

Son varios los estudios que se han hecho para estudiar cómo puede influir la dieta en el metabolismo de estos compuestos, por ejemplo, una dieta rica en carbohidratos incrementa la producción de equol mientras que las grasas los reducen (Rowland et al., 2000). Así se entiende el que los vegetarianos y los asiáticos, grandes consumidores de soja, tienen una gran habilidad en convertir daidzeína en equol, mientras que la población occidental, caracterizada por consumir dietas ricas en proteína animal, lo hacen menos (Lampe et al., 1998; Arai et al., 2000; Setchell et al., 2006). Por otro lado, se ha visto que las fibras disminuyen la absorción de las isoflavonas (Tew et al., 1996).

1.8.7 Fitoestrógenos como antioxidantes

En apartado anterior, 1.7.3, nos referimos al papel antioxidante de los estrógenos y de qué modo eran capaces de inducir la expresión de genes antioxidantes (Borras et al., 2005).

A los fitoestrógenos se les han atribuido funciones antioxidantes ya que se ha visto que las isoflavonas de soja eran capaces de reducir el estrés oxidativo y mejorar parámetros relacionados con el envejecimiento (Hsieh et al., 2009). Por ejemplo, según un estudio *in vivo*, el consumo de soja podría reducir los niveles MDA e incrementar la capacidad antioxidantes en plasma de mujeres menopáusicas (Azadbakht et al., 2007).

Así mismo, dicho papel beneficioso de estas sustancias sobre parámetros de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes se ha demostrado previamente por nuestro grupo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mahn et al., 2005; Borras et al., 2006).

Por tanto, pueden constituir una alternativa interesante a las terapias hormonales sustitutivas, debido a tantos efectos beneficiosos que se le atribuyen y muy pocos perjudiciales (Vina et al., 2011).

Tomando lo anterior en consideración, estudios realizados en nuestro laboratorio han visto que el papel antioxidante de la genisteína, que reduce los niveles basales de peróxidos en células MCF-7, se explica de modo similar a cómo lo hacen los estrógenos, induciendo la expresión de genes antioxidantes. Lo cual puede ser debido a su capacidad de interacción con receptores estrogénicos, siendo preferencial por el ER- β , que a su vez activa la vía de señalización de las MAPK (ERK1/ 2) y la translocación del NF-kB (ver Figura 1. 14) (Borras et al., 2006; Vina et al., 2008).

INGESTA DE FITOESTRÓGENOS EN LA DIETA



Figura 1.14.- Mecanismo de sobre-expresión de genes antioxidantes por fitoestrógenos.

1.8.8 Potenciales efectos de los fitoestrógenos sobre la salud

Revisando la bibliografía vemos como a los fitoestrógenos se le atribuyen numerosos beneficios sobre la salud.

Algunas enfermedades, como la osteoporosis, cáncer de mama, cáncer de próstata, enfermedades cardiovasculares y síntomas de la menopausia, comparten una epidemiología común: son poco frecuentes en las poblaciones de

Extremo Oriente, con dietas tradicionales ricas en productos de soja, en comparación con las poblaciones occidentales con dietas pobres en dichos alimentos (Kagan et al., 1974; Adlercreutz 1990; Bingham et al., 1998). Esta relación, entre la baja incidencia de dichas enfermedades y alto consumo de soja, se estableció cuando se vio que los japoneses que emigraron a Reino Unido tenían alta presión sanguínea, alto nivel de colesterol y bajos niveles de triglicéridos en comparación con sus compatriotas que todavía vivían en Japón (Robinson et al., 1995), lo cual sugirió que las diferencias no eran de origen genético sino que eran debidas a cambios en la dieta.

Enfermedades cardiovasculares

Son varios los mecanismos por los que los fitoestrógenos pueden prevenir o reducir las enfermedades cardiovasculares. Éstos incluyen:

Su actividad antioxidante sea sobre-expresando enzimas antioxidantes o inhibiendo la formación de radicales libres, peróxido de hidrógeno, y aniones superóxido (Ruiz-Larrea et al., 1997; Patel et al., 2001; Mahn et al., 2005; Borrás et al., 2006).

La mejora del perfil lipídico (Cassidy et al., 1995; Potter 1995; Merz-Demlow et al., 2000; Wangen et al., 2001; de Kleijn et al., 2002). Anderson y colaboradores, realizaron en 1995 un meta-análisis de 38 estudios clínicos controlados, encontrando que el consumo promedio de 47 g/día de proteína de soja, disminuía el colesterol total en un 9.3%, el colesterol LDL en 12.9%, y los triglicéridos en 10.5%. (Anderson et al., 1995). También son varios los estudios clínicos que demuestran que las isoflavonas reducen la susceptibilidad de los lípidos a la oxidación (Tikkanen et al., 1998; Wiseman et al., 2000). En modelos animales de obesidad, la ingesta de proteína de soja limita o reduce la acumulación de grasa corporal y mejora la resistencia a la insulina, que es un marcador de la obesidad humana (Vedavanam et al., 1999; Bartke et al., 2004; Lee 2006).

Las isoflavonas, y en especial la genisteína, inhiben la agregación plaquetaria tal como fue demostrado por Raines y Wilcox en 1995, actúan inhibiendo la formación de trombina en la placa aterosclerótica. Además, inhiben la adhesión y proliferación celular (Raines et al., 1995; Wilcox et al., 1995).

Con respecto a sus acciones a nivel vascular, la mayoría de los estudios han sido realizados en primates no humanos y han mostrado efectos similares a los del estradiol. Honore y colaboradores encontraron una respuesta vasodilatadora a la acetil-colina en macacos hembras con aterosclerosis, y concluyen que los fitoestrógenos derivados de la soja pueden tener un efecto protector a nivel del endotelio vascular similar al del estradiol (Honore et al., 1997). También cabe mencionar su implicación en mejorar la presión sanguínea, este efecto se ha estudiado en ratas por el grupo de Mann, donde identificaron que la proteína de soja aumentaba la expresión del gen de eNOS y enzimas antioxidantes, dando como resultado mejora de la función endotelial y la presión sanguínea *in vivo* (Mahn et al., 2005).

Osteoporosis

El problema de la osteoporosis afecta tanto al hombre como la mujer a medida que envejecen, aunque en el caso de la mujer y a partir de la menopausia es mucho más relevante.

Los positivos efectos antiosteoporóticos de los fitoestrógenos, tales como aumentar la densidad de masa ósea y reducir marcadores bioquímicos de resorción ósea, han sido bien descritos en multitud de publicaciones (Arjmandi et al., 2002; Morabito et al., 2002; Atkinson et al., 2004).

En este aspecto, Kardinaal y colaboradores proponen que la velocidad de pérdida de hueso está inversamente asociada con la excreción urinaria de fitoestrógenos (Kardinaal et al., 1998). Por otro lado, en modelos animales se han demostrado los posibles efectos positivos de las isoflavonas sobre la pérdida de hueso (Arjmandi et al., 1996; Anderson et al., 1998). En las mujeres

menopáusicas se ha visto que la intervención con isoflavonas inhibe significativamente la resorción ósea y estimula su formación. Y que estos efectos favorables se producen incluso si el consumo es inferior a 90 mg /día de isoflavonas o la intervención dura menos de 12 semanas (Ma et al., 2008b).

En contraste con estos estudios, otros no mostraron ningún efecto sobre la salud ósea de las mujeres posmenopáusicas (Kreijkamp-Kaspers et al., 2004; Brink et al., 2008; Kenny et al., 2009). Por lo que la dosis óptima y los componentes de isoflavonas con respecto a la salud ósea no son todavía concluyentes.

Cáncer

El mecanismo mediante el cual los fitoestrógenos exhiben su potencial anticancerígeno se debe primordialmente a la inhibición de ciertas enzimas, como son: DNA topoisomerasas I y II, tirosina kinasa, kinasa ribosómica S6, y aromatasas; todas implicadas en la diferenciación y crecimiento tumoral (Akiyama et al., 1987; Markovits et al., 1989; Knight et al., 1996; Murkies et al., 1998). Además, las isoflavonas han mostrado, en muchos estudios, inhibir la angiogénesis (Fotsis et al., 1993) y la progresión del ciclo celular (Traganos et al., 1992; Matsukawa et al., 1993; Higashi et al., 1994), así como bloquear la proliferación de células humanas de cáncer de mama RE(+) (positivas para receptores estrogénicos) (Barnes 1995).

La mayoría de los estudios han analizado el consumo de alimentos ricos en soya y su relación con el cáncer de mama (Cohen et al., 1993; Messina et al., 1994; Horn-Ross 1995; Murkies 1998; Wu et al., 2008; Shu et al., 2009; Zhong et al., 2012), ya que se ha visto en estudios epidemiológicos que las mujeres japonesas y chinas, además de tener una incidencia más baja de ésta patología, cuando la desarrollan presentan un mayor número de tumores *in situ*, tienen menos metástasis ganglionares, y aquellas con metástasis tienen menos probabilidad de tener tres o más ganglios afectados (Cohen et al., 1993; Knight et al., 1996). Uno de los ensayos clínicos más ilustrativos al respecto fue el

conducido por Ingram y colaboradores en 1997, quienes realizaron un estudio de casos y controles, donde comparan 144 mujeres con cáncer de mama recientemente diagnosticado con mujeres sanas, encontrando que la excreción urinaria de isoflavonas medida durante 3 días consecutivos era significativamente menor en las mujeres que desarrollaron cáncer de mama (Ingram et al., 1997). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de un efecto antiestrogénico y anticancerígeno a nivel del tejido mamario.

También se ha descrito la relación inversa entre el consumo de fitoestrógenos y la incidencia de otros cánceres como próstata (Ross et al., 1992; Magee et al., 2004; Hwang et al., 2009; Travis et al., 2009) o cáncer de colon (Toyomura et al., 2002; Bobe et al., 2008).

Sistema nervioso

Son pocos los estudios que se han hecho al respecto pero se cree que los fitoestrógenos pueden mejorar las capacidades cognitivas (Lee et al., 2005; Karvaj et al., 2007).

Algunas investigaciones que han evaluado el efecto de los fitoestrógenos de soja sobre la cognición en ratas hembras ovariectomizadas jóvenes y de mediana edad, han puesto de manifiesto los beneficiosos efectos de la suplementación con soja sobre el hipocampo mejorando las tareas de memoria y aprendizaje (Monteiro et al., 2008; Lee et al., 2009).

Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que los fitoestrógenos, en concreto la genisteína, podrían prevenir la aparición de la enfermedad de Alzheimer al prevenir la formación de oxidantes por la mitocondria y protegerla del citotóxico β -amiloide (Vina et al., 2007b).

1.8.9 Fitoestrógenos y longevidad

Se ha implicado el alto consumo de soja en la longevidad de los japoneses, especialmente en la población de la isla Okinawa, con alto porcentaje de centenarios (Sho 2001).

El efecto de los fitoestrógenos sobre la longevidad se postula desde su capacidad de mimetizar los efectos beneficiosos del estrógeno, de los que cabe destacar la inducción de genes antioxidantes, a veces nominados genes relacionados con la longevidad (Vina et al., 2008).

En nuestro laboratorio, estudios *in vitro* mostraron que la genisteína, el fitoestrógeno más abundante de la soja, induce la expresión de la MnSOD a través del mismo mecanismo que los estrógenos, activando receptores estrogénicos y las vías de señalización de las MAPK y NFκB (Borras et al., 2006).

No obstante, estudios *in vivo* han demostrado lo contrario. En *Drosophila melanogaster* se ha encontrado una correlación negativa entre la concentración de genisteína ingerida y la longevidad (Altun et al., 2011). Efecto negativo sobre la supervivencia, también, se ha encontrado en ratas hipertensas tratadas con isoflavonas (Gilani et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis consiste en determinar el efecto del consumo de soja sobre la longevidad de ratones OF1 machos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la edad y del consumo de soja sobre la ingesta de comida y el peso corporal.
2. Determinar el efecto del consumo de soja sobre el perfil metabólico en plasma y en mitocondrias hepáticas aisladas.
3. Determinar el efecto de la edad y del consumo de soja sobre la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas aisladas.
4. Determinar el efecto de la edad y del consumo de soja sobre marcadores de estrés oxidativo de lípidos y proteínas en mitocondrias hepáticas aisladas.
5. Determinar el efecto de la edad y del consumo de soja sobre genes antioxidantes en tejido hepático.
6. Determinar el efecto de la edad y del consumo de soja sobre el consumo cerebral de glucosa *in vivo*.
7. Determinar el efecto del consumo de soja sobre la tolerancia a la glucosa oral y la función hepática.
8. Determinar el efecto del consumo de soja sobre la cognición y la integridad neuromuscular.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Animales de experimentación

Para la presente tesis empleamos ratones OF1 machos, que se mantienen 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.

Durante todo el experimento los ratones están controlados diariamente por la veterinaria, que vela para que se cumplan estrictamente los principios que marca el Real Decreto 1201/2005 (BOE 21 de Octubre 2005) sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos, y siguiendo las recomendaciones de FELASA (Federación Europea de animales de laboratorio).

El procedimiento experimental ha sido aprobado por El Comité de Ética en Investigación de la Universitat de València (A1282330236050).

Además, se registra su peso corporal y su consumo de comida semanalmente. En cuanto al agua, que es corriente y autoclavada, no hay restricción en su ingesta.

a. Curva de longevidad en ratones OF1 machos alimentados con dieta sin o con soja

Se emplearon un total de 157 ratones albinos machos de la cepa OF1. Se dividieron en dos grupos experimentales según la dieta, un grupo de 81 ratones alimentados con dieta sin soja y el otro de 76 ratones con dieta rica en soja.

Esta cepa de ratones OF1, en el caso de los machos, se caracteriza por su agresividad a partir de las 6 semanas de edad y se ve incrementada con el envejecimiento. De hecho, empezamos con igual número inicial de ratones en ambos grupos, pero al inicio del estudio se mataron entre ellos cinco del grupo alimentado con soja. Entonces decidimos estabularlos individualmente.

Las dos dietas que se han empleado han sido suministradas por Teklad Global Rodent Diets[®], de la casa comercial Harlan Laboratories, con certificado ISO9001-2000. (Tabla 3.1):

- Dieta rica en soja (2018 Global 18% Protein Rodent Diet)
- Dieta sin soja (2018 Global 18% Protein Rodent Diet) especialmente preparada para nosotros.

	Dieta rica en soja	Dieta sin soja
Ingredientes	<ul style="list-style-type: none"> - Trigo molido - Maíz molido - Harina de gluten de maíz - Harina de soja - Levadura de cerveza 	<ul style="list-style-type: none"> - Trigo molido - Maíz molido - Harina de gluten de maíz - Levadura de cerveza
Lípidos	6%	6%
Proteínas	18%	18%
Fuente de grasa	Aceite de soja*	Aceite de soja*
Energía	3.1 kcal/g	3.1 kcal/g
Isoflavonas	150-250 mg/kg	ND - 20 mg/kg
<i>* Aceite de soja no contiene isoflavonas</i>		

Tabla 3.1.- Composición de las dietas.

3.1.2 Aparatos

➤ Balanzas

- Balanza de precisión SARTORIUS, modelo 6110 balance, sensibilidad ± 0.0001 g.
- Balanza de precisión SARTORIUS, modelo aculab, sensibilidad ± 0.0001 g.
- Balanza Gram *precision*, modelo AHZ, sensibilidad ± 0.01 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.
- Centrífuga Sigma, modelo 1-14.
- Centrífuga HETTICH, rotina 35 R para tubos eppendorfs.
- Centrífuga de placas, marca EPPENDORF, modelo Centrifuge 5430.

➤ Espectrofotómetros

- Marca CECIL, modelo CE 3021. 3000 Series.
- Marca Thermo SCIENTIFIC, modelo NANO DROP 2000 Spectrophotometer.
- Marca MOLECULAR DIVICES, modelo SPECTRA max PLUS 384.

➤ pHmetro

- Marca CRISON, modelo GLP21.

➤ Fluorímetro

- Marca PERKIN ELMER, modelo LS 50B.

➤ **Homogeneizador**

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

➤ **Autoclave**

- Marca SELECTA, modelo Autester-G.

➤ **Equipo de ultrasonidos**

- Marca SONICS, modelo Vibra-cell.

➤ **Sistema de purificación de agua**

- Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-R.
- Marca ELGA, purelab flex.

➤ **Fuentes de alimentación de electroforesis**

- Marca BIO-RAD, modelo PowerPac Basic.

➤ **Cubetas de electroforesis**

- Marca BIO-RAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell.

➤ **Cubetas de electrotransferencia**

- Marca BIO-RAD, modelo mini Trans-Blot Cell.

➤ **Sistema de digitalización y análisis de imágenes**

- Marca FUJIFILM, modelo LAS-1000plus.

➤ **Agitador magnético**

- Marca Selecta, modelo Agimatic-S.

➤ **Agitador orbital**

- Marca Heidolph Instruments, modelo Polymax 1040.

➤ **Congeladores**

- -80°C marca Revco, modelo ultima II.

- -80°C marca Platinum 500.
- -20°C marca Liebherr, modelo Comfort Nofrost.
- 4°C Nevera Lynx.

➤ **Baño seco**

- Marca Stuart, Block heater, SBH 130 D.

➤ **Baño termostatzado**

- Utilizamos un baño provisto de agitación automática regulable, marca SBS modelo BT.

➤ **Termocicladores**

- Marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp[®] PCR System 9700.
- Marca Applied Biosystems, modelo 7900HT Fast Real-Time PCR System.

➤ **Campanas de flujo laminar**

- Marca BURDINOLA, modelo OR-ST 1200.
- Marca Crumair.

➤ **Cromatógrafo líquido de alto rendimiento (UPLC)**

- Sistema de Waters Acquity ultraperformance liquid chromatography (Waters, Milford, MA).

➤ **Cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) para la determinación de MDA**

El cromatógrafo de la marca DIONEX y modelo UltiMate 3000.

La técnica de cromatografía se realiza en condiciones isocráticas, siendo la fase móvil una mezcla de KH_2PO_4 50mM (pH 6.8) y acetonitrilo (70:30). Columna: C16 5 μm 120 Å (4.6 x 150 mm).

➤ **Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de 14.1 Teslas**

Bruker Avance DRX 600 (Bruker Biospin GmbH) equipado con sondas de 5mm (500 µL de muestra) y de 1mm (20 µL de muestra) con capacidad de detección de $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$.

➤ **Robot SampleJet** (Bruker Biospin GmbH) con capacidad para muestreo automático de 480 tubos.

➤ **Equipo de Tomografía de Emisión de Positrones (PET) Tomografía Axial Computerizada (CT)**

- Cámara PET para animales pequeños de 4 módulos marca Albira (GEM Imaging – Oncovision).
- Equipo de anestesia por vía inhalatoria (Cibertec) con vaporizador Fortec (Cyprane Keighley) para isoflurano-oxígeno y eliminador de gases Fluovac.
- Actímetro Dose calibrator ISOMED 1010 (Nuklear Medizintechnik Dresden GmbH).

➤ **Glucosímetro “Accutrend GC”. Roche**

- Marca Roche, modelo Accutrend GC.

➤ **Dispositivo fotográfico y video**

- Marca Canon, modelo IXUS 115HS.

➤ **Test de reconocimiento de objetos nuevos**

- Caja rectangular (60 x 55 x 45 cm) de PVC translúcida.
- Tres pares de objetos diferentes en color, forma y textura.
- Dispositivo de vídeo.

➤ **Test de coordinación motora**

- Construimos artesanalmente, y siguiendo instrucciones (Matheu et al., 2007), una caja rectangular con las siguientes medidas (60

cm x 30cm x 25 cm) y de forma diagonal a esta caja colocamos una cuerda circular de goma (60 cm de largo y 1.2 cm de diámetro).

- Cronómetro.

➤ **Aparato medidor de la fuerza de agarre**

- “Grip Strenght Meter” De la marca Bioseb.

➤ **Material quirúrgico**

- Tijeras, pinzas, agujas, jeringas...

3.1.3 Reactivos

➤ **Determinación de proteínas**

- Se empleó el “Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson’s Modification” de Sigma-Aldrich, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin.
- También empleamos el “Bradford Reagent” de BIO-RAD.

➤ **Proteínas carboniladas**

- Kit OxyBlot protein oxidation detection kit de Millipore.

➤ **Revelado y detección de las proteínas con *Western blotting***

- Kit de quimioluminiscencia Luminol/ECL™ (Amersham Pharmacia, USA).

➤ **Aislamiento de RNA total**

- Se utilizó el kit TRIZOL® Reagent (Invitrogen™).

➤ **Retrotranscripción**

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits de Applied Biosystem.

➤ **Amplificación (RT-PCR cuantitativa)**

- Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) de Fermentas.

➤ **Función hepática:**

- Zoxazolamine (Sigma-Aldrich A45807).
- Aceite de maíz.
- Dimetilsulfóxido (DMSO).

➤ Enzimas

- Peroxidasa de rábano, Roche 10108090001.
- Transcriptasa reversa: MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystem).
- Glutación reductasa (Sigma-Aldrich).
- Glucoronidasa/sulfatasa H1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

➤ ¹⁸F-Fluorodesoxiglucosa (FDG)

- ¹⁸F-Fluorodesoxiglucosa (FDG) “Fluodos” proporcionada por Redpet Ibérica, S.A.

➤ Anestesia

- Isoflo[®], Veterinaria Esteve.

➤ Analgesia

- Ketoprofeno (Ketofen 1%[®], Merial, Francia).

➤ Otros reactivos químicos

- KOH, GSH, MDA, H₂O₂, fosfato potásico, cloruro sódico, EDTA, EGTA, MOPS, KH₂PO₄, HEPES, TEMED, BSA, leche, Tween 20, amino persulfato, PBS, TBS, tris, glicina, acrilamida/bisacrilamida, metanol, β-Mercaptoetanol, ácido acético, sacarosa, ácido clorhídrico, dodecil sulfato sódico, azul de bromofenol, azul comassie, cóctel inhibidor de proteasas, rojo ponceau, trizol, isopropanol, cloroformo, etanol 70%, NADPH, NaHCO₃, azida sódica, manitol, cianuro potásico, acetonitrilo, citrato sódico, etc.
- El resto de reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A., Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Curva de longevidad en ratones OF1 machos

La curva de supervivencia (o curva de longevidad) consiste en un trazado del número o porcentaje de individuos que sobreviven en la población estudiada, desde el inicio del estudio hasta que muera el último miembro de la población.

Para la construcción de la curva, se cuentan las bajas por muerte cada día. Los datos se introducen en una hoja “Excel”, en la cual se combinan los porcentajes de supervivencia con los días o semanas de vida correspondientes.

Grupo experimental	Nº total de ratones
NO SOJA	81
SOJA	76
TOTAL	157

Tabla 3.2.- Resumen del procesamiento de los animales de la curva de longevidad.

3.2.2 Control de la ingesta de comida y del peso corporal

Hacemos un seguimiento de la ingesta de comida y del peso corporal, semanales, a lo largo de toda la curva de longevidad.

El consumo de agua es *ad libitum*.

a. Control de la ingesta de comida

En cuanto al control de la ingesta de la comida, tenemos dos periodos:

- Hasta la semana 44 la ingesta es ad libitum.
- A partir de la semana 45 se controla el consumo diario de todos los ratones de la curva y les administramos 7 gramos de comida, pesando los restos diarios hacemos la media del consumo semanal de cada grupo para diferenciarlos.

b. Control del peso corporal

Comenzamos a pesar a los ratones a partir de la semana 23 de edad ya que antes no disponíamos de báscula adecuada:

- De la semana 23 a la 51, pesamos seis ratones de cada grupo experimental.
- De la semana 52 a la semana 56, no se pudieron pesar los ratones por problemas técnicos.
- De la semana 57 a la semana 98 se pesan once ratones de cada grupo.

3.2.3 Sacrificio de los animales. Extracción y conservación de muestras

A lo largo de la curva de supervivencia, se realizan sacrificios de 5 ratones de cada grupo a diferentes puntos de la curva.

- Al 100% de supervivencia: los ratones son jóvenes, de cinco meses de edad.
- Al 80% de supervivencia del grupo control: los ratones tienen un año de vida y es un punto de inflexión en la curva.
- Al 50% de supervivencia del grupo control: es un dato estadístico importante en estudios poblacionales, también

llamado “vida media”. En nuestra curva corresponde a los 17 meses de edad.

- Al 10% de supervivencia del grupo control donde los ratones ya son viejos. Próximo a la vida máxima. En nuestro caso, los ratones tienen veintidos meses y medio de edad.

Los animales se sacrifican entre las 9:00 y 10:00 horas de la mañana del día correspondiente. El sacrificio se realiza por dislocación cervical del animal, sin utilizar ninguna sustancia anestésica y/o tranquilizante, de la forma más rápida posible para evitar el sufrimiento del animal.

Una vez sacrificado, se procede inmediatamente a recoger sangre en un tubo heparinizado. Seguidamente, se realiza la apertura del cráneo para la extracción del cerebro y a la apertura de la cavidad abdominal para extraer el hígado, los pulmones, el corazón, los riñones, la aorta y el músculo gastrocnemio. Todos los órganos se congelan inmediatamente mediante la técnica del freeze-clamping en nitrógeno líquido (-196°C) para su posterior conservación a -80°C; con la excepción de dos terceras partes del hígado que se utiliza inmediatamente para determinar la producción de peróxido de hidrogeno, previo aislamiento de sus mitocondrias.

3.2.4 Determinación de la concentración de isoflavonas en plasma

Puesto que la única variable de nuestro estudio es la ingesta o no de isoflavonas en la dieta, es importante comprobar sus niveles circulatorios para así atribuir los posibles cambios a dichos compuestos, teniendo en cuenta que su metabolismo depende de varios factores y no solamente de su ingesta.

a. Extracción y purificación de las isoflavonas presentes en muestras de plasma

Para la extracción de los metabolitos (y con ellos, la extracción de las isoflavonas) de las muestras de plasma nos basamos en un artículo previo (Williams et al., Journal of AOAC International 2006). Partimos de 100 μL de plasma donde añadimos estándares deuterados de daidzeína y genisteína (en concreto daidzeína-d4 y genisteína-d4 (Cluzeau Info Labo, Sainte Foy la Grande, France) para mejorar la cuantificación posterior. El primer paso necesario es la desproteinización de la muestra añadiendo 100 μL de acetonitrilo (Carlo Erba), vortexamos y finalmente centrifugamos 2 minutos a 12000 g. Nos quedamos con el sobrenadante (donde están los metabolitos). Como las isoflavonas en plasma se encuentran básicamente conjugadas en forma de glucurónidos o unidas a grupos sulfato se requiere tratamiento enzimático para liberar las moléculas. Esto se consigue incubando el sobrenadante con 950 μL de citrato sódico 25 mM pH 5 que contiene 2.3 unidades de glucoronidasa/sulfatasa H1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) durante dos horas a 37°C.

En este punto tenemos las isoflavonas libres en las muestras. Debido a las bajas concentraciones de éstas en plasma, es difícil detectarlas sin purificarlas previamente. Para purificar las muestras se realiza una extracción de fase sólida utilizando Bond Elut C18 96 round-well plate (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) que se conecta a una bomba de vacío. Antes de empezar la purificación, es necesario equilibrar la fase de las columnas de purificación. Para ello se hace pasar 1 mL de acetonitrilo seguido de 1 mL de citrato sódico 25 mM pH 5. Posteriormente, se pasa la muestra seguida de 1 mL de agua y 1 mL de 10% metanol. La recolección de muestra se realiza pasando 200 μL de acetonitrilo 5% ácido fórmico 6 veces. Sólo se recoge el eluido de ésta última parte (200*6 μL). El eluido se evapora en un Speed Vac y se resuspende en 50 μL de agua

0.1% ácido fórmico/acetonitrilo (60/40, v/v). Antes de inyectar al cromatógrafo se filtra con eppendorf UltraFree 5 kDa (Millipore, Billerica, MA).

b. Detección y cuantificación de isoflavonas

Para la detección y cuantificación de genisteína, daidzeína y equol, 15 μ L de la muestra resultado del procesamiento descrito en el apartado anterior se inyecta a un cromatógrafo líquido de alto rendimiento (UPLC, *ultraperformance liquid chromatography*) utilizando un sistema Waters Acquity ultraperformance liquid chromatography (Waters, Milford, MA) equipado con un sistema de bomba binaria (Waters, Milford, MA) y utilizando una columna Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 * 50 mm) (Waters, Milford, MA). La fase móvil A esta compuesta por agua con 0.1% de ácido fórmico y la fase móvil B es acetonitrilo. La cursa empieza con 40% de fase móvil B y se mantiene durante 1.2 minutos, del minuto 1.21 al 2.5 se mantiene 100% B y finalmente se reequilibra el sistema a 40% B desde el minuto 2.6 al 3.5.

El sistema UPLC está acoplado a un espectrómetro de masas TQD (Waters, Milford, MA) utilizando un spray Z con fuente electrospray (ESI, electrospray ionization) operando en modo positivo. Las condiciones de trabajo de la fuente de ionización se especifican a continuación: voltaje capilar: 3 kV, temperatura de la fuente: 150°C, temperatura de desolvatación: 350°C. Se utiliza nitrógeno (>99% pureza) como gas de nebulización y argón (>99% pureza) como gas de colisión. La adquisición de datos se lleva a cabo con el software MassLynx v 4.1. Las condiciones MRM optimizadas son las siguientes: 254.9 -> 199.0 para daidzeína, 270.9 ->214.9 para genisteína, 249.9 ->132.9 para equol, 259.0 ->203.0 para daidzeína-d4 y 275.0 ->218.9 para genisteína-d4. La cantidad de producto se expresa en nmolar de genisteína, daidzeína y equol. Se ajusta con su estándar interno deuterado respectivo.

3.2.5 Aislamiento de mitocondrias hepáticas

Según la teoría mitocondrial de radicales libres, las mitocondrias constituyen la fuente principal de estas sustancias en el seno de las células, y los daños producidos por ellos, asociados al envejecimiento, se centran fundamentalmente en los componentes mitocondriales (Miquel et al., 1980). Por lo que en la presente tesis, a partir del extracto mitocondrial de tejido hepático, determinamos una serie de parámetros de estrés oxidativos, defensa antioxidantes además de analizar el perfil metabólico en estas organelas.

a. Fundamento

Basándose en el diferente peso de los componentes celulares, la fuerza de la gravedad de la centrifuga y la densidad del tampón utilizado, es posible por sucesivas centrifugaciones a distintas fuerzas, aislar las mitocondrias a partir del homogenado de un tejido.

b. Reactivos

- Solución de lavado: NaCl 0.9% (p/v)
- 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% (v/v) hasta alcanzar pH=7.4.

c. Procedimiento

Una vez extraído el hígado, 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 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 un tubo de centrífuga. (NOTA: 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 colaboradores, en 1987 (Rickwood et al., 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 igualmente a 1000 g durante 10 minutos a 4°C para obtener un óptimo rendimiento 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 a la sedimentación de las mitocondrias, obteniendo por tanto un precipitado rico en mitocondrias que lavamos en sucesivas centrifugaciones. 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 µL/mg o 20 µL/mg de sedimento mitocondrial respectivamente. De este modo obtenemos una suspensión mitocondrial más o menos diluida en función de la determinación a realizar.

En este, el sedimento mitocondrial fue resuspendido en tampón de aislamiento para tomar las siguientes alícuotas (en tubos eppendorf):

- 250 µL para medir la producción de peróxido de hidrógeno (en el mismo día).
- 100 µL para medir MDA. Congelar a -80°C.
- 50 µL para medir metabolómica. Congelar a -80°C.

- El resto para medir proteínas, proteínas carboniladas. Congelar a -20°C.

3.2.6 Determinación del perfil metabólico en plasma y en mitocondrias hepáticas aisladas, mediante resonancia magnética nuclear (^1H RMN)

Con muestras de plasma y suspensión mitocondrial obtenidas del homogenado hepático, de los ratones sacrificados en los cuatro puntos de la curva de supervivencia, se procede a realizar un estudio metabólico mediante espectroscopia de ^1H RMN y análisis multivariable para analizar los perfiles metabólicos, comparar los dos grupos y su evolución con la edad.

Los equipos de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución (HR-NMR, del inglés, *high resolution nuclear magnetic resonance*) permiten realizar una exploración de todos los analitos de bajo peso molecular (metabolitos) presentes en distintos tipos de biofluidos (ej. suero y/u orina) o en tejidos tanto de humanos como de modelos animales.

a. Fundamento

La metabolómica tiene como objetivo el análisis, en la muestra biológica analizada (en este caso mitocondrias hepáticas), de las pequeñas moléculas que son producto del metabolismo. Esta información puede resultar fundamental para la comprensión de las rutas metabólicas y procesos bioquímicos característicos del sistema en estudio, ya que habitualmente los compuestos medidos representan los productos finales del metabolismo (Robertson 2005; Robertson et al., 2005; Lenz et al., 2007). La espectroscopia de RM permite medir el contenido de protones en muestras biológicas complejas de moléculas de pequeño peso molecular. El espectro de ^1H da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto

da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalarmente.

b. Procedimiento

La preparación de la muestra para realizar la espectrometría de RM consiste en descongelar una alícuota de 25 μL de muestra. A cada muestra se le añaden 5 μL de D_2O y se centrifugan a 10000 rpm durante 10 minutos a 20°C . Una alícuota de 20 μL es tomada del sobrenadante y colocada en un tubo de 1 mm para RMN de alta resolución (Bruker Biospin GmbH). Todos los espectros se obtienen con un Espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Valencia, España) operando a una frecuencia ^1H de 600.13 MHz. El instrumento está equipado con una sonda de 1 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. Las muestras se colocan en un Robot SampleJet con control de temperatura que mantiene a las mismas a 4°C hasta el momento de su medida (no más de 1 hora de espera). Una vez en el espectrómetro, se espera un tiempo total de 3 minutos para que la temperatura de la muestra alcance 37°C estables antes de que los espectros sean adquiridos. Se mide un experimento de pulso-adquisición con pre-saturación del agua para todas las muestras. Para evitar efectos sobre la intensidad de la señal diferente de la cantidad de metabolito, se prefieren experimentos de un solo pulso sin filtrar antes que secuencias de pulso filtradas. Se usa una pre-saturación durante 1 segundo a lo largo del periodo de reciclado para la supresión de la señal del disolvente. La anchura de todos los espectros es 8000 Hz para ^1H . Antes de la transformación de Fourier, la FID (free induction decay) se multiplica por una ventana exponencial de 0.3 Hz. Se realiza un referenciado del desplazamiento químico sobre la señal del doblete CH_3 de la alanina a 1.475 ppm en todos los espectros.

c. Análisis de datos y cálculos

Todos los espectros se procesan usando MNova (MestreLab S.A., 2008, Santiago de Compostela) y se transfieren a MATLAB (MathWorks Inc, 2006) usando sus secuencias para el análisis de datos. Se investiga la región de desplazamiento químico incluyendo las resonancias entre 0.50 y 4.70 ppm (región alifática) y 5.20 a 10.00 ppm (región aromática). Los espectros se normalizan al área espectral total alifática para eliminar las diferencias en la concentración de las muestras.

Los espectros están diezmados en cubos de 0.01 ppm y se realiza el análisis estadístico usando las secuencias propias de MATLAB y la librería de análisis estadístico multivariable PLS_Toolbox. Las columnas están centradas a la media antes del análisis multivariable. Se aplica un Análisis de Componentes Principales (PCA) al conjunto de vectores espectrales, ya que es capaz de representar estructuras de datos multivariable complejas en un espacio de dimensiones reducidas conservando la estructura de los datos. Se usan los diagramas de carga de los componentes principales correspondientes para detectar las posiciones de los metabolitos más relevantes. El método de selección para las posiciones relevantes incluye una comparación entre la carga de cada columna y el valor medio en todos los espectros. Las columnas con factores de carga más grandes que los valores espectrales medios son seleccionados como relevantes. Las señales de estos metabolitos señalados se integran y se cuantifican usando secuencias de ajuste de picos semi-automáticas de MATLAB. Estas secuencias de ajuste se basan en los procedimientos de optimización de Lavenberg- Marquardt. La función objetivo para la optimización incluye medidas de espectros experimentales para soluciones estándar de los metabolitos seleccionados con patrones de multiplete complejo y señales de curva Lorentziana generadas teóricamente para aquellos metabolitos con patrones espectrales más simples. Se usa el análisis de varianza de una cola

para determinar la significatividad estadística de las integrales correspondientes a la media de los grupos control y experimental.

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

a. Fundamento

Utilizamos un método modificado a partir del desarrollado por Barja en 1999 (Barja 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 en estado 4, y el ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético), al ser excitado por un 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 (Figura 3.1).

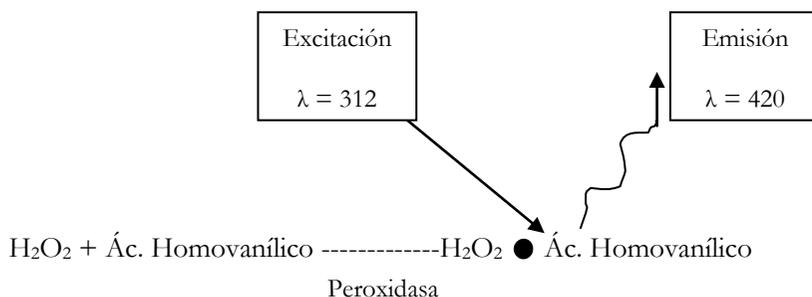


Figura 3.1.- Esquema de detección de peróxido de hidrógeno.

Las mitocondrias, una vez aisladas del tejido correspondiente, se incuban con sustratos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, nosotros usamos succinato 10 mM como sustrato del complejo II. Mediante fluorimetría

se realiza la determinación de la cantidad de dímero H₂O₂-ácido homovanílico a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

b. Reactivos

- Tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno: EGTA 0.1 mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgCl₂ 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 M, EDTA 50 mM, NaOH 2.2 M, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta ≥ 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 H₂O₂.
- 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.

c. Procedimiento

Una vez aisladas las mitocondrias, el precipitado mitocondrial se resuspende en tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno a razón de 20 μ L/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 μ L de peroxidasa de rábano 6 U/mL, 20 μ L de ácido homovanílico 0.1 mM, 20 μ L de succinato 10 mM 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 utiliza 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).

A continuación se preparan tubos de polipropileno aptos para centrifugar. Se necesita un tubo por cada tiempo de incubación a realizar (5, 10, 15, 20 minutos). 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.

d. 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 (Tabla 3.3):

Tubo	Peroxidasa (μL)	Ác.homovanílico (μL)	Tampón peróxidos (μL)	H ₂ O ₂ (nmol/mL)
1	5	20	1975	0
2	5	20	1975	1.0
3	5	20	1975	1.5
4	5	20	1975	2.0

Tabla 3.3.- 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 1000 μL 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 H₂O₂ se realizan a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno al 33.3% (p/v). Primero se realiza una dilución 1/10³ del peróxido de hidrógeno comercial en el mismo tampón que utilizamos para las muestras, y, a partir de ésta se obtiene una dilución 1/10⁵ de la comercial (también en este tampón). Esta será la solución que se utilizará para realizar los patrones de H₂O₂.

Para calcular con exactitud la concentración de la solución comercial de peróxido de hidrógeno debe medirse la absorbancia de la dilución 1/10³ a una longitud de onda de 230 nm (A₂₃₀) y, utilizando el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a esa longitud de onda (72.4 mM⁻¹ x cm⁻¹) y, mediante la siguiente ecuación, puede conocerse la concentración de H₂O₂ en cada tubo de la recta patrón:

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

3.2.8 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica en mitocondrias hepáticas aisladas

Para la determinación de los niveles de peroxidación lipídica utilizamos, como marcador de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído (MDA), que determinamos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

El MDA es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, un aumento de su rigidez y, por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares.

a. Fundamento

Se sigue el método descrito por Wong y colaboradores (Wong et al., 1987). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (MDA-TBA₂).

Esta reacción produce un cromógeno rosado con un máximo de absorción entre 532-535nm. Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además, de con el malondialdehído, se realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa del aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras.

b. Reactivos

- Tampón Acetato Sódico anhidro 2M, pH 3.5, con TBA 0.2%. Para preparar 1L se toman 119 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añaden a unos 600 mL de agua “mili-Q”. Se ajusta el pH hasta 3.5 con NaOH 10 M. A continuación se añade a la solución 2 g de

ácido tiobarbitúrico y se mantienen en agitación, a 50-60°C, hasta la total disolución del TBA. Se comprueba que el pH se mantiene y, si no es así, se vuelve a ajustar. Finalmente se afora el volumen a un litro y se guarda protegido de la luz a 4°C.

- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 6.8: Para 500 mL se pesan 3.4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con KOH 1 M hasta 6.8 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guarda a 4° C.
- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 3.5: Para 500 ml se pesan 3.4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con HCl 1 M hasta 3.5 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guarda también a 4° C.

c. Procedimiento

1. Recogida de la muestra

Al aislar las mitocondrias hepáticas, del sedimento mitocondrial resuspendido en tampón de aislamiento de mitocondria, guardamos 100 μL , a -80°C, para medir MDA.

2. Derivatización

Todas las muestras las preparamos en tubos tipo “eppendorf”.

- A 20 μL de muestra (o patrón) se le añaden 500 μL de Acetato Sódico 2M pH 3.5 + TBA 0.2%; se agita y se mantiene 60 minutos en un baño a 95 °C. Es en este paso donde se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de malondialdehído que se conjugan con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Una vez transcurrido ese tiempo se pone en hielo y se añaden 500 μL de la solución neutralizante (KH_2PO_4 60 mM pH 6.8).

Este paso es crítico ya que el aducto MDA-TBA₂ es inestable en el rango de pH neutro-básico, por lo que debe hacerse con rapidez.

- Se centrifuga a 13000 g durante 5 minutos a 4 °C.
- Se tomar 200 µL del sobrenadante y se mezclan con 200 µL de tampón KH₂PO₄ 50mM pH 3.5.
- Se inyectan 80 µL del sobrenadante obtenido en el HPLC.

d. Preparación de las fases móviles para HPLC

Este es un método “isocrático” y necesitaremos 2 fases diferentes: la “fase de lavado” y la “fase de elución”:

- Fase de lavado (Fase B): está constituida por una mezcla de acetonitrilo/agua al 70%, ambos de máxima pureza y el agua del tipo “mili-Q”.
- Fase de elución (Fase A): La sal que contiene esta fase es KH₂PO₄ 50mM, pH 6.8. La relación es de 83/17 (KH₂PO₄ 50mM, pH 6.8 / acetonitrilo).

El modo de preparación es el siguiente:

1. Pesar 13,6g de KH₂PO₄ y disolverlos en unos 1800 mL de “agua mili-Q”
2. Ajustar el pH de esta disolución con KOH 1M.
3. Enrasar hasta 2000 mL.
4. Añadir 410 mL de acetonitrilo. Esta solución debe homogenizarse bien.
5. La solución debe filtrarse, mediante bomba de vacío y filtro de 0,22 micras.

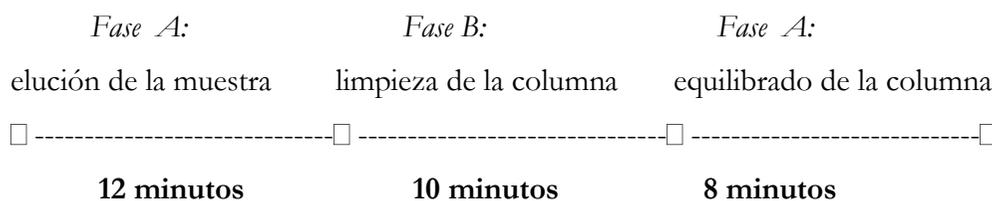
Antes de pasar por el HPLC, ambas fases deben desgasificarse por baño de ultrasonidos durante 20 minutos.

e. Condiciones cromatográficas

1. Flujo de las fases: 1.0 mL/min
2. Detección en HPLC: se utiliza el detector UV visible a $\lambda=532$ nm.
3. Columna DIONEX Acclaim Polar advantage. C16 5 μ m 120 Å, 4.6x150mm

f. Método cromatográfico

Al ser un método isocrático, sólo necesitamos programar el tiempo que va a estar pasando cada una de las fases líquidas correspondientes. Un cromatograma conlleva unos 30 minutos y la secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la siguiente:



g. Cálculos

El área del pico correspondiente al aducto MDA- TBA₂ se valora frente a una recta patrón construida con MDA-bis de concentraciones conocidas. En nuestro caso la recta patrón se hace a partir de las siguientes concentraciones de MDA-bis: blanco; 5 μ M; 12.5 μ M; 25 μ M; 50 μ M, 125 μ M, 250 μ M y 500 μ M.

3.2.9 Determinación de la concentración de proteínas

La absorción de luz por parte de una sustancia es una propiedad característica de cada sustancia, que puede ser utilizada para su identificación y cuantificación. Todas las sustancias absorben luz en alguna región del espectro electromagnético (VIS, UV, IR, etc.).

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: la propiedad de las proteínas para absorber luz en el UV, la formación de derivados químicos, o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

En ésta tesis hemos utilizado los métodos siguientes:

3.2.9.1 Método de Lowry

a. Fundamento

Se toma una cantidad de suspensión mitocondrial comprendida entre 50 y 100 μL y se conserva a -20°C hasta su posterior utilización. Empleamos el “Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson’s Modification” de Sigma-Aldrich, basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (Lowry et al., 1951; Peterson 1977). El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene dodecil sulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas.

El método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin, dando un complejo coloreado. Este reactivo es una disolución de tungstato sódico y molbidoato sódico en ácido fosfórico y clorhídrico. El mecanismo del proceso es el siguiente: el Cu^{2+} , en medio alcalino, forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas reduciéndose a Cu^{+} . Este ión, así como los grupos R de los residuos de tirosina y triptófano de las

proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin, produciéndose inicialmente un producto inestable que se reduce para formar un compuesto coloreado azul.

La intensidad del color depende de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y será proporcional a la concentración de proteínas de la disolución.

La concentración de una disolución no conocida se calcula extrapolando en una recta patrón la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 660 nm.

b. Reactivos

Reactivo Lowry:

- Preparado a partir del reactivo comercial Lowry Reagent, Powder
- Añadir 40 mL de agua a la botella de reactivo
- Mezclar hasta disolver por completo.

Reactivo Folin:

- 90 mL de agua + 18 mL de la solución Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent en una botella opaca.
- Guardar a temperatura ambiente.

c. Procedimiento

- Previamente construimos una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA. (Tratarla como el resto de las muestras)
- Añadir 10 μL de muestra a un tubo eppendorf con 490 μL de agua bidestilada. (previa dilución 1/10 en el caso de mitocondrias resuspendidas en tampón de aislamiento)

- Añadir 500 μL del reactivo de Lowry a cada tubo, agitar en el vórtex e incubar durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
- Añadir 250 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.

d. Cálculos

Se valoran frente a la recta patrón construida con seroalbúmina bovina en cantidades comprendidas entre 0,1 y 10 mg/mL.

3.2.9.2 Método de Bradford

a. Fundamento

Se utiliza el “Bradford Reagent” de la firma BIO-RAD (Bradford 1976).

La unión de las proteínas con el reactivo de Bradford produce un cambio en el color del reactivo, y por tanto un cambio en su absorbancia. El reactivo Bradford contiene ácido fosfórico, metanol y también azul de comassie que al unirse a los residuos aminoácido de proteínas y en especial a la arginina, cambia su máximo de absorbancia de 465 a 595 nm.

b. Reactivos

- Agua milli-Q
- Bradford Reagent (BIO-RAD)
- Homogenado de tejido
- BSA (seroalbúmina bovina): Para realizar la recta patrón

c. Procedimiento

Se realiza una recta patrón de BSA, para posteriormente interpolar nuestras muestras de concentración desconocida. Se mezclan 800 μL de H_2O con 200 μL de Bradford. Se lee la absorbancia a 595 nm de cada microcubeta para hacer el blanco. Después se le añade 2 μL de muestra o patrón, según corresponda en cada microcubeta y se lee la absorbancia a 595nm. Ésta debe haber aumentado gracias a la unión del Bradford con las proteínas que contiene la muestra y la recta patrón.

d. Cálculos

Los cálculos consisten en realizar una recta patrón de concentración de proteínas realizada con BSA e interpolar en esa recta los valores de absorbancia obtenidos de nuestras muestras. El valor que se utiliza para hacer la recta y para calcular la concentración de las muestras es:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$$

3.2.10 *Western blotting*

a. Fundamento

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida, se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) en condiciones desnaturizantes. Para la realización de esta técnica es imprescindible que las proteínas se encuentren completamente desnaturizadas. Para ello, utilizamos dos agentes desnaturizantes, el dodecil sulfato sódico (SDS) como detergente y el β -mercaptoetanol como agente reductor, que provoca la rotura de los puentes disulfuro. De este modo obtenemos proteínas en su estructura primaria.

En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas enlazan 1.4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Con esto tendremos la misma densidad de carga, que va a ser prácticamente constante y sólo difieren en su longitud, de acuerdo con el tamaño de la proteína. Por lo tanto, la separación se basa únicamente en el tamaño de la proteína. Además, todos los complejos proteína/SDS tendrán carga negativa y migrarán en el mismo sentido.

b. Preparación de las muestras

Después de determinar la concentración de proteínas en homogenados de hígado, procedemos a preparar las muestras en tampón de carga de proteínas (Tris 40 mM pH 6.8, EDTA 4 mM, sacarosa 40% (p/v), SDS 4% (p/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v)) en una razón de 1/1. Este compuesto sirve para mejorar la conservación de la muestra y teñirla para poder visualizarla en el gel. La sacarosa aumenta la densidad de las mismas. El azul de bromofenol es una molécula que por su bajo peso molecular migra muy rápidamente en el gel y por ello se utiliza como referencia para conocer el estado de la electroforesis.

c. Condiciones del gel y electroforesis

En primer lugar, se debe determinar cuál es el porcentaje más adecuado de acrilamida/bis-acrilamida que debe presentar el gel. En función del peso molecular de la proteína que se quiere determinar.

Para aumentar la resolución de estos geles es conveniente hacerlos discontinuos, es decir, se elabora un gel de concentración y un gel de separación de proteínas. El gel de concentración o *Stacking gel* posee un porcentaje bajo de acrilamida y un pH de 6.8, su misión es la de concentrar todas las proteínas en una banda lo más estrecha posible. El gel de separación separa las proteínas de

la muestra y posee un pH de 8.8, y su porcentaje de acrilamida dependerá de la proteína de interés.

Inicialmente, se preparan los geles de separación (H_2O , Tris-HCl 1.5 M, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida, APS 10%, TEMED). Se vierte esta solución entre los cristales, previamente montados y limpios, hasta un poco más de la mitad de la altura y sobre esta se añade agua destilada para aislar al gel del aire y favorecer su polimerización. Una vez polimerizado el gel, se retira el agua y se seca cuidadosamente con papel de filtro para añadir encima la solución del gel de concentración (H_2O , Tris-HCl 0.5 M, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida, APS 10%, TEMED). Enseguida se colocan los peines entre ambos cristales. Se retiran éstos cuando haya polimerizado el gel y se comprueba que los pocillos del gel, en los cuales se depositarán las muestras, se han formado correctamente.

Previamente a la carga de las muestras, se colocan los cristales en el soporte correspondiente dentro de la cubeta de electroforesis que se llena con tampón de electroforesis 1X a 4°C, cuya composición fue la siguiente (0.025 M Tris, 0.2 M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3).

Las proteínas junto con el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™, All blue standards, Bio-Rad) se calientan a 100°C durante 5 min, se agitan y se cargan en el gel. En todos los pocillos se carga la misma cantidad de proteínas (40 µg en un volumen de 30 µL) para poder realizar después el estudio comparativo.

A continuación, las proteínas se someten a un campo eléctrico según su tamaño y conformación. Los factores que determinan la separación de las proteínas son el porcentaje de acrilamida utilizado, la intensidad del campo eléctrico impuesto, el buen estado de todos los componentes del gel y el tamaño de los mismos, la carga neta y la conformación de las proteínas objeto de estudio.

d. Transferencia de las proteínas a un soporte sólido

Una vez finalizada la electroforesis, se comienza con la transferencia de las proteínas, “*blotting*”, a una membrana de polivinilideno difluoro (PVDF) de diámetro de poro de 0.2 μm (Bio-Rad). Al ser hidrófobas las membranas de PVDF, requieren un tratamiento previo con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas.

Los geles se montan en un sistema de “sándwich”. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cubeta, en la que se encuentra un tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3), con dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Y se coloca de tal forma que la membrana quede hacia el ánodo (Figura 3.2).

La transferencia puede llevarse a cabo durante una hora, con una intensidad constante de 280 mAmpereos y a temperatura ambiente. O si se desea, durante 12 horas, con una intensidad de 24 mA y a 4°C.

e. Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado

1. Tras la transferencia, las membranas se bloquean con solución de bloqueo: leche 5% en TBS-T (p/v) durante 60 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
2. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 mL de TBS-T.
 - TBS-T:
 - 0,1% Tween-20
 - En 1X TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6)
3. Las membranas se incuban, durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación orbital, con el anticuerpo primario (con las diluciones correspondientes en BSA 5% o leche 5% (p/v)) ver Tabla 3.4.

4. Se realizan 3 lavados de 5 minutos y uno de 15 minutos con TBS-T.
5. Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo a la concentración especificada por la casa.
6. Se realizan 3 lavados de 5 minutos y uno de 15 minutos con TBS-T.
7. Se procede a revelar las membranas mediante una reacción de quimioluminiscencia con el Luminol/ECL (Amersham Pharmacia, USA). Para ello se incuba cada membrana durante 1 minuto con dicho reactivo e inmediatamente se revela con un detector quimioluminiscente, mediante el programa Image GaugeV4.0 de FUJIFILM.

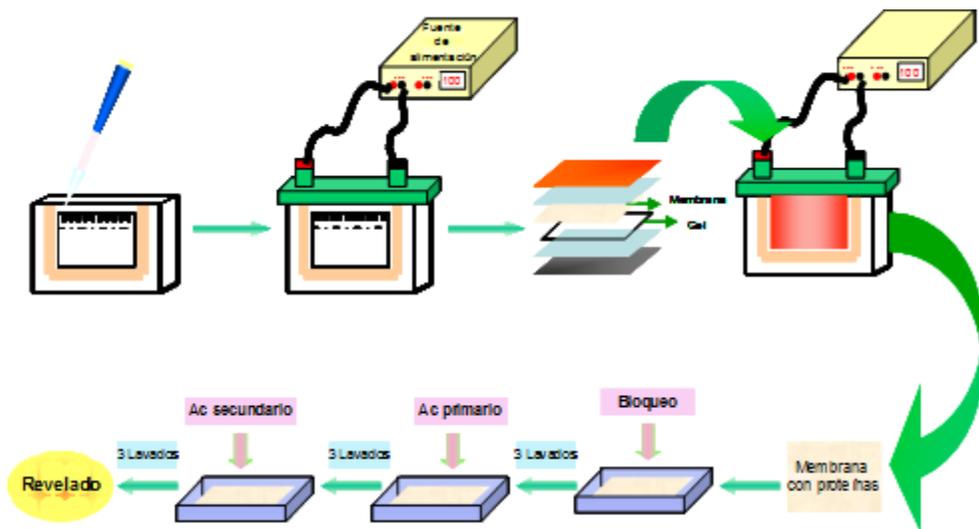


Figura 3.2.- Esquema de *western blotting*.

f. Cálculos

Las imágenes obtenidas se almacenan en formato digital TIF para poder realizar la densitometría utilizando el *software* FUJIFILM Image Gauge V4.0.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresan en función de los valores de la α -tubulina en tejido hepático.

Anticuerpo primario	Localización	kDa	Dilución	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Concentración
GPx	hígado	~22	1:300 a 1:1000 en BSA 5%	abcam	Rabbit IgG	1:2000 en BSA 5%
Mn-SOD	hígado	~25	1:1000 en leche 5%	Assay designs	Rabbit IgG	1:2000 en leche 5%
α -Tubulina	hígado	~55	1:1000 en leche 5%	Santa Cruz	Mouse IgG	1:10000 en leche 5%

Tabla 3.4.- Descripción de los anticuerpos utilizados para *Western blotting*.

3.2.11 *Western blotting* de proteínas carboniladas

a. Fundamento

El estrés oxidativo modifica la actividad de las proteínas y las hace más susceptibles a la degradación. Los radicales libres derivados del O_2 afectan a las proteínas modificando algunos aminoácidos, mediante la formación de puentes disulfuro en cisteína, o introduciendo grupos carbonilo (aldehídos y cetonas). Estos grupos carbonilo se pueden detectar por *Western blotting*. Al derivatizar las muestras con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) se marcan los grupos, y queda como 2,4-dinitrofenilhidrazona, para el cual hay anticuerpos.

b. Procedimiento

Excepto por la derivatización de las muestras, se procede de la misma manera que en el apartado 3.2.10.

▪ Proceso de derivatización

Para la derivatización de las muestras se utilizan los reactivos presentes en el kit (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit, MILLIPORE) así como el protocolo aconsejado por el fabricante.

1. Previamente determinada la concentración de proteínas en la suspensión de mitocondrias por el método de Lowry.
2. En tubos eppendorfs de 0,75 μ L: 5 μ L total de solución (20 μ g de proteínas + H₂O bidestilada). Alguna muestra se prepara por duplicado para tener control negativo.
3. Desnaturalizar todas las muestras añadiendo 5 μ L de SDS 12%. En el caso de que el volumen de la muestra exceda los 5 μ L, se corrige añadiendo menor volumen de SDS a mayor concentración.
4. Derivatizar las muestras con:
 1. 10 μ L de 1XDNPH a cada muestra
 2. 10 μ L de solución de derivatización control a los controles negativos.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. (No pasar de los 30 min).
6. Añadir 7.5 μ L de la solución de neutralización.
7. Añadir 1-1.5 μ L de 2-mercaptoetanol.

Una vez derivatizadas las muestras se carga el gel de poliacrilamida y se sigue con el procedimiento de un *Western blotting* normal, como se indica en el punto 3.2.10.

c. Marcaje y revelado

1. Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 1%BSA/ PBS-T
2. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 mL de TBS-T.
 - TBS-T (0,1% Tween-20 (v/v) en 1X PBS)
3. Incubación con anticuerpo primario (1:150 → diluido en 1% BSA/PBS-T)
 - Opción 1: Durante 1 hora a temperatura ambiente.
 - Opción 2: toda la noche a 4°C. (Ambos casos en agitación).
4. Lavados con 1 X PBS-T (a Temperatura ambiente)
 - Enjuagas dos veces.
 - Lavar durante 15 minutos.
 - Lavar dos veces durante 5 minutos.
5. Incubar las membranas durante 60 minutos con el anticuerpo secundario en una solución de 1%BSA/PBS-T con una dilución del secundario de 1:300.
6. Lavados con 1 X PBS-T
 - Enjuagas dos veces.
 - Lavar con durante 15 minutos. (a T^a ambiente).
7. La membrana se incubaba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se revela con un detector quimioluminiscente, mediante el programa Image GaugeV4.0 de FUJIFILM.

d. Cálculos

Las imágenes obtenidas se almacenan en formato digital TIF para poder realizar la densitometría utilizando el *software* FUJIFILM Image Gauge V4.0.

Las proteínas se ven bastante bien con un tiempo de exposición entre 1 y 6 min.

Como control de carga, teñimos las membranas con rojo ponceau. Así se calcula la densitometría de la membrana haciendo un ratio: densitometría de las proteínas oxidadas/densitometría de la membrana teñida con rojo ponceau.

3.2.12 Aislamiento de RNA

a. Fundamento

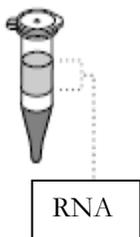
Para la extracción de RNA total de hígado se utiliza como reactivo TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™]), siguiendo las indicaciones del protocolo establecido por el fabricante, que es una modificación del método de extracción en un solo paso de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski et al., 1987). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica).

b. Reactivos

- Tampón de extracción
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0.01% (v/v)

c. Procedimiento

1. Homogenado: en relación 1 mL de Trizol por 50-100 mg de tejido (hígado)
2. Separación de fases:
 - Incubar las muestras homogenadas durante 5 minutos a 15-30°C (completa disociación de complejos nucleoproteicos)
 - Añadir cloroformo (0,2 mL por 1 mL de Trizol usado)
 - Tapar bien y agitar fuertemente los tubos eppendorfs durante 15 segundos.
 - Incubar durante 2-3 minutos a 15-30°C.
 - Centrifugar a no más de 12000G durante 15 minutos a 2-8°C



➔ Obtenemos dos fases:

- Debajo de color rojo: cloroformo-fenol
- Arriba incoloro: fase acuosa que contiene el RNA, 60% del volumen de Trizol usado en el homogenado)

3. Precipitación del RNA:

- Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo (si se desea, se guarda la fase orgánica para aislar DNA y proteínas)
- Precipitar el RNA de la fase acuosa con isopropanol (0.5 mL por cada 1 mL de Trizol)
- Incubar durante 10 minutos a 15-30°C
- Centrifugar a no más de 12000 G durante 10 minutos a 2-8°C

➔ Aparece el RNA precipitado formando un pellet blanco visible en el fondo

4. Lavado del RNA:
 - Retirar el sobrenadante
 - Lavar el pellet de RNA una vez con etanol al 75% (1 mL de etanol 75% por cada 1 mL de Trizol)
 - Centrifugar a no más de 7500 G durante 5 minutos a 2-8°C
5. Redisolver el RNA:
 - Eliminar el sobrenadante y secar el pellet (ambiente o vacío, unos 5 a 10 minutos)
 - Disolver el RNA en agua DEPC. Agitar con vórtex para favorecer la disolución
 - Calentar a 60°C durante 10 minutos

d. Determinación, pureza e integridad del RNA total

La cuantificación de la concentración del RNA se realiza mediante medida espectrofotométrica a 260 nm (con NANODROP 2000 Spectrophotometer), y la comprobación de la pureza mediante la relación de las medidas 260/280 nm. Valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que se obtuvo un RNA de buena calidad.

El NANODROP es un espectrofotómetro de amplio espectro (220-270 nm) que mide muestras de 1 µL con alta precisión y reproducibilidad mediante métodos de tensión superficial. Las medidas se guardan directamente en un ordenador en formato Excel.

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

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, arrays de cDNA y retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) del mRNA.

Nosotros empleamos la RT-PCR para determinar la expresión del mRNA, que consta básicamente de dos pasos:

3.2.13.1 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT)

a. Fundamento

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 en esta tesis es MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems).

Para la obtención del cDNA se lleva a cabo una transcripción reversa usando el kit de Applied Biosystems “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” y las condiciones recomendadas por el fabricante.

b. Reactivos

- Buffer (específico del enzima, le permite ser activa y llevar a cabo su función)
- dNTPs (solución de desoxinucleotidos trifosfato necesarios para la síntesis de cDNA)
- Cebadores al azar (puntos de anclaje que servirán a la retrotranscriptasa para iniciar la síntesis)

- Enzima MsRT (reconoce el RNA molde y tiene la actividad DNA polimerasa)
- Inhibidor de RNasas
- Agua libre de RNasas (DEPC)

c. Procedimiento

1. Preparar 2X RT Master Mix (sobre hielo):

10X Buffer (10X)	2 μ L
25X dNTPs Mix (100 mM)	0.8 μ L
10X Cebadores	2 μ L
MultiScribe Reverse transcriptase	1 μ L
Inhibidor de RNasas	1 μ L
Agua DEPC	3.2 μ L
	10 μ L por reacción

2. Mezclar suavemente y dejar sobre hielo
3. Preparar la reacción de la retrotranscripción
 - Pipetear 10 μ L de 2X RT Master Mix en cada pocillo que vayamos a usar de la placa de 96 pocillos.
 - Añadir 10 μ L de RNA (1 μ g) y mezclar suavemente.
4. Centrifugar la placa para eliminar las posibles burbujas de aire que puedan quedar en los pocillos

5. Llevar al termociclador, el perfil de temperaturas será:

25°C	10 min.
37°C	120 min.
85°C	5 min.
4°C	∞

3.2.13.2 Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR a tiempo real)

Una vez sintetizado el cDNA (mediante la RT), lo amplificamos por medio de la PCR a tiempo real (llamada también PCR cuantitativa). Este método 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.

a. Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es una variante de la PCR estándar, que se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación. Es decir, permite ver y analizar a tiempo real la amplificación del DNA molde.

Es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de mRNA, tanto en células como en tejido.

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

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*”, C_t), 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 de partida, puesto que cuanto más copias de mRNA de partida del gen estudiado haya, más cDNA se

obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

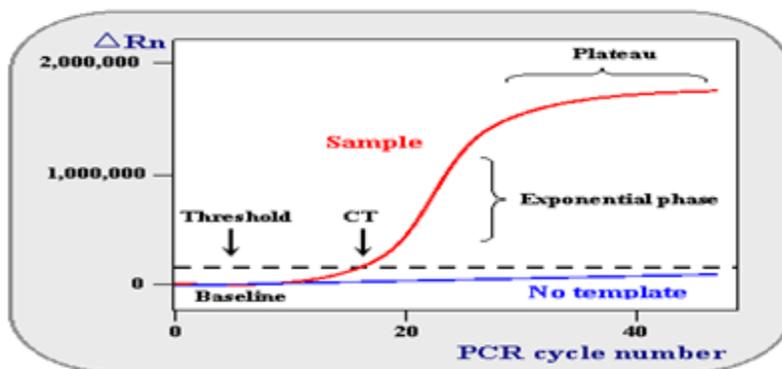


Figura 3.3.- Modelo de amplificación de PCR a tiempo real.

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de mRNA 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 mRNA 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 mRNA 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.

“Primers” empleados

Los “*primers*” 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” de PubMed.

Para cada uno de los genes a estudiar se seleccionaron los siguientes (Tabla 3.5)

	Cebadores sentido	Cebadores antisentido
GPx	5'-GAC ATC AGG AGA ATG GCA AG-3'	5'-CAT CAC CAA GCC AAT ACC AC-3'
Mn-SOD	5'-CGT GCT CCC ACA CAT CAA TG-3'	5'-TGA ACG TCA CCG AGG AGA AG-3'
GAPDH	5'-CCT GGA GAA ACC TGC CAA GTA TG-3'	5'-GGT CCT CAG TGT AGC CCA AGA TG-3'

Tabla 3.5.- Secuencia de los oligos utilizados en la RT-PCR.

b. Procedimiento

La PCR a tiempo real se realiza con el sistema de detección 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Y usando el kit de la casa comercial “Fermentas” (Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X).

- La reacción se realiza según el protocolo proporcionado por el citado kit.
- Tener en cuenta que hay que hacer cada muestra por triplicado.
- Control endógeno por triplicado, para cada muestra.
- Controles negativos (sin cDNA).
- Control sin la enzima Transcriptasa.

Ajustamos los volúmenes de la reacción inicialmente propuestos por el kit (25 μ L) a un volumen final de 20 μ L, puesto que nuestro sistema lo recomienda.

Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	10 μ L
Cebador sentido	0.3 μ M
Cebador antisentido	0.3 μ M
DNA molde	1 μ L (\leq 500 ng)
Agua libre de RNasas	Hasta 20 μ L

Usamos el diseño general de la placa, en el *software* SDS2.4 en un monitor conectado al sistema de detección 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Y programamos el termociclador con perfil térmico característico de los cebadores usados (Tabla 3.6)

Paso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	N $^{\circ}$ de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	45
Unió/ Extensión	62	60 s	

Tabla 3.6.- Condiciones del termociclador para la RT-PCR.

c. Cálculos

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y el *software* de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos.

El ciclo umbral (*threshold cycle*) (C_t) se convierte a una cantidad relativa a través del uso de una recta estándar construida de muestras agrupadas. La fórmula logarítmica utilizada para transformar los valores de C_t tanto para los genes estudiados y el control endógeno es:

$$Expo = \frac{(C_t \text{ muestra} - \text{Intercepto})}{Pendiente}$$

Por cada muestra, la cantidad del mRNA del gen diana se normaliza con el contenido de mRNA de GAPDH (control endógeno). 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:

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

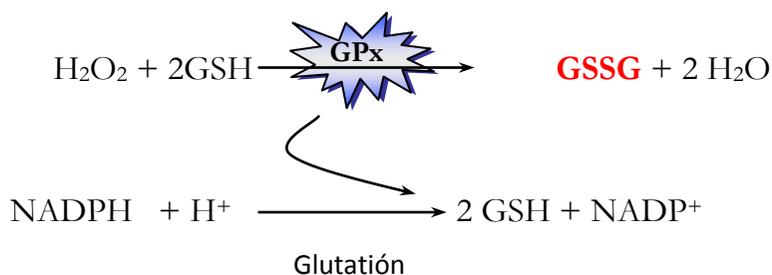
Para una pendiente de -3.322 obtenemos una eficiencia del 100%, lo cual significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado. Una reacción de amplificación debe tener una eficiencia lo más cercana al 100% para estar optimizada.

3.2.14 Actividad enzimática

3.2.14.1 Glutación peroxidasa

a. Fundamento

La actividad de la glutación peroxidasa (GPx) se determina según el método propuesto por Flohe y colaboradores en 1984 (Flohe et al., 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.

b. 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

c. Procedimiento

1. Preparar homogenados de hígado
 - Por cada gramo de hígado usamos 10 mL de tampón.
 - Sonicar 3 veces durante 3 segundos
 - Centrifugo a 1500G, 5 minutos a 4°C
 - Recoger el sobrenadante (diluir si es necesario)
2. Preparar una mix que contenga lo siguiente por cada muestra que se mida:

- 450 µL de KPi 0.1M, EDTA 1 mM, pH=7
- 50 µL de azida sódica
- 100 µL de la solución de glutatión reductasa
- 100 µL de la solución de glutatión

Atemperado a
37°C

3. Preincubamos a 37°C durante 5 minutos: 750 µL de la mix con 50 µL de muestra y 100 µL de NADPH
4. Añadimos 100 µL de H₂O₂ para, transcurridos 10 segundos, hacer un registro durante 3 minutos de la oxidación del NADPH mediante la disminución de la absorbancia (340 nm).

d. 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 mM – 1 x cm⁻¹)

d = paso de luz de la cubeta

ΔA = incremento de los valores de absorbancia

Δt = incremento de tiempo

Como nosotros queremos medir la actividad de la GPx en tejido hepático, medimos la concentración de proteínas con el método de Bradford para expresar los resultados en U/mg de proteínas.

3.2.14.2 Manganeso superóxido dismutasa

Para la determinación de esta actividad enzimática, utilizamos el kit de Cayman Chemical “Superoxide Dismutase Assay Kit” y seguimos el protocolo descrito en el mismo.

a. Fundamento

El kit de Cayman utiliza sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir el 50% de la dismutación del radical superóxido.

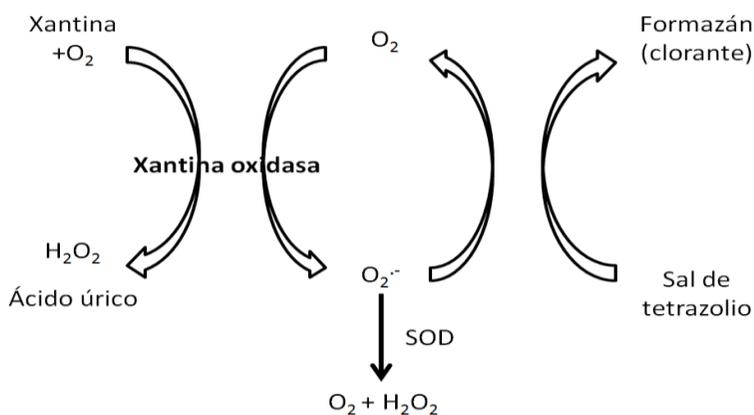


Figura 3.4.- Esquema del ensayo Superóxido Dismutasa.

Con este kit se miden la actividad de los tres tipos de SOD en conjunto o por separado según interés.

a. Reactivos

- Tampón de HEPES 20 mM, pH 7.2 (para hacer homogenado de tejido)

- Cianuro de potasio 2 mM (para inhibir la Cu/Zn-SOD y la extracelular)
- Reactivos incluidos en el kit y su preparación:
 - Tampón de muestra 10X: necesitamos una concentración del 1X en H₂O milli-Q (para preparar la recta estándar de SOD, diluir la Xantina Oxidasa y las muestras)
 - Tampón de ensayo 10X: necesitamos una concentración del 1X en H₂O milli-Q (para diluir el detector del radical razón 1:400)
 - Detector del radical (solución de sal de tetrazolio): diluir en tampón de ensayo 1X (razón 1:400)
 - SOD estándar (para construir la recta estándar)
 - Xantina Oxidasa: se diluye en tampón de muestras 1X (razón 1:40)

b. Procedimiento

a. Preparación de las muestras:

1. Homogeneizar tejido hepático en tampón de HEPES 20mM y pH 7.2 que contiene: 1 mM EGTA, 210 mM manitol y 70 mM sacarosa.

En un tubo eppendorf: 100 μ L de tampón por 20 mg de hígado.

2. Sonicar durante 3 segundos, tres veces.
3. Centrifugar a 1500 G durante 5 minutos a 4°C.
4. Recoger el sobrenadante.
5. Preparar diluciones de todas las muestras (razón 1:2) en tampón de muestras 1X.

b. Preparación de la recta estándar de SOD:

- Preparar una dilución 1/100 de SOD estándar en tampón de muestra 1X, para obtener una solución madre de SOD, a partir de la cual hacemos construimos una recta de varias concentraciones:

Tubo	SOD madre (μL)	Tampón de muestra 1X	Actividad final de SOD (U/ml)
1	0	1000	0
2	25	975	0.025
3	50	950	0.0625
4	100	900	0.125
5	200	800	0.25

Tabla 3.7.- Recta estándar de la SOD.

- c. Preparar la reacción (en placa de 96 pocillos)
1. Pocillos de la recta estándar (cada concentración de SOD por duplicado)

Añadir a cada pocillo:

 - 200 μL del detector del radical diluido
 - 10 μL de la curva preparada anteriormente.
 2. Pocillos de las muestras:

Añadir a cada pocillo:

 - 190 μL del detector del radical diluido
 - 10 μL de inhibidor (cianuro potásico 2mM)
 - 10 μL de muestra.
 3. Iniciar la reacción:
 - Añadir 20 μL de Xantina Oxidasa diluida en todos los pocillos usados.
 4. Sacudir la placa cuidadosamente durante unos segundos.
 5. Incubar la placa en agitación durante 20 minutos a 25°C.
 6. Leer la absorbancia en espectrofotómetro de placas a $\lambda=450$ nm.
 7. Medir la concentración de proteínas con el método de Bradford.

c. Cálculos

1. Calcular la absorbancia promedio de cada concentración de la SOD estándar y de las muestra medidas por duplicado.
2. Dividir la absorbancia del tubo 1 (de la recta estándar, tabla 3.7) sobre sí mismo. Y dividir esa misma absorbancia, del tubo 1 de la recta, sobre las absorbancias de los otros puntos de la recta y de las muestras, para obtener el ratio de linealidad (*linearized rate: LR*)
Ejemplo: LR para punto 2 de la recta = Abs Std 1/ Abs Std 2.
3. Construir una recta con los valores de LR y sus actividades finales de SOD (U/mL) de la tabla 3.7. Obtener la función de la recta.
4. Calcular la actividad SOD de las muestras utilizando la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva estándar y sustituir los valores de LR de cada muestra.
5. La fórmula:

$$SOD \left(\frac{U}{mg} \right) = \left[\frac{(LR \text{ muestra} - \text{Intercepto})}{\text{Pendiente}} \times \left(\frac{0.23mL}{0.01mL} \right) \right] / mg \text{ prots}$$

3.2.15 Determinación del consumo de glucosa *in vivo* mediante Tomografía de Emisión de Positrones (PET)

a. Fundamento

El estudio del metabolismo glucídico a nivel fisiológico y/o fisiopatológico mediante PET-¹⁸F-FDG proporciona importante información acerca del estado de salud de los órganos estudiados, además de ser una buena herramienta para detectar la aparición o avance de un proceso tumoral.

La ^{18}F -Fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG) es un análogo de la glucosa, con la salvedad de que el isótopo radiactivo ^{18}F sustituye, tras un procedimiento de marcación y síntesis de la molécula ^{18}F -FDG, el grupo OH del carbono 2 de la molécula de glucosa. De este modo, la base teórica para su utilización es que compite con la molécula por entrar en las células para ser consumida y generar ATP, en el proceso de la glucólisis. Sin embargo, y por esa modificación en el carbono 2, una vez que entra en la célula y se fosforila a glucosa-6-fosfato, no puede seguir la reacción y pasar a fructosa-6-fosfato. De este modo, queda atrapada en la célula donde se había iniciado su consumo (Figura 3.5).

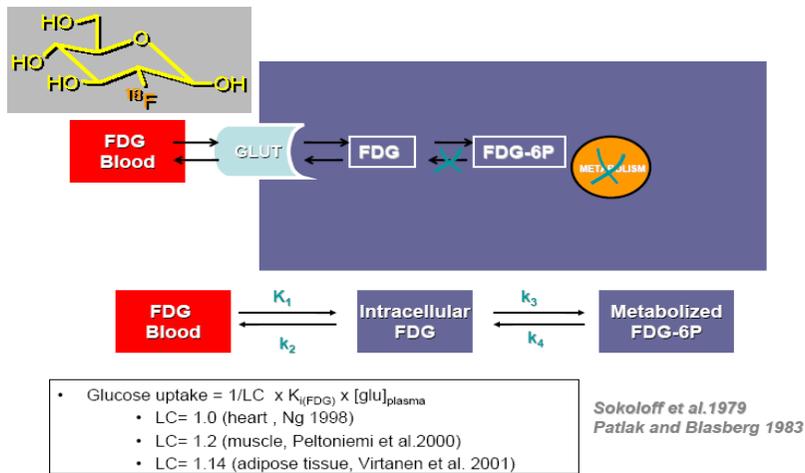


Figura 3.5.- Molécula de ^{18}F -FDG y esquema de su consumo en la célula.

Al ser el ^{18}F un isótopo emisor de positrones (antimateria de los electrones), habrá una emisión más alta allí donde se haya acumulado más esta molécula, es decir, en aquellas regiones donde el consumo de glucosa sea más elevado. Los positrones al encontrarse con los electrones se aniquilarán y emitirán dos fotones de alta energía (± 511 KeV) a $\pm 180^\circ$ que serán detectados por los módulos de la cámara PET (Figura 3.6). Estos fotones pasan un filtro temporal y energético para ser aceptados como “verdaderos”, es decir, que provengan del mismo punto de origen.

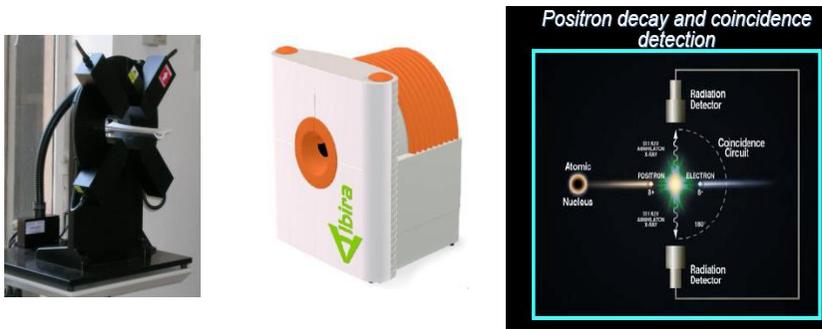


Figura 3.6.- Esquema de detección de coincidencias por el equipo PET-CT Albira ARS.

Esta “ventana temporal” se establece en 2-3 nanosegundos, por lo que un fotón que incide en el cristal detector se asocia a otro fotón detectado en el lado opuesto en ese mismo espacio de tiempo. Es necesario además que ambos lleguen dentro del rango de energías del equipo (400-600 KeV, resolución de energía del 14%), lo cual depende a su vez de la sensibilidad (0.7%). Esta señal luminosa se amplifica a través de unos fotomultiplicadores insertados en cada uno de los módulos de la cámara PET, con lo que al final se transforma en una señal eléctrica proporcional a la intensidad con la que llegaron los fotones y proporcionando información acerca de su punto de origen, o sea, dónde fue consumida la ^{18}F -FDG.

Para discriminar la captación de las diferentes regiones de interés, un aspecto también importante es la resolución espacial. Ella nos permitirá diferenciar zonas con distintos valores de captación pero muy próximos. En el equipo Albira ARS en PET es de 1.0 mm (FWHM), con una reconstrucción MLEM/OSEM y una ventana de coincidencias de 3 ns).

Por ello, y teniendo en cuenta que es una técnica no invasiva, se opta por analizar el consumo de glucosa fisiológico a nivel cerebral de los grupos experimentales aquí estudiados. Varios estudios previos se han realizado para intentar estandarizar los métodos y protocolos para animales de investigación (Green et al., 1998; Huang et al., 2004; Shimoji et al., 2004; Laforest et al., 2005; Fueger et al., 2006; Kim et al., 2006b; Schiffer et al., 2007). Considerando las

características del equipo PET Albira ARS y la bibliografía existente, se determina el consumo cerebral de glucosa en los grupos estudiados como se expone en el apartado de procedimiento.

b. Reactivos

- Fluodos, 1110 MBq/mL, solución inyectable (^{18}F -Fluorodesoxiglucosa) RedPet Ibérica, S.A.
- Isoflo ®, Veterinaria Esteve
- Oxígeno comprimido medicinal $\geq 99.5\%$. Praxair, S.A.
- Salina fisiológica, Grifols ®

c. Procedimiento

En primer lugar, se mantiene a los animales 8 horas en ayuno (agua *ad libitum*) antes de realizar el estudio PET- ^{18}F -FDG. Tras pesar al animal y comprobar su temperatura rectal y niveles de glucemia, se introduce en una cámara de anestesia durante un mínimo de 5 minutos con oxígeno e Isoflurano al 1-2% a un flujo constante de 1.5 L/min. A continuación, se inyecta 30-40 MBq de ^{18}F -FDG vía intravenosa y rápidamente se coloca en la camilla de la cámara PET para escanear el cerebro.

Se controla al animal en todo momento manteniendo su temperatura corporal mediante una lámpara, manta térmica y/o lámpara de infrarrojos.

Se realiza un protocolo dinámico de adquisición de eventos por secuencias de 1, 2 y 5 minutos hasta completar un periodo de distribución del radiotrazador por todo el cuerpo de 30 minutos.

Seguidamente, el escáner inicia automáticamente otra adquisición dinámica por secuencias, hasta completar 20 minutos, que será la medida tomada para cuantificar el consumo cerebral de glucosa de cada animal estudiado.

La suma de estos paquetes de datos (10x2 minutos) genera un nuevo archivo de datos que es reconstruido por el *software* que proporciona la casa comercial del aparato, mediante un algoritmo MLEM de 12 iteraciones en el cual se hace una corrección por decaimiento (puesto que la ^{18}F -FDG tiene una vida media 109.8 minutos). No se hace corrección por coincidencias aleatorias, dispersión y atenuación.

Tras reconstruir el archivo de datos se genera un archivo de imagen “img.hdr” el cual se utiliza para cuantificar las regiones de interés (ROI) o volúmenes de interés (Latour et al., 1999). En nuestro estudio se analiza el volumen cerebral de cada ratón por completo, por lo que se realiza un VOI en el cual queda excluida la parte correspondiente al cerebelo y el resto de regiones con hipercaptación de la cabeza (p. ej: glándulas de Harder,...).

El VOI construido para cada cerebro es analizado mediante el *software* comercial PMOD 2.8 (2006, Suiza).

d. Cálculos

La actividad cuantificada en cada uno de los VOIs analizados es la suma de todos los eventos captados por cada uno de ellos en ese periodo de tiempo (10 minutos) expresada en miliCurios (mCi) por unidad de volumen (cm^3). Esta captación de ^{18}F -FDG (SUV) es corregida por la dosis inyectada (ID) y el peso del animal (g), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SUV} = \frac{\text{actividad captada en el volumen de interés (mCi/cm}^3\text{) x peso (g)}}{\text{ID (mCi)}}$$

$$\text{SUV} = \frac{\text{VOI x Peso}}{\text{ID}} = \frac{(\text{mCi/cm}^3\text{) x g}}{\text{mCi}}$$

3.2.16 Test de Tolerancia a la Glucosa Oral (TTGO)

a. Fundamento

Nos basamos en el protocolo realizado por un equipo del departamento de medicina de la universidad de Melbourne en 2008: EVALUATING THE GLUCOSE TOLERANCE TEST IN MICE (Andrikopoulos et al., 2008).

Una prueba de tolerancia a la glucosa es por lo general para detectar la diabetes, resistencia a la insulina, etc. La glucosa se puede administrar por vía oral (TTGO) o intraperitoneal (TTGIP). El examen se puede realizar como parte de un panel de pruebas, tales como el panel metabólico completo.

b. Procedimiento

1. Poner a los ratones en ayuno durante 7-8 horas previas a la prueba (se permite agua)
2. Pesarse a los ratones antes de la prueba.
3. Preparar una dosis de glucosa (D-(+) Glucose, SigmaUltra, 99.5% GC) 2 gramos por kilogramo de peso de ratón.
4. Disolver la dosis correspondiente a cada ratón en un volumen máximo de 1mL de agua autoclavada.
5. Extraer una gota de sangre al ratón por la vena safena con una jeringa.
6. Medir la glucemia basal con un Glucómetro "Accutrend GC". Roche
7. Administrar la solución al ratón por vía oral con una sonda.
8. Se pincha de nuevo la vena safena.
9. Finalmente, se procede a medir la glucemia en 5 tiempos: a los 15 minutos de la administración de la glucosa, a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

c. Cálculos

Pasar los datos a una hoja de cálculo “Excel”.

Los datos se expresan como media \pm SEM. El nivel de significación estadística se determina mediante PRUEBA.T de dos colas cuando estudiamos la diferencia entre las medias de los dos grupos experimentales.

Construir las gráficas para ver la evolución, los picos y el tiempo que tarda la glucemia en volver a los niveles basales.

3.2.17 Aclaramiento hepático

Esta prueba se ha realizado en un solo punto de la curva de supervivencia correspondiente al 50%.

a. Fundamento

La prueba de aclaramiento hepático se usa para la evaluación del funcionamiento del hígado (Zhang et al., 2008). Y el uso de la zoxazolamina, un relajante muscular que provoca parálisis o pérdida del correcto reflejo, es común en este tipo de pruebas (Pappas et al., 1998).

b. Procedimiento

1. Se prepara la solución del relajante muscular “zoxazolamina” a la dosis de 150 mg/kg de peso en aceite de maíz.
2. Para inyectar un volumen de 200 a 300 μ L como máximo.
3. Puesto que la zoxazolamina es difícil de disolver en aceite de maíz preparamos una solución madre usando un disolvente polar Dimetilsulfóxido “DMSO” para facilitar la solubilidad del fármaco en aceite de maíz (una relación DMSO/aceite de 1/10).

4. Se calcula el volumen con la concentración que le corresponde a cada ratón en relación a su peso.
5. Se le inyecta por vía intraperitoneal.
6. En cuanto el ratón pierde movilidad, se coloca bocarriba.
7. Se observa, o se calcula el tiempo en que tarda en reponerse sobre sus pies.

c. Cálculos

La duración de la parálisis se considera el intervalo de tiempo desde que el ratón pierde el correcto reflejo muscular hasta su recuperación (puesta de pie).

3.2.18 Test de reconocimiento de objetos nuevos

a. Fundamento

La prueba de reconocimiento de objetos se basa en la tendencia natural de los roedores a explorar un objeto nuevo o del medio ambiente en comparación con uno familiar (Ennaceur et al., 1988). Es ampliamente utilizada en la evaluación de nuevos fármacos sobre la función cognitiva.



Figura 3.7.- Test de reconocimiento de objetos nuevos.

b. Procedimiento

La prueba se realiza en un campo abierto (60 x 55 x 45 cm) de PVC translúcida. El campo abierto se coloca en una sala con las mismas condiciones a las que están habituados los ratones de luz, temperatura, etc.

La prueba consta de cuatro fases:

1. Reconocimiento de la casa: Los animales son primero habituados a la caja durante 3 minutos.
2. Familiar-Familiar: Se introducen dos objetos idénticos e equidistantes en la caja y se graba el ratón durante 5 minutos mientras va reconociendo a los dos objetos.
3. Familiar-Nuevo1: al cabo de una hora, en lugar de uno de los objetos del paso anterior se introduce uno nuevo y se graba de nuevo al ratón durante 5 minutos.
4. Nuevo1-Nuevo2: A las 24 horas, se retira el objeto familiar del tercer paso y lo sustituimos por un segundo objeto nuevo. Grabar 5 minutos.

Se emplean cuatro objetos, dos de los cuales son idénticos, y diferentes de los otros dos en el color y la forma.

c. Cálculos

Viendo los videos calculamos cuantas veces el ratón explora cada objeto, olisqueándolo.

1. Un índice de reconocimiento (RI) a la hora de la fase de familiarización, se define como $(\text{NUEVO1} / (\text{FAMILIAR} + \text{NUEVO1})) \times 100$.

2. Un índice de reconocimiento (RI) a las 24 horas de la fase de familiarización, se define como $(\text{NUEVO2} / (\text{NUEVO1} + \text{NUEVO1})) \times 100$.

3.2.19 Coordinación motora

Esta prueba se ha realizado en un solo punto de la curva de supervivencia correspondiente al 50%.

a. Fundamento

La pérdida progresiva de la coordinación neuromuscular también se considera uno de los marcadores bien establecidos y validados del envejecimiento, que puede ser medido con la prueba de la cuerda tirante (Miquel et al., 1978; Ingram et al., 1986).



Figura 3.8.- Coordinación motora.

b. Procedimiento

Realizamos la prueba con ligeras variaciones (Matheu et al., 2007).

Construimos una caja rectangular con las siguientes medidas (60 cm x 30cm x 25 cm) y de forma diagonal a esta caja colocamos una cuerda circular de goma (60 cm de largo y 1.2 cm de diámetro).

Se coloca el ratón encima de la cuerda, justo en la mitad. Y se procede a contar el tiempo que el ratón aguanta encima de la cuerda o sale por uno de los dos extremos de la misma.

c. Cálculos

La coordinación neuromuscular se cuantifica como el porcentaje de ratones que pasa con éxito al extremo de la cuerda en 60 segundos como máximo, o aguanta encima de la misma por lo menos 60 sec. en uno de los 5 intentos consecutivos.

Se realiza el test de Fisher para los cálculos estadísticos.

3.2.20 Fuerza de agarre de los miembros anteriores

Esta prueba se ha determinado sólo una vez, al 50% de supervivencia de los ratones de la curva de longevidad, por no disponer del aparato durante todo el estudio.

a. Fundamento

La medición de la fuerza de agarre está basada en la metodología de Bioseb, que dispone de instrumentos para el trabajo sobre el sistema nervioso central, la investigación neuromuscular y la evaluación de medicamentos.

Es una manera fácil de cuantificar objetivamente la fuerza muscular de los roedores (ratones y ratas), y para evaluar el efecto de ciertas sustancias (fármacos, toxinas, etc.) o enfermedades neurodegenerativas sobre la degeneración muscular.

Para ello, usamos el aparato de Bioseb siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante (Figura 3.9).

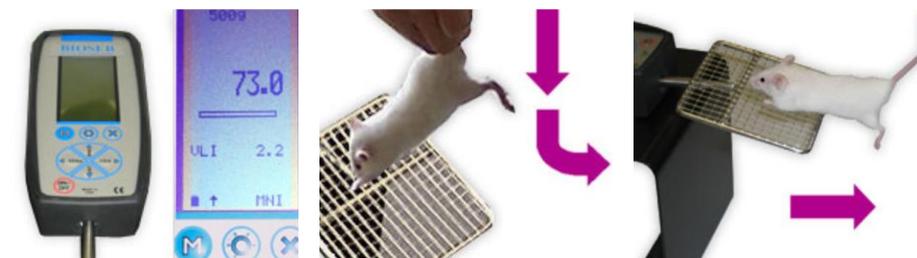


Figura 3.9.- Test de fuerza de agarre.

b. Procedimiento

1. Sujetar al ratón por la cola (en un punto intermedio) y suspenderlo por encima de la red o barra.
2. Mover al ratón hasta que sus patas delanteras se agarren con firmeza a la red o barra.
3. Llevar al ratón a una posición casi horizontal.
4. Tirar del ratón siguiendo los ejes del sensor hasta que se libere de la red o barra.
5. Registrar el valor que se muestra en la pantalla digital, en gramos; que es la fuerza alcanzada por el ratón.
6. Repetir 5 veces la medición de cada ratón con un descanso de 30 segundos entre ellos.
7. Pesar al ratón.

c. Cálculos

La fuerza alcanzada por el ratón se muestra en la pantalla (en gramos), hacemos el promedio de las cinco mediciones y calculamos la fuerza media del ratón en relación a su peso corporal (gramos de fuerza/ gramo de peso corporal).

3.2.21 Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realiza un análisis de la varianza. La hipótesis nula se acepta para todos los valores de aquellos grupos en los cuales F no es significativa para un valor $P \leq 0.05$. Luego, el grupo de datos para los que F es significativa se analizan por el test de la *t* de Student. La simbología empleada en la presente tesis es la siguiente: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Para determinaciones específicas se explica la estadística realizada en el propio apartado de descripción de la técnica.

4 RESULTADOS

4.1 CURVA DE SUPERVIVENCIA DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA RICA O SIN SOJA

Históricamente, las mujeres han vivido más que los hombres en todas las épocas y en casi todas las poblaciones (Blagosklonny 2010; Barrett et al., 2011; Bhattacharya et al., 2011). Un patrón similar de diferencias de sexo en la longevidad se ha visto en nuestro laboratorio al realizar una curva de longevidad de ratas Wistar (Borras et al., 2003). Este hecho ha sido bien documentado y puede deberse, en parte, a la acción de los estrógenos (Asdell et al., 1967; Kuiper et al., 1998b; Borras 2003; Borras et al., 2003; Vina et al., 2005a).

Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que los niveles más altos de estrógenos en las hembras protegen contra el envejecimiento, al aumentar la expresión de genes antioxidantes relacionados con la longevidad, como la glutatión peroxidasa selenio-dependiente y la manganeso superóxido dismutasa (Borras et al., 2003; Borras et al., 2005).

Este hecho hizo plantearnos la posibilidad de intervenir mediante la administración de moléculas miméticas de los estrógenos para reproducir sus efectos favorables sobre la longevidad pero que no presenten el poder feminizante y los inconvenientes atribuidos a los estrógenos. Así pues, elegimos la soja por su composición rica en fitoestrógenos.

El papel beneficioso de estas sustancias sobre parámetros de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes se ha demostrado previamente por nuestro grupo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mahn et al., 2005; Borras et al., 2006).

Con el objetivo de determinar el posible efecto beneficioso de la soja sobre la longevidad realizamos una curva de supervivencia en poblaciones controladas de ratones OF1 machos. Para ello separamos los animales en dos grupos según el tipo de dieta a consumir (ver apartado de Materiales y Métodos).

1. Grupo control (n=81 ratones) alimentado con dieta sin soja.
2. Grupo soja (n=76 ratones) alimentados con dieta rica en soja.

La figura 4.1 muestra las curvas de supervivencia de ambos grupos experimentales. A simple vista no observamos diferencias significativas en la longevidad entre los dos grupos; de hecho la vida media es prácticamente la misma para ambos y se alcanza entre la semana 71 y 72 de vida de los ratones. Concretamente, 496 días en el grupo control y 504 días en el grupo alimentado con dieta rica en soja.

En cuanto a la vida máxima, tampoco encontramos diferencias, alcanzando ambos grupos una vida máxima de 98 semanas. Concretamente, 689 días para el grupo sin soja y 686 días en el grupo alimentado con dieta rica en soja.

Sin embargo, si nos fijamos en cómo evolucionan las dos curvas, sí encontramos diferencias en sus tendencias:

- Desde la décima semana (69 días), la población alimentada con dieta rica en soja empieza a decaer mientras que, la población alimentada con dieta sin soja empieza a las 25 semanas de edad (174 días).
- Entre la semana 36 (254 días) y 47 (318 días) se equiparan los porcentajes de supervivencia de los dos grupos.
- De la semana 36 hasta la 46 se separan habiendo mayor caída en el grupo alimentado con soja.
- Nuevamente, ambas curvas coinciden en la vida media (entre la semana 71 y 72 de vida de los ratones).
- A partir de la semana 73 (509 días) empiezan de nuevo a separarse, por la mayor caída de la población de soja.

- Vuelven a coincidir en un porcentaje de supervivencia de casi el 20% con 82 semanas de vida (o 575 días de edad).
- En seguida observamos de nuevo una separación entre ambas curvas debido a la caída del grupo sin soja.
- Y ya por último vemos cómo coinciden en la vida máxima con aproximadamente 98 semanas.

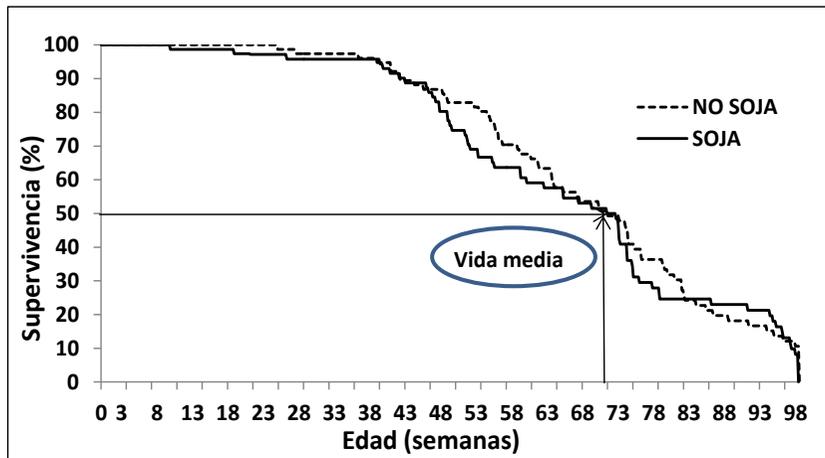


Figura 4.1.- Curva de longevidad de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja o sin soja.

Con una n total de 157 ratones, de los cuales, 81 con dieta sin soja y 76 con dieta rica en soja.

A partir del resultado obtenido, a pesar de las diferencias en algunas etapas de la vida, no podemos afirmar que el consumo de una dieta rica en soja tenga efectos sobre la vida media ni la máxima de los ratones OF1 machos.

4.2 CONCENTRACIÓN DE ISOFLAVONAS EN PLASMA

Para valorar las diversas actividades farmacológicas de las isoflavonas de la soja, son necesarios los estudios detallados de los índices de absorción y excreción de estos compuestos y la posterior evaluación de su biodisponibilidad.

Por ello, las concentraciones plasmáticas de isoflavonas (genisteína, daidzeína) y el metabolito (equol) se determinaron mediante cromatógrafo líquido de alto rendimiento (UPLC, *ultraperformance liquid chromatography*).

La tabla 4.1.1 muestra las concentraciones de las isoflavonas (genisteína y daidzeína) y del metabolito equol en plasma de los ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja en comparación con los alimentados con dieta rica en soja.

En cuanto a la concentración de genisteína, observamos que los valores del grupo alimentado con dieta sin soja, oscilan entre no detectado (en su mayoría) y 1.4 nM. Mientras que en el plasma de los ratones con dieta rica en soja oscilan entre 0.7 nM y 33.2 nM.

Cuando analizamos la concentración de la daidzeína, vemos que su concentración en el plasma de los ratones alimentados con dieta sin soja, oscila entre valores no detectados (6 ratones) y 2.7 nM. También destacar que solamente dos de los 18 ratones tienen concentración superior al 1nM de daidzeína en su plasma. Por su parte, el grupo alimentado con dieta rica en soja, sus concentraciones oscilan entre 1.4 nM y 27.8 nM.

En cuanto a la concentración del metabolito equol, observamos cómo en el plasma del grupo alimentado con dieta sin soja, en su mayoría no es detectable (11 de los 18 ratones estudiados) y el ratón que más equol tiene no alcanza 150 nM. Mientras que en el plasma de los ratones alimentados con dieta rica en soja, observamos que con la excepción de un ratón, todos superan los 160 nM de equol. Es más, 11 de ellos alcanzan concentraciones superiores a los 500 nM, llegando a superar los 1000 nM en dos casos.

Supervivencia (%)	Grupo	nº ratón	Genisteína (nM)	Daidzeína (nM)	Equol (nM)
100	NO SOJA	1	0,3	0,9	ND
		2	ND	ND	ND
		3	0,5	0,7	ND
		4	0,1	0,3	ND
		5	1,4	1,4	ND
	SOJA	1	11,4	11,1	239,1
		2	3,2	4,0	613,4
		3	4,6	4,8	167,7
		4	4,1	5,7	573,9
80	NO SOJA	1	ND	0,6	5,7
		2	0,1	0,3	120,5
		3	0,8	2,7	109,3
		4	0,1	0,2	59,1
	SOJA	1	2,4	2,2	574,0
		2	2,7	2,7	467,8
		3	15,9	16,6	740,1
		4	33,2	27,8	418,2
		5	0,7	1,4	709,9
50	NO SOJA	1	0,2	ND	ND
		2	ND	0,2	26,5
		3	ND	ND	ND
		4	ND	ND	148,5
		5	0,1	0,2	63,9
	SOJA	1	19,7	15,5	564,4
		2	9,0	7,7	301,8
		3	19,3	19,9	395,1
		4	5,5	4,3	1460,5
10	NO SOJA	1	ND	0,2	ND
		2	ND	0,1	ND
		3	0,5	ND	ND
		4	0,2	ND	ND
	SOJA	1	4,0	3,8	787,8
		2	12,6	10,3	1068,9
		3	2,9	2,2	630,4
		4	7,2	5,8	63,4

Tabla 4.1.1.- Concentración de genisteína, daidzeína y equol en plasma de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.

ND = No detectado.

El número de ratones es de 4 a 5 ratones por grupo experimental y porcentaje de supervivencia.

Si hacemos el promedio por grupo de la concentración de cada isoflavona, obtenemos la tabla 4.1.2 donde podemos observar que el grupo alimentado con dieta rica en soja tiene concentraciones significativamente

mayores que el grupo alimentado con dieta sin soja en todos los casos ($P < 0.001$), siendo casi veinte veces más en cuanto al equol y la daidzeína o cerca de cuarenta veces en el caso de la genisteína. Por su parte, la concentración total de isoflavonas en el grupo alimentado con soja es también alrededor de veinte veces mayor que el grupo sin soja.

También observamos que el equol es la isoflavona predominante, superando el 90% del total en ambos casos.

Grupo	n		Genisteína (nM)	Daidzeína (nM)	Equol (nM)	Total (nM)
NO SOJA	18	Media	0,24	0,44	29,64	30,32
		DE	0,36	0,68	49,12	
SOJA	17	Media	9,32	8,59	575,08	592,99
		DE	8,56	7,42	336,07	
		<i>p valor</i>	0,000080	0,00005318	0,00000009	0,000066

Tabla 4.1.2.- Concentración total de genisteína, daidzeína y equol en plasma de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.

n = número de ratones por grupo. DE = Desviación estándar. ND = No detectado. Las diferencias se consideran significativas cuando $P < 0.05$.

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que efectivamente hay cambios en las concentraciones de las isoflavonas de soja y el metabolito equol analizados en el plasma de los ratones OF1 machos, hecho importante a la hora de comparar los dos grupos experimentales entre sí, teniendo en cuenta que la única variable del estudio es la presencia o no de las isoflavonas de soja en la dieta. Ello es fundamental para poder determinar si realmente el consumo de soja puede afectar o no los parámetros que nos hemos propuesto como objetivos de la presente tesis.

4.3 PERFIL METABÓLICO EN PLASMA Y MITOCONDRIAS HEPÁTICAS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (^1H RMN)

Los perfiles de metabolitos proporcionan una visión global en las caracterizaciones y las interacciones de los metabolitos en determinados estados fisiológicos o patológicos.

El análisis de componentes principales (PCA) es capaz de representar estructuras de datos multivariantes complejas en un espacio de dimensionalidad reducida conservando la estructura de los datos. Nos permite detectar agrupaciones y patrones de las distintas muestras en función de su composición metabólica global.

Siendo uno de los objetivos de la presente tesis, estudiar el efecto del consumo de una dieta rica en soja sobre el perfil metabólico de los ratones OF1 machos, analizamos las diferencias metabólicas en el plasma y las mitocondrias hepáticas de los ratones alimentados con dieta sin soja y los alimentados con dieta rica en soja.

Las muestras que se encuentran cercanas entre sí, significa que son similares en un gran número de variables. Por el contrario, las muestras que están muy alejadas son diferentes en un gran número de variables.

Entre los resultados más relevantes de este análisis tenemos la figura 4.2.1 que representa el perfil metabólico en plasma sanguíneo. En este caso no se observan diferencias entre soja y no soja, ni a nivel global ni en ningún punto de la curva de supervivencia.

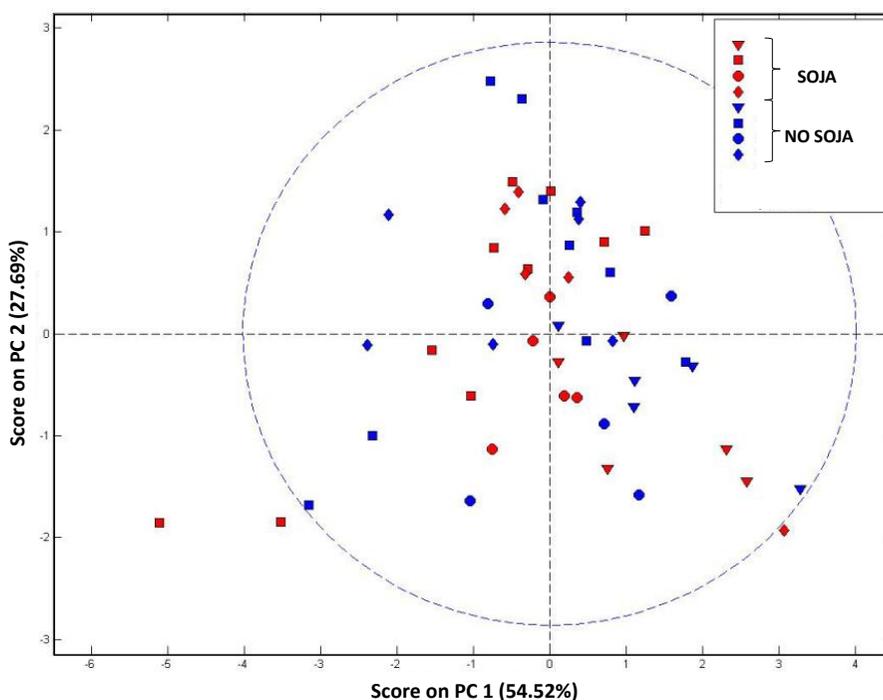


Figura 4.2.1.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metaboloma del plasma de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.

La n total es de 21 ratones sin soja y 20 ratones con soja. 5 de cada grupo al 100 % (▼), 80% (■) y 50% (●) de supervivencia. Al 10% (◆) la n es 6 ratones sin soja y 5 con soja.

En cuanto a las mitocondrias hepáticas, las trayectorias metabólicas son diferentes entre soja y no soja (Figura 4.2.2). Además, tanto en el grupo alimentado con dieta sin soja como el grupo alimentados con dieta rica en soja, el perfil metabólico mitocondrial al 80% y 50% de supervivencia difiere de los del 100% de supervivencia (los más jóvenes). Sin embargo, el perfil metabólico en las mitocondrias de los ratones del 10% de supervivencia, el grupo sin soja está agrupado junto a los del 80 y 50% de supervivencia, mientras que, el grupo alimentado con soja están más dispersados entre sí, pareciéndose algunos a los ratones del 100% de supervivencia.

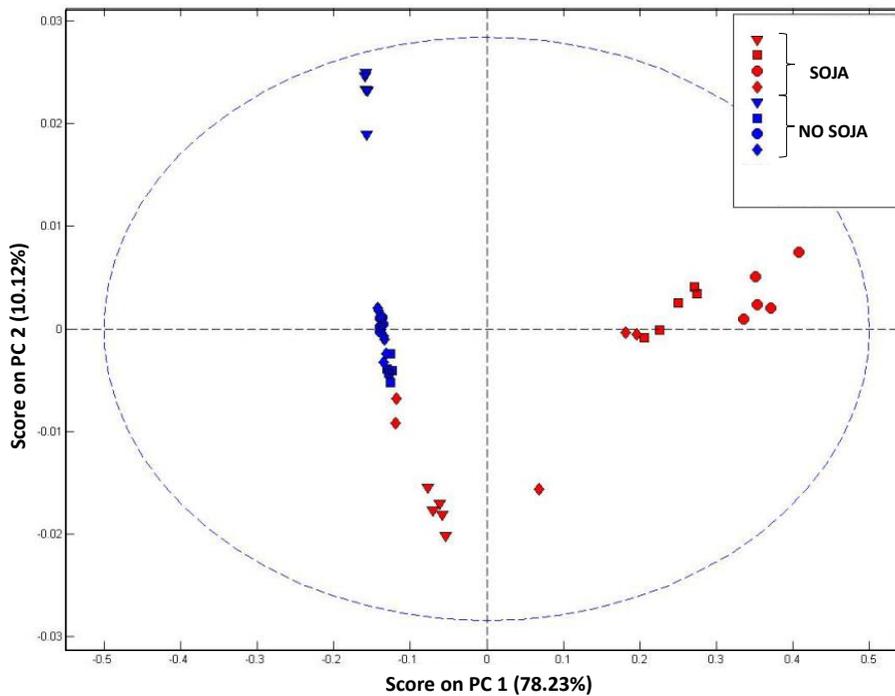


Figura 4.2.2.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metaboloma de las mitocondrias hepáticas de ratones alimentados con dieta rica en soja o sin soja.

La n total es de 21 ratones sin soja y 20 ratones con soja. 5 de cada grupo al 100 % (▼), 80% (■) y 50% (●) de supervivencia. Al 10% (◆) la n es 6 ratones sin soja y 5 con soja.

4.4 CONSUMO Y PESO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA RICA EN SOJA O SIN SOJA

Un número creciente de publicaciones sugiere que la proteína de soja y sus isoflavonas pueden tener un papel beneficioso en la obesidad (Velasquez et al., 2007).

Siendo uno de nuestros objetivos, determinar el efecto de la soja y sus fitoestrógenos sobre el consumo y el peso corporal de ratones OF1 machos procedimos a controlar dichos parámetros a lo largo de la curva de supervivencia de los dos grupos de ratones.

La figura 4.3 muestra las diferencias en la ingesta semanal de los dos grupos de la curva de supervivencia: hasta la semana 44 de edad se les administraba la dieta *ad libitum* y en ese período observamos que el grupo de ratones alimentado con soja consumía más cantidad de alimento que el grupo control. A partir de la semana 45, al empezar a controlar la ingesta diaria, se equipararon, anulándose las diferencias entre los dos grupos.

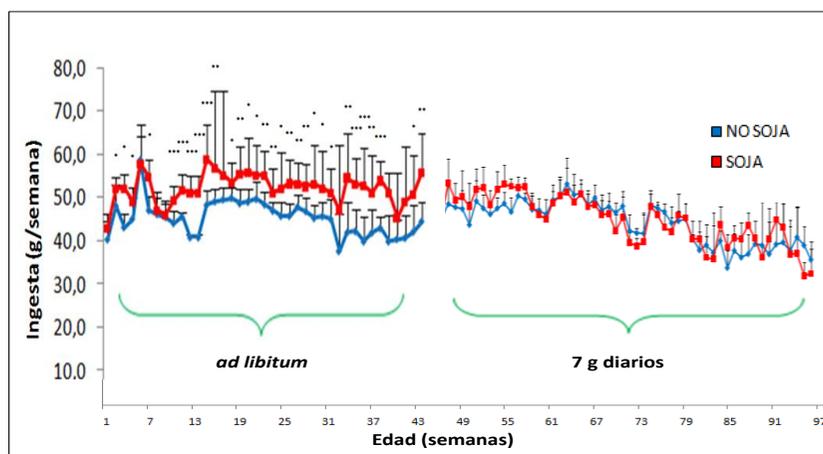


Figura 4.3.- Diferencias en la ingesta semanal de ratones que consumen dieta rica en soja o sin soja.

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ frente al control. El número de individuos estudiados es de 10 ratones por cada grupo hasta la semana 44 de edad, donde la ingesta es *ad libitum*. A partir de las 45 semanas se controla la ingesta diaria de comida de todos los ratones de la curva.

La figura 4.4 muestra las diferencias en el peso corporal de los dos grupos de la curva. Podemos observar que hasta la semana 44 de edad de los ratones, en prácticamente todos los puntos de la gráfica, el grupo alimentado con dieta rica en soja pesa significativamente más que el grupo con dieta sin soja. Sin embargo, a partir de la semana 57 desaparecen esas diferencias. Ello concuerda con que la ingesta de los ratones con soja es superior a la de sin soja hasta que controlamos el consumo diario.

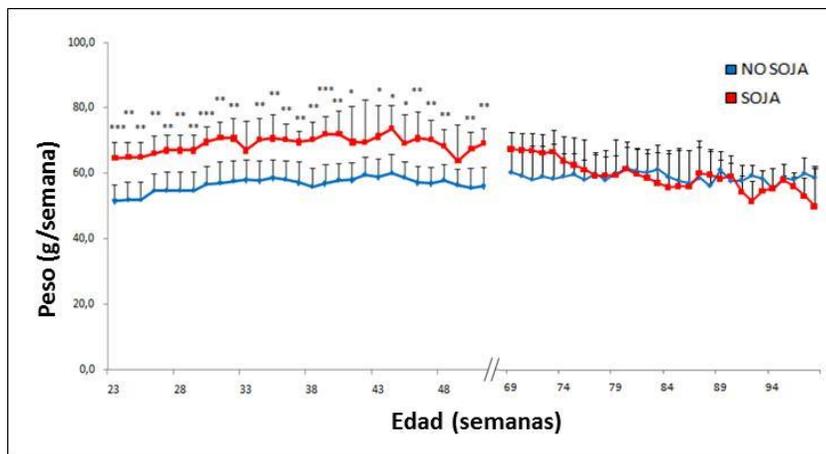


Figura 4.4.- Diferencias en el peso de los ratones alimentados con o sin soja.

Se determinan semanalmente los pesos y se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ frente al control. $n = 6$ ratones de cada grupo, a partir de la semana 23 de edad. Entre la semana 52 y la 56 no se pesan los ratones. A partir de la semana 57 se controla el peso de 11 ratones de cada grupo.

Con los resultados obtenidos del seguimiento del consumo y peso de los ratones a lo largo de su vida, no podemos afirmar que la soja tenga un papel favorable sobre la reducción del peso corporal ni como supresor del apetito de los ratones OF1 machos; e incluso podríamos plantearnos lo contrario.

4.5 PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA

El vínculo inicial entre la resistencia al estrés oxidativo y la longevidad es probablemente derivado de la larga tradición de la teoría de los radicales libres en el envejecimiento introducida por Harman (Harman 1956). El aumento del estrés oxidativo asociado a la edad es una consecuencia del desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes con una mayor producción de los primeros (Sies 1985).

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran varios posibles mecanismos de acción de los fitoestrógenos, de los cuales cabe destacar su capacidad de fijación a los receptores estrogénicos, de frenar la producción de radicales libres y su capacidad de inducir la sobre-expresión de enzimas antioxidantes tales como la manganeso superóxido dismutasa (Borras et al., 2006).

Por ello, uno de los objetivos de la presente tesis es determinar la producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas aisladas de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja y otros sin soja, y así poder estudiar el efecto antioxidante de los fitoestrógenos de la soja y su posible efecto beneficioso sobre la longevidad.

Analizando la evolución con la edad de cada grupo por separado, tenemos:

- a) La figura 4.5.1 que representa la tasa de producción de H_2O_2 por mitocondrias aisladas de hígado de ratones del grupo control. Lo resultados muestran diferencias entre los diferentes puntos de la curva:
 - Al 100% de supervivencia hay menos producción que los otros tres puntos de la curva.
 - Al 80% de supervivencia aumenta dicha producción con respecto al 100% de supervivencia.
 - Al 50% de supervivencia disminuye significativamente con respecto al 80% pero sigue siendo mayor que el 100% de supervivencia.
 - Al 10% de supervivencia vuelven a incrementarse, para alcanzar sus valores máximos, similares a los obtenidos al 80% y mayores que los del 100% y 50% de supervivencia.

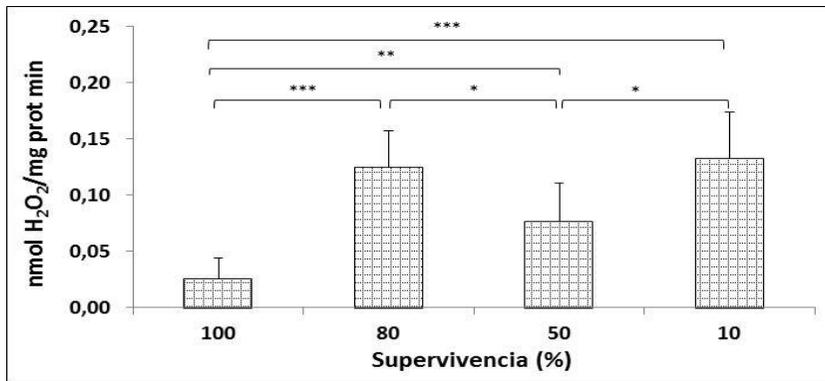


Figura 4.5.1.- Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

- b) Por otro lado, si nos fijamos en el grupo alimentado con una dieta rica en soja, representado en la figura 4.5.2 observamos la misma tendencia que en el caso del grupo control pero no son significativas las diferencias entre los cuatro puntos de la curva de supervivencia.

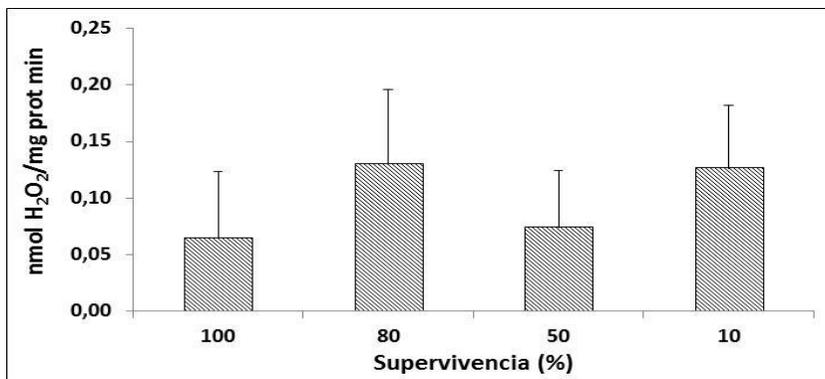


Figura 4.5.2.- Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

La figura 4.5.3 muestra la producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de los dos grupos de la curva de supervivencia.

Comparando las dos poblaciones entre sí, no encontramos diferencias significativas en ningún punto de la curva. Así pues, el consumo de soja no afecta la producción de peróxido de hidrógeno.

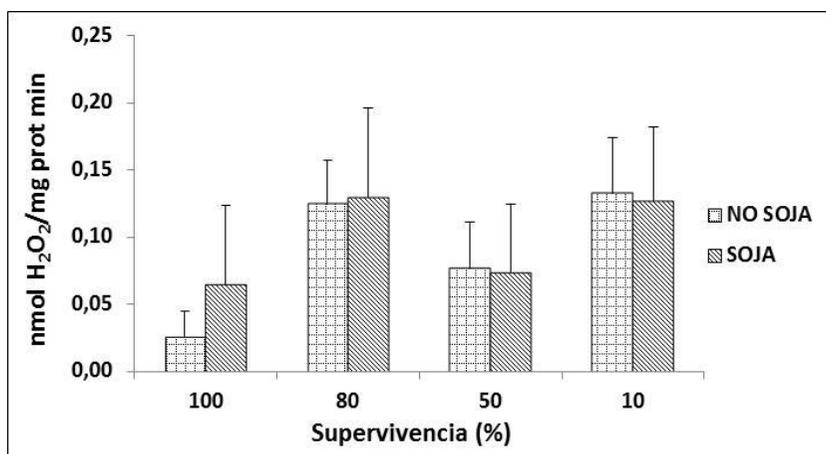


Figura 4.5.3.- Producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con y sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

Así pues, como conclusión podemos afirmar que efectivamente, a edades avanzadas hay una tendencia a incrementar la producción de peróxido de hidrógeno en ambos grupos.

Por otro lado, vimos que el consumo de soja podría paliar el efecto de la edad sobre la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos, puesto que, aunque hay una cierta tendencia, no se observan diferencias significativas con el envejecimiento de los ratones.

4.6 NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA

Entre las consecuencias del daño oxidativo a biomoléculas, está el daño a lípidos.

El MDA es un indicador de la peroxidación lipídica, y numerosos estudios revelan su incremento con el envejecimiento (Inal et al., 2001; Sverko et al., 2002; Mutlu-Turkoglu et al., 2003; Gil et al., 2006). En la presente tesis se ha medido el MDA en mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja, a diferentes edades de los ratones.

Para estudiar el efecto del envejecimiento sobre los niveles de MDA analizamos la evolución con la edad de cada grupo por separado:

- a) La figura 4.6.1 muestra los niveles de MDA en mitocondrias de hígado de ratones del grupo control. Aquí vemos que los niveles más bajos son los del 100% de supervivencia y que los máximos se alcanzan al 80% de supervivencia. Al 50 y 10% de supervivencia se revierte dicho incremento observado al 80% ($P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente) y sin embargo siguen siendo mayores que el 100% de supervivencia ($P < 0.05$).

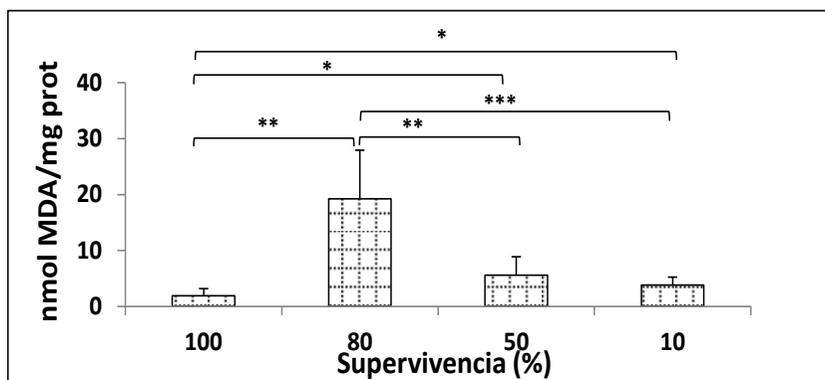


Figura 4.6.1.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

b) La figura 4.6.2 muestra los niveles de MDA en mitocondrias hepáticas de ratones alimentados con dieta rica en soja. Aquí a diferencia del grupo control, los niveles mínimos se producen en el último punto de la curva (al 10% de supervivencia), con una significación estadística de $P < 0.05$, $P < 0.001$ y $P < 0.05$ frente al 100, 80 y 50% de supervivencia, respectivamente.

Sin embargo, los niveles máximos se observan al 80% de supervivencia al igual que el grupo control.

Otra diferencia entre ambos grupos experimentales, es que en el grupo alimentado con soja no se observan diferencias significativas entre el 80 y el 50% de supervivencia, mientras que el grupo control, sí se observa con una significación de $P < 0.01$.

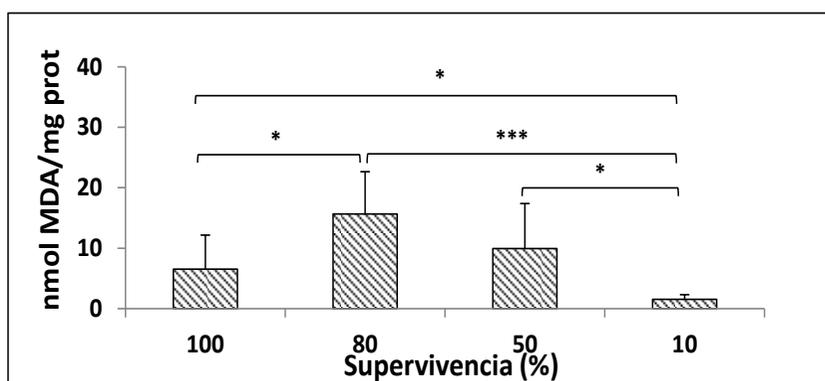


Figura 4.6.2.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

La figura 4.6.3 muestra los niveles de MDA de los dos grupos experimentales. En ésta vemos que tan solo en el último punto de la curva (10% de supervivencia), cuando los ratones son viejos, el grupo alimentado con soja tiene menores niveles de MDA que el grupo control ($P < 0.01$).

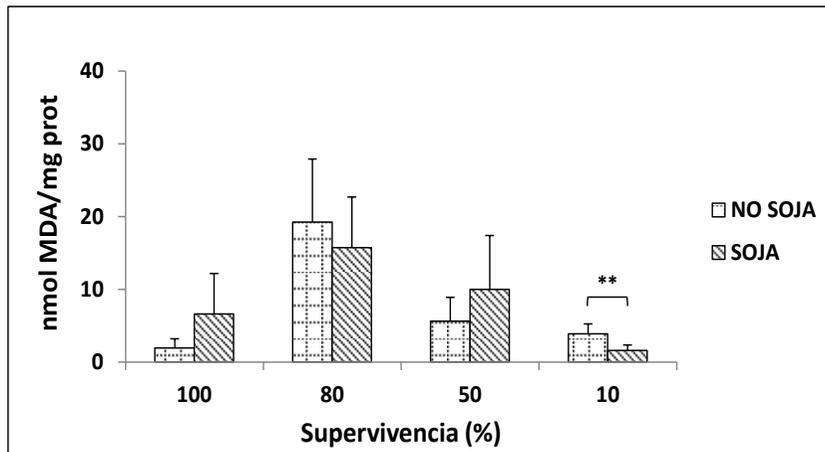


Figura 4.6.3.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con y sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**P < 0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

Como conclusión, hay una controversia entre los resultados observados y la típica acumulación de daño oxidativo a biomoléculas resultante del proceso de envejecimiento. En este caso, no hemos visto una correlación positiva entre los niveles de MDA y la edad de ratones.

En cuanto al efecto del consumo de soja sobre este parámetro, podemos concluir que la soja reduce los niveles de MDA en los ratones muy viejos.

4.7 PROTEÍNAS CARBONILADAS EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA

Las proteínas son otras biomoléculas afectadas por el daño oxidativo y su acumulación con la edad (Stadtman 1990; Sohal et al., 1994b; Sohal et al., 1995; Nagai et al., 2000; Chaudhuri et al., 2006).

Siendo uno de nuestros objetivos medir la oxidación proteica como parámetro de estrés oxidativo, lo hemos determinado en mitocondrias hepáticas de los ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.

Primero, analizando la evolución con la edad de cada grupo por separado, tenemos:

- a) La figura 4.7.1 representa la carbonilación proteica en mitocondrias de hígado de ratones del grupo control. Observamos claramente que los más viejos tienen niveles más altos que los jóvenes. Si la analizamos punto por punto vemos:
 - Al 100 y al 80% de supervivencia es donde hay menores niveles de proteínas carboniladas, sin diferencias entre ambos.
 - Al 50% de supervivencia aumenta significativamente con respecto a los dos puntos anteriores ($P < 0.001$).
 - Al 10% de supervivencia sigue aumentando para alcanzar su máximo valor, significativamente mayor que los anteriores puntos de la curva.

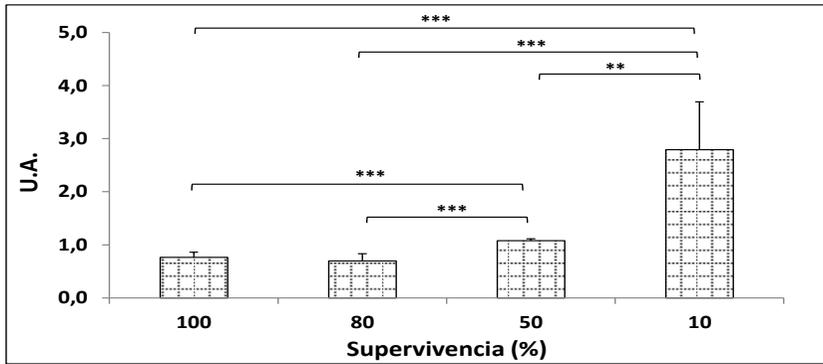


Figura 4.7.1.- Proteínas carboniladas en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**P<0.01$; $***P<0.001$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

- b) Por otro lado, si nos fijamos en el grupo alimentado con una dieta rica en soja, representado en la figura 4.7.2 observamos la misma tendencia que en el caso del grupo control, con la excepción de que, al 80% de supervivencia hay una disminución significativa con respecto al 100% ($P<0.01$). En este grupo también vemos que los más viejos tienen más niveles de proteínas carboniladas que los jóvenes ($P<0.001$).

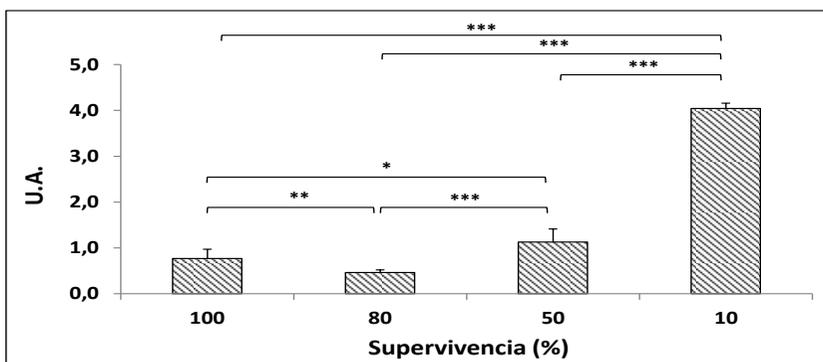


Figura 4.7.2.- Proteínas carboniladas en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P<0.05$; $***P<0.001$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

En cuanto al efecto del consumo de soja, la figura 4.7.3 muestra las diferencias entre los dos grupos de ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia. En ésta vemos que:

- Al 100 y al 50% de supervivencia no hay diferencias entre sí.
- Al 80% hay mayor oxidación proteica en las mitocondrias hepáticas del grupo control ($P<0.01$).
- Al 10% de supervivencia, ocurre lo contrario, es mayor en el grupo alimentado con soja en comparación con el grupo control ($P<0.01$).

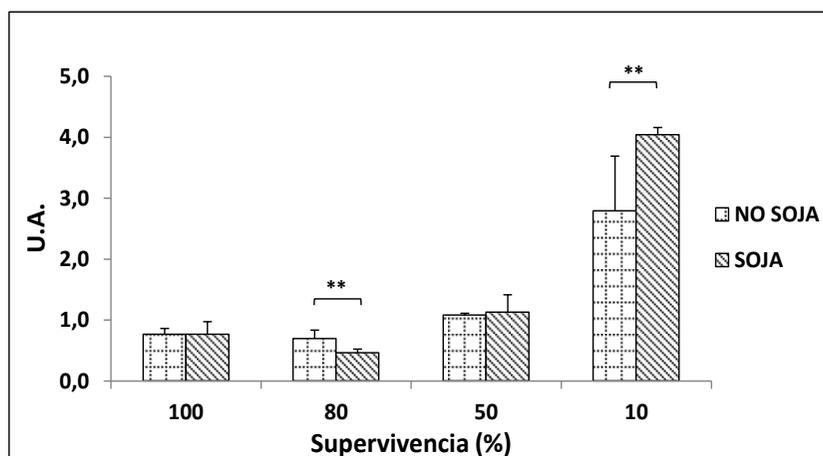


Figura 4.7.3.- Proteínas carboniladas en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con y sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P<0.05$; $**P<0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

Así pues, como conclusión podemos afirmar que efectivamente, con la edad hay un incremento en la oxidación de proteínas de las mitocondrias hepáticas de los ratones OF1 machos. Sin embargo, el consumo de soja parece que lo mejora en edades más jóvenes y lo empeora cuando los ratones son más viejos.

4.8 ANÁLISIS DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN HÍGADO DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA

Para mantener adecuados niveles de ROS, los organismos aeróbicos están equipados con un elaborado sistema de enzimas antioxidantes, tales como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa, etc. (Guemouri et al., 1991; Rohrdanz et al., 2002)

Uno de nuestros objetivos es determinar el efecto de la edad y del consumo de soja sobre la expresión y actividad de los genes antioxidantes en hígado de ratones OF1 machos.

Para ello hemos medido los niveles del mRNA, los niveles de la proteína y la actividad de las enzimas GPx y MnSOD.

4.8.1 Glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxidos (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH).

4.8.1.1 Niveles del mRNA de la GPx

Para estudiar el efecto del envejecimiento analizamos cada grupo por separado y su evolución con la edad. La figura 4.8.1.a. y la figura 4.8.1.b. representan la expresión del mRNA de la glutatión peroxidasa en hígado de ratones alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja respectivamente. En ninguno de los dos grupos hemos encontrado diferencias significativas con la edad.

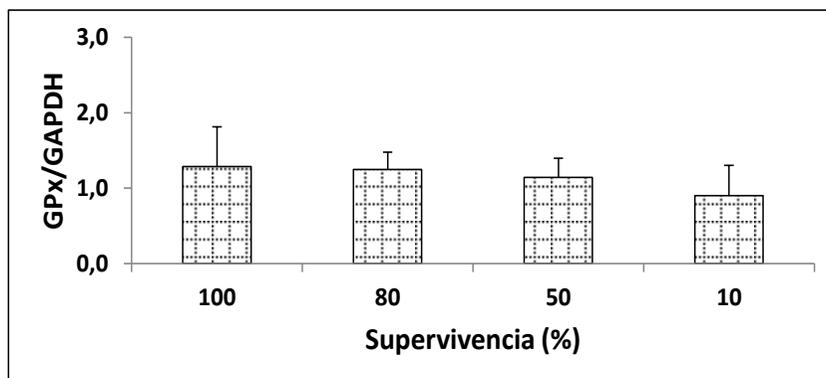


Figura 4.8.1. a.- Niveles del mRNA de la GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

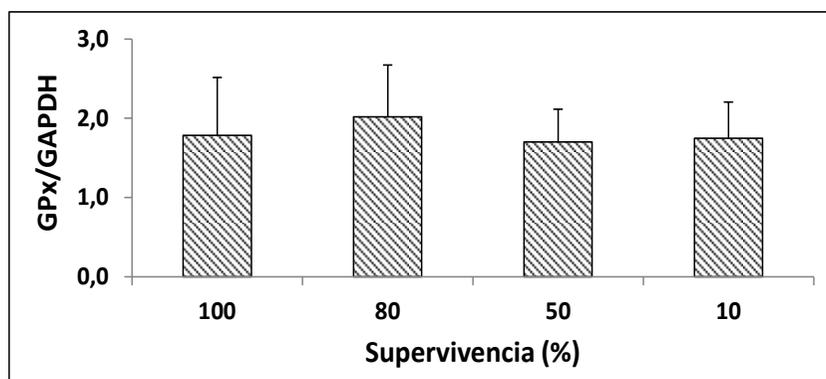


Figura 4.8.1. b.- Niveles del mRNA de la GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

La figura 4.8.1.c. muestra las diferencias en los niveles del mRNA de la glutatión peroxidasa en hígado de ratones alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja.

Comparando los dos grupos experimentales, vemos que hay diferencias en los niveles del mRNA de GPx a lo largo de prácticamente toda la curva de

supervivencia, siendo significativamente mayores en el caso del grupo alimentado con dieta rica en soja al 80, 50 y 100% de supervivencia.

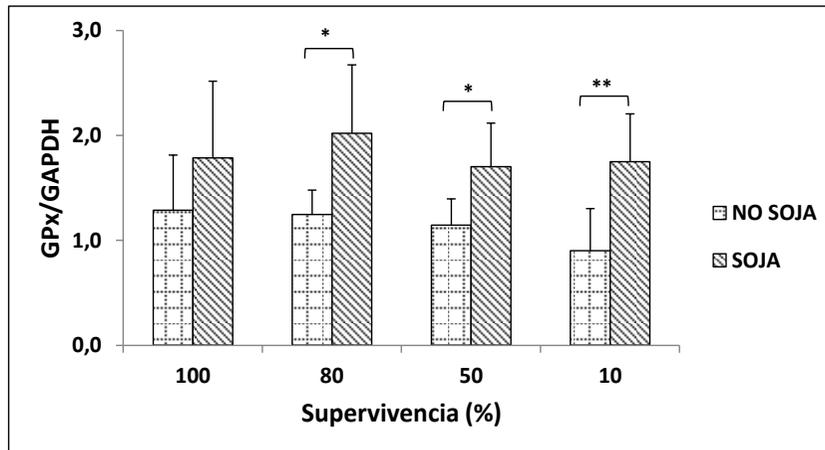


Figura 4.8.1. c.- Niveles del mRNA de la GPx en hígado de ratones OF1 machos.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

Así pues, aunque no hemos observado efecto ninguno de la edad, sí podemos afirmar que el consumo de soja en la dieta induce la sobre-expresión del gen antioxidante GPx en hígado de los ratones OF1 machos.

4.8.1.2 Niveles de la proteína GPx

La figura 4.8.2.a. y la figura 4.8.2.b. representan los niveles de la proteína glutatión peroxidasa en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja respectivamente.

En el caso del grupo control, vemos que al 10% de supervivencia hay mayor nivel de la proteína GPx ($P < 0.05$), en comparación con el 80 y al 50% de supervivencia. Mientras que, entre el 80 y 50% de supervivencia no se observaron diferencias.

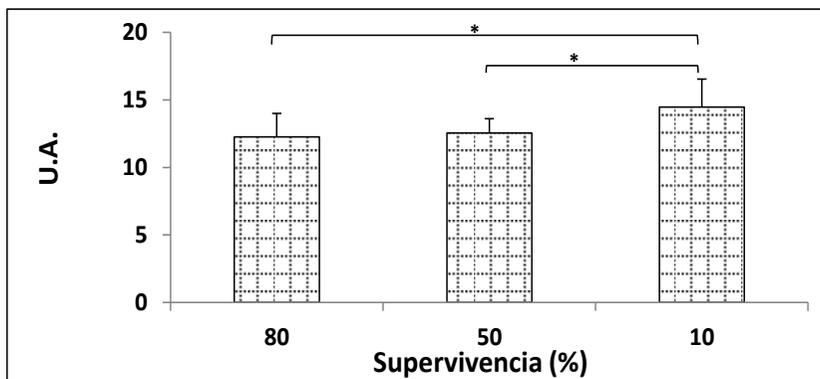


Figura 4.8.2. a.- Niveles de la proteína GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P < 0.05$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

En el caso del grupo alimentado con soja, representado en la figura 4.8.2.b, al 10% de supervivencia tiene mayor nivel de dicha proteína que al 50% ($P < 0.01$) pero similar al del 80%.

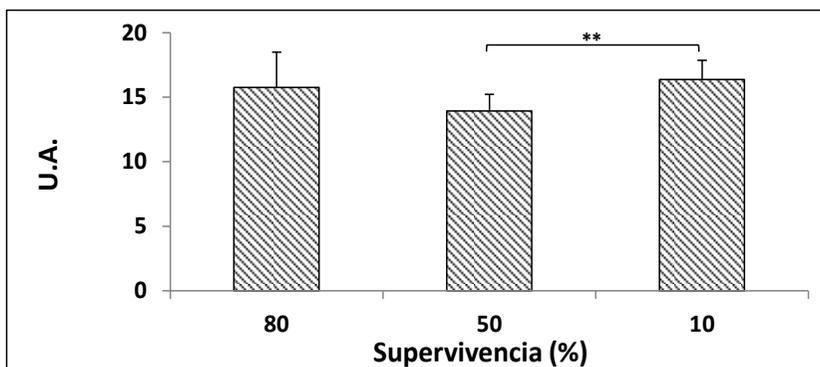


Figura 4.8.2. b.- Niveles de la proteína GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**P < 0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

Por otro lado, la figura 4.8.2.c. muestra las diferencias en los niveles de la proteína glutatión peroxidasa en hígado de ratones alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja.

En este caso, vemos que en los tres puntos analizados de la curva, hay mayores niveles de la proteína GPx en hígado de los ratones alimentados con soja ($P<0.001$ al 80% y $P<0.05$ al 50 y 10% de supervivencia) frente al grupo control.

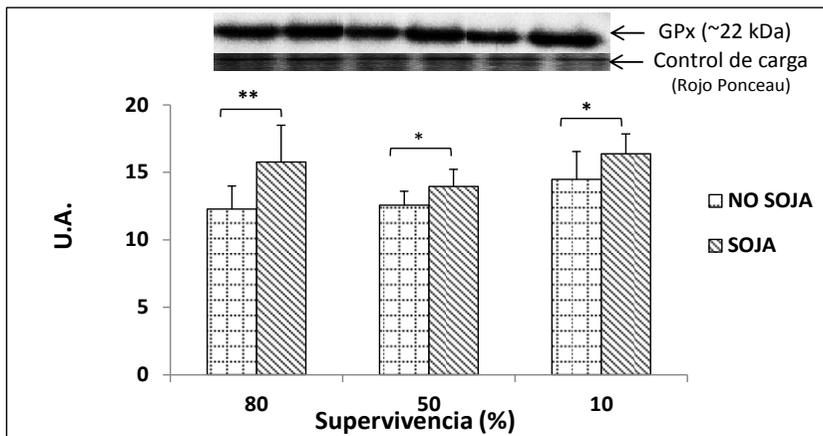


Figura 4.8.2. c.- Niveles de la proteína GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P<0.05$; $**P<0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%. Las bandas en la parte superior de la gráfica representan a cada grupo experimental y porcentaje de supervivencia presentados en barras en el eje X, respectivamente.

Podemos concluir que, con el envejecimiento aumentan los niveles de la proteína GPx en hígado de ratones OF1 machos, y que el consumo de soja induce este aumento en todas las edades estudiadas.

4.8.1.3 Actividad de la enzima GPx

Las figuras 4.8.3.a. y 4.8.3.b. representan la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en hígado de ratones alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja respectivamente. En ninguno de los dos grupos encontramos diferencias con la edad.

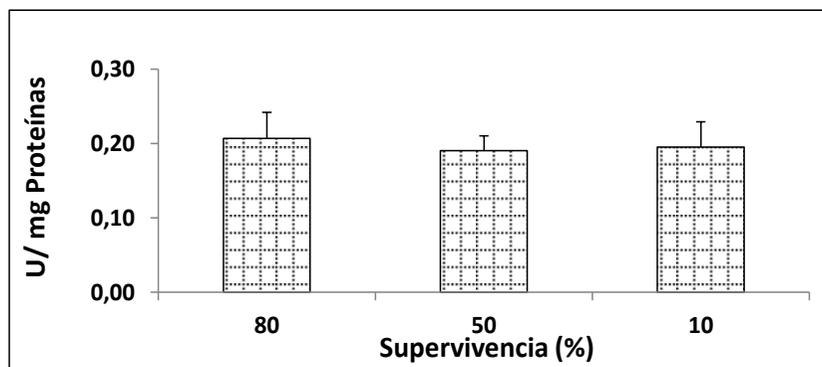


Figura 4.8.3. a.- Actividad enzimática de GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

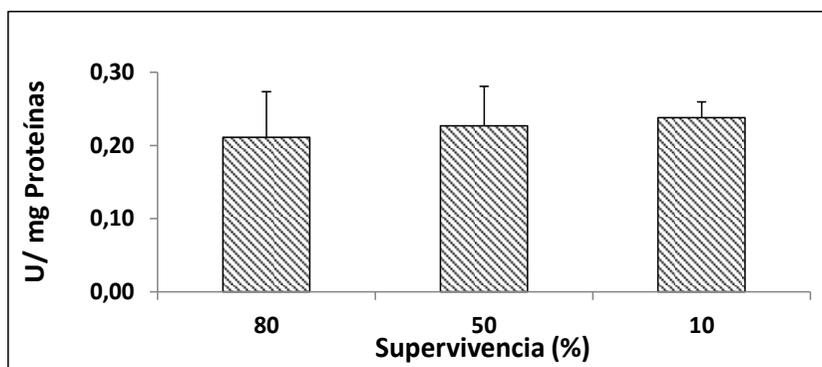


Figura 4.8.3. b.- Actividad enzimática de GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

La figura 4.8.3.c. muestra las diferencias en la actividad enzimática de GPx, entre los ratones alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja.

Observamos que hay mayor actividad enzimática en hígado de los ratones alimentados con soja ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control, únicamente en el último punto de la curva (10% de supervivencia), aunque al 50% de supervivencia se observa una tendencia no significativa.

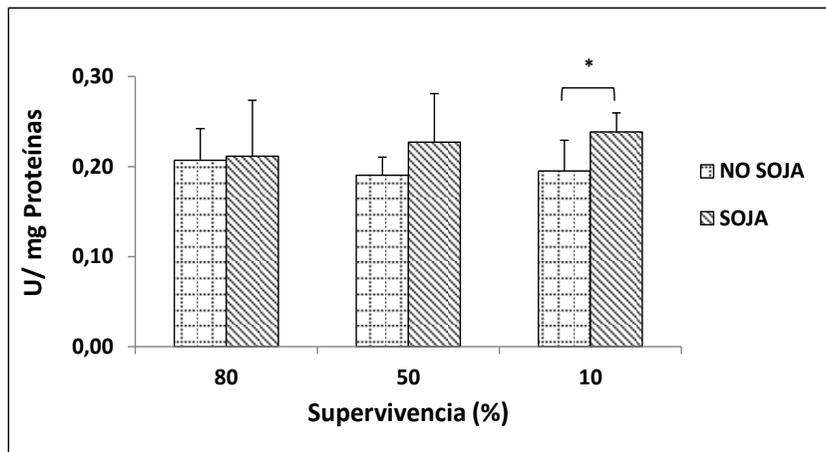


Figura 4.8.3. c.- Actividad enzimática de GPx en hígado de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P < 0.05$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

Como conclusión, podemos afirmar el envejecimiento no tiene efecto sobre la actividad enzimática de la GPx, al igual que la expresión genética. Sin embargo, el consumo de soja aumenta su actividad enzimática en hígado de ratones OF1 machos cuando son viejos.

4.8.2 Superóxido dismutasa

La manganeso superóxido dismutasa es otro componente importante del sistema antioxidante enzimático en la defensa celular contra el estrés oxidativo. Esta enzima cataliza la dismutación del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) que a su vez pueden ser eliminados por la catalasa o la glutatión peroxidasa.

4.8.2.1 Niveles del mRNA de MnSOD

Analizando la evolución con la edad de cada grupo por separado, tenemos:

- a) La figura 4.8.4.a. la cual representa los niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones alimentados con una dieta sin soja. Podemos observar cómo:
- A partir del 50% de supervivencia hay menos niveles del mRNA de MnSOD frente al 100 y 80% de supervivencia ($P < 0.01$).
 - Al 10% de supervivencia, estos niveles se mantienen bajos con respecto al 100 y 80% de supervivencia ($P < 0.05$), y son similares a los del 50% de supervivencia.

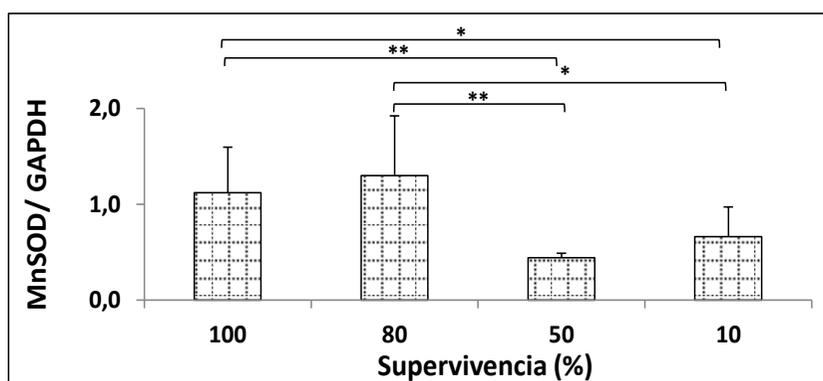


Figura 4.8.4. a.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P<0.05$; $**P<0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

b) La figura 4.8.4.b. representa los niveles relativos del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones alimentados con una dieta rica en soja. En ésta observamos que:

- Al 50% de supervivencia hay una disminución en los niveles del mRNA de la MnSOD en comparación con el 100 y 80% de supervivencia ($P<0.01$).
- Sin embargo, al 10% de supervivencia vuelve a incrementarse para ser mayor que el 50% ($P<0.001$) y similar al 100 y 80% de supervivencia. Es decir, cuando los ratones son viejos, la soja revierte la disminución en la expresión de la MnSOD observada al 50% con respecto al 100 y 80% de supervivencia.

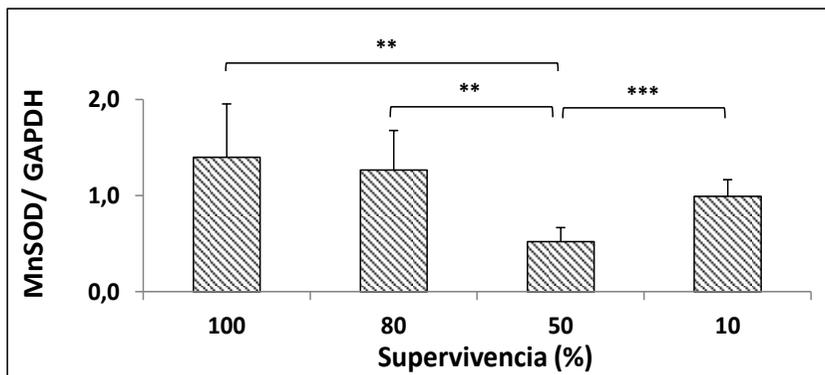


Figura 4.8.4. b.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**P<0.01$; $***P<0.001$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

Para ver el efecto del consumo de soja, la figura 4.8.4.c. compara los niveles del mRNA de la MnSOD, en hígado de ratones alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja.

Los resultados muestran que hasta el 50% de supervivencia no hay diferencias en los niveles del mRNA de la MnSOD entre los dos grupos experimentales. Sin embargo, son mayores los niveles en el grupo alimentado con soja ($P < 0.05$), al 10% de supervivencia.

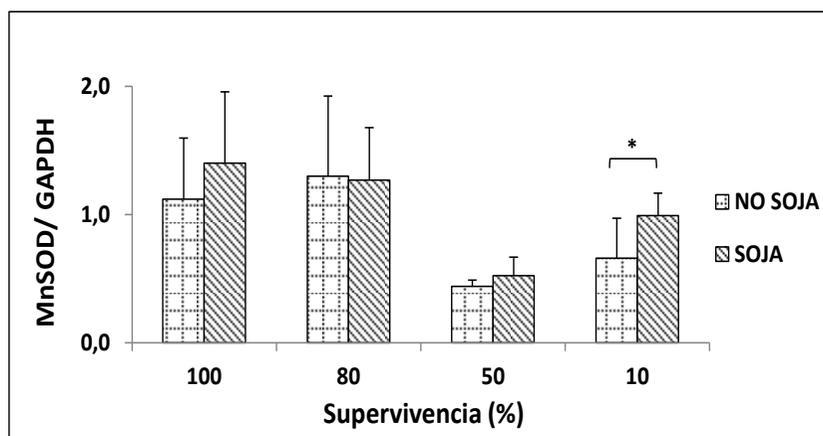


Figura 4.8.4. c.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P < 0.05$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 100, 80, 50 y 10%.

En vista a los resultados obtenidos, podemos concluir que con el envejecimiento los niveles del mRNA de MnSOD tienden a declinar, y que el consumo de soja revierte este declive en los más viejos, dicho de otra forma, los ratones viejos alimentados con soja mantienen tan altos los niveles de dicho gen como cuando son jóvenes, mientras que el grupo control tiene niveles más bajos al envejecer.

4.8.2.2 Niveles de la proteína MnSOD

La figura 4.8.5.a. y la figura 4.8.5.b. representan los niveles de la proteína MnSOD, en hígado de ratones alimentados con dieta sin soja y dieta rica en soja respectivamente. En el caso del grupo control, sólo vemos que al 10% de supervivencia hay mayores niveles de la MnSOD ($P < 0.05$), frente al 80%. Mientras que el grupo alimentado con soja, al 10% de supervivencia tiene niveles más altos de dicha proteína que al 80 y 50% ($P < 0.01$).

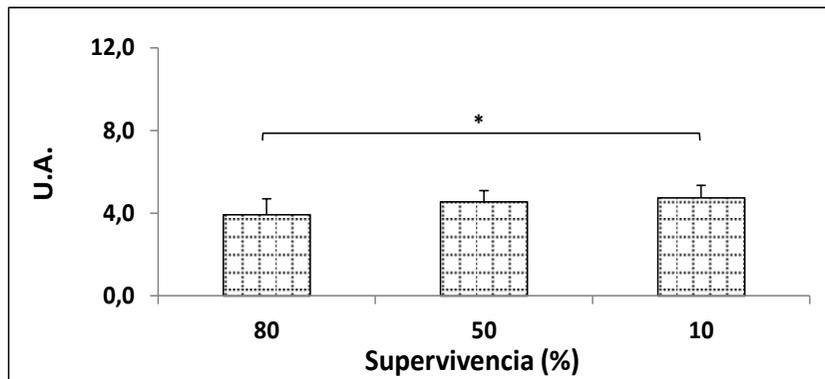


Figura 4.8.5. a.- Niveles de la proteína MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P < 0.05$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

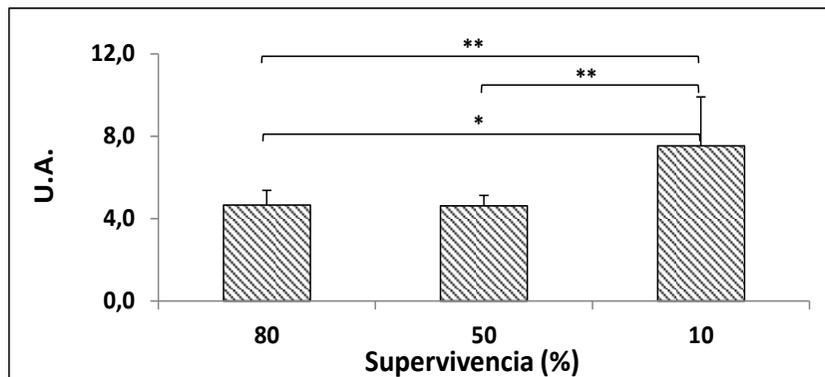


Figura 4.8.5. b.- Niveles de la proteína MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**p < 0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

Si comparamos los dos grupos entre sí, tenemos la figura 4.8.5.c. donde sólo en el último punto de la curva (10% de supervivencia), observamos mayores niveles de la proteína MnSOD en hígado de los ratones alimentados con soja ($P < 0.01$), en comparación con el grupo control.

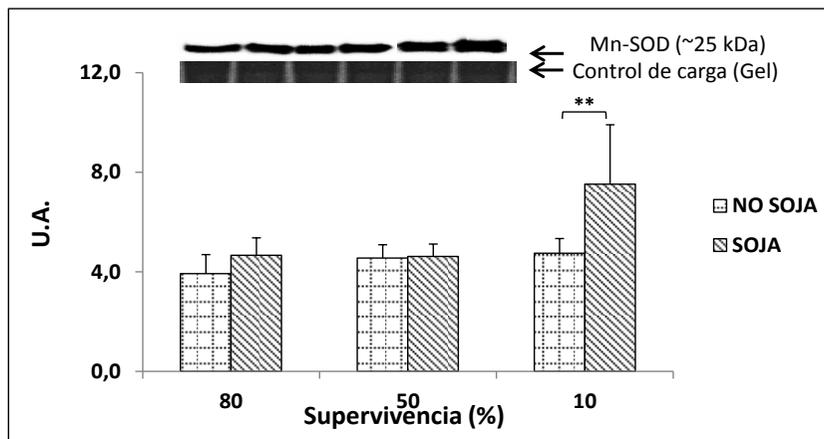


Figura 4.8.5. c.- Niveles del mRNA de la MnSOD en hígado de ratones OF1 machos.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**p < 0.01$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%. Las bandas en la parte superior de la gráfica representan a cada grupo experimental y porcentaje de supervivencia presentados en barras en el eje X, respectivamente.

En vista a los resultados obtenidos, podemos concluir que los ratones más viejos tienen mayores niveles de la proteína MnSOD.

Por otro lado, el consumo de soja aumenta la expresión de la proteína MnSOD hepática en ratones OF1 machos, pero sólo cuando son viejos.

4.8.2.3 Actividad enzimática de MnSOD

Al observar la evolución con la edad de cada grupo por separado, tenemos:

- a) La figura 4.8.6.a. que representa la actividad enzimática de MnSOD en hígado del grupo control. Aquí vemos una tendencia en el aumento de dicha actividad con la edad, pero solamente en el último punto de la curva de supervivencia (10%) es significativamente mayor que el 80% ($P < 0.01$).

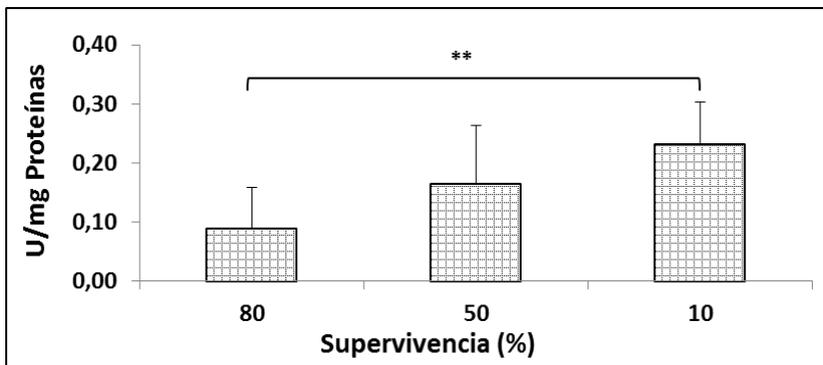


Figura 4.8.6. a.- Actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**P < 0.01$. No existen diferencias significativas. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

- b) La figura 4.8.6.b. representa la actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones alimentados con dieta rica en soja. Solamente en el último punto de la curva (10% de supervivencia) hay mayor actividad en comparación con el 50% de supervivencia ($P < 0.05$).

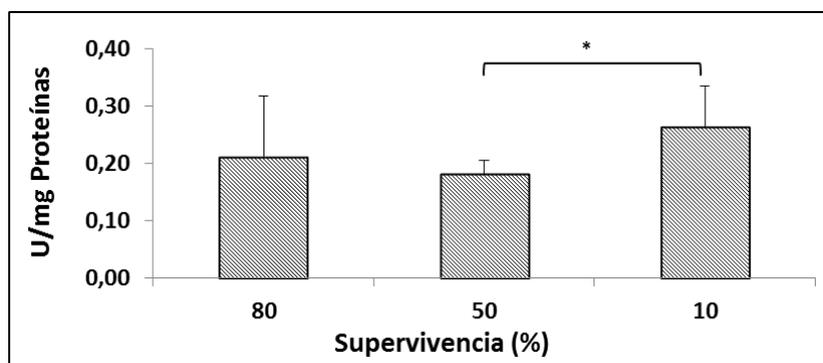


Figura 4.8.6. b.- Actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P < 0.05$. No existen diferencias significativas. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

Si comparamos los dos grupos entre sí con el objetivo de determinar si la soja tiene algún efecto sobre la actividad enzimática de MnSOD obtenemos la figura 4.8.6.c. En este caso, únicamente al 80% de supervivencia hay diferencias significativas en la actividad enzimática de MnSOD, siendo mayor en el grupo alimentado con soja frente al control ($P < 0.05$).

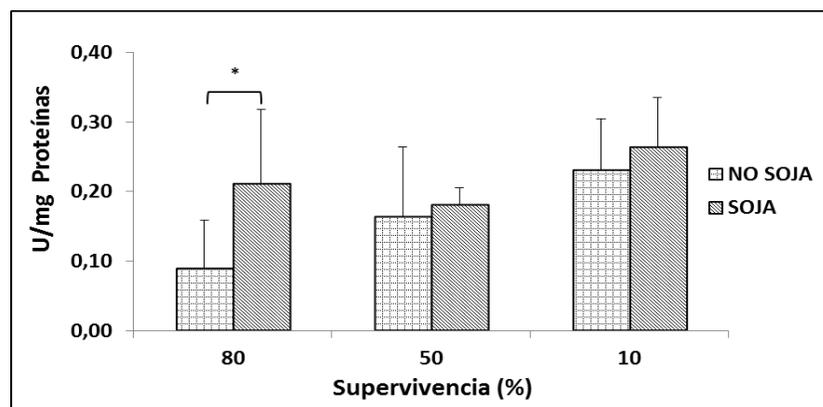


Figura 4.8.6. c.- Actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P < 0.05$. Cada punto corresponde a la media de cinco ratones de cada grupo experimental y a diferentes porcentajes de supervivencia: 80, 50 y 10%.

Como conclusión, al igual que en los niveles proteicos, la actividad enzimática de MnSOD en hígado de ratones más viejos es más alta.

Por otro lado podemos concluir que el consumo de soja aumenta la actividad enzimática de MnSOD a edades tempranas y no así en viejos.

4.9 DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA CEREBRAL *IN VIVO* MEDIANTE PET

En las últimas décadas, a través de los equipos de tomografía de emisión de positrones (PET) y los diferentes radiofármacos (como el análogo de la glucosa, ^{18}F -FDG) se pueden realizar estudios *in vivo*, no invasivos, para ver cómo afecta el envejecimiento al cerebro humano y al de animales de experimentación (Loessner et al., 1995; Ishii et al., 1997; Driscoll et al., 2006; Mosconi et al., 2008a).

Un estudio reciente de nuestro grupo ha demostrado cómo el metabolismo cerebral de glucosa se ve disminuido con el envejecimiento (Borras et al., 2009).

Además, Rasgon y colaboradores publicaron cómo los estrógenos preservan el metabolismo cerebral de aquellas regiones afectadas en la enfermedad de Alzheimer y en las mujeres postmenopáusicas (Rasgon et al., 2005).

Siendo uno de los objetivos de la presente tesis determinar el efecto del envejecimiento y el consumo de soja sobre el metabolismo cerebral de glucosa, a los animales se les realizó un estudio PET antes de sacrificarlos según los siguientes puntos de corte de la curva: al 100, 50 y 10% de supervivencia del grupo control.

Para determinar el efecto del envejecimiento, observamos la evolución con la edad de cada grupo por separado:

- a) La figura 4.9.1 representa el consumo cerebral de glucosa *in vivo* en los ratones alimentados con dieta sin soja. Vemos que al 100% de supervivencia hay menos consumo cerebral de glucosa en comparación con el 50 y 10% de supervivencia ($P < 0.001$). Y que no hay diferencias entre estos dos últimos puntos.

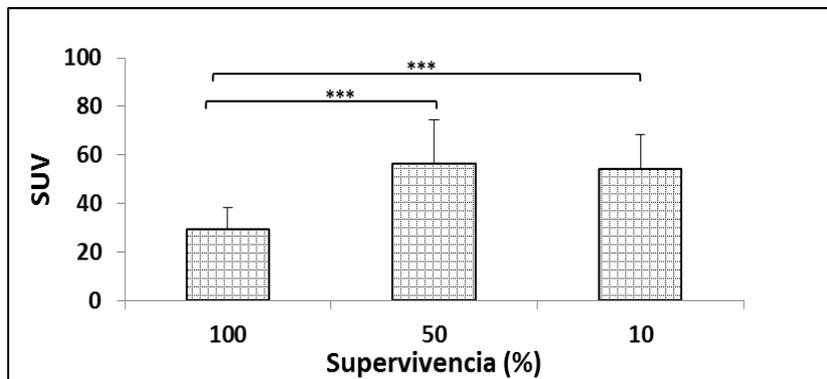


Figura 4.9.1.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* de ratones OF1 machos alimentados con dieta sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $***P < 0.001$. Los puntos del 100 y 10% de supervivencia corresponden a la media de ocho ratones. El punto del 50% de supervivencia corresponde a la media de doce ratones.

- b) La figura 4.9.2 representa el consumo cerebral de glucosa *in vivo* en los ratones alimentados con dieta rica en soja, donde vemos la misma tendencia observada en el grupo control, que al 100% de supervivencia hay menos consumo cerebral de glucosa en comparación con el 50 y 10% de supervivencia ($P < 0.05$). Y que no hay diferencias entre estos dos últimos puntos.

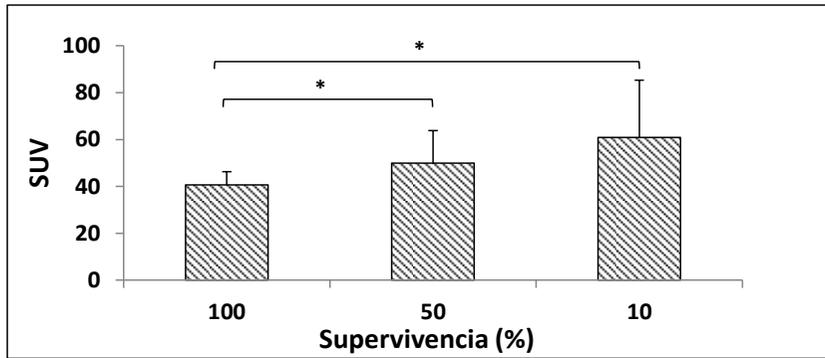


Figura 4.9.2.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $*P < 0.05$. Los puntos del 100 y 10% de supervivencia corresponden a la media de ocho ratones. El punto del 50% de supervivencia corresponde a la media de trece ratones.

Por otro lado, si lo que queremos evaluar es el efecto del consumo de soja, tenemos la figura 4.9.3 que muestra cómo el grupo alimentado con soja al 100% de supervivencia tiene un mayor consumo cerebral de glucosa que el grupo sin soja ($P < 0.01$). Esta diferencia se anula a medida que los animales van envejeciendo (al 50 y 10% de supervivencia).

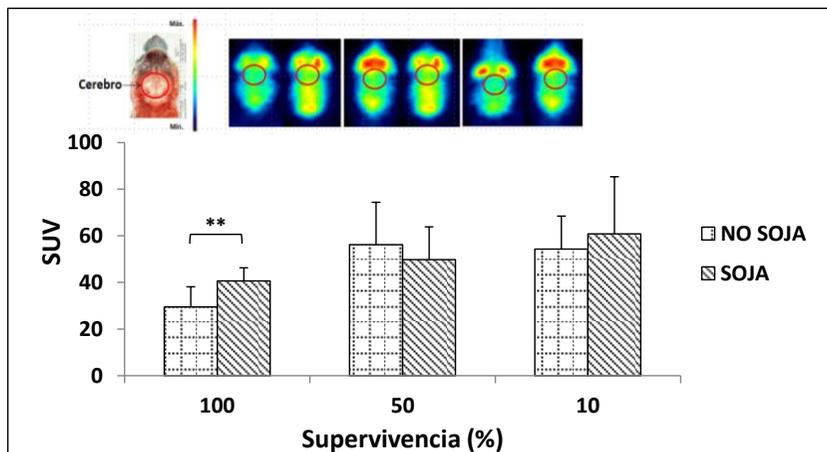


Figura 4.9.3.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística se expresa como $**P < 0.01$. Los puntos del 100 y 10% de

supervivencia corresponden a la media de ocho ratones de cada grupo experimental. El punto del 50% de supervivencia corresponde a la media de doce y trece ratones alimentados sin o con soja, respectivamente.

Como conclusión vemos que el consumo de glucosa cerebral aumenta con la edad en ambos grupos y que a edades jóvenes el cerebro de los ratones alimentados con soja es metabólicamente más activo que los que no comen soja.

4.10 TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL EN RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA CON O SIN SOJA

Entre los trastornos que se asocian con el envejecimiento está la intolerancia a la glucosa (Goren et al., 2004).

Así pues, y sospechando que los ratones de la curva podían tener sobrepeso, nos planteamos la realización del test de tolerancia a la glucosa oral.

El test fue realizado en dos puntos de la curva de supervivencia: al 50% y al 10%, representados en la figura 4.10.1 y figura 4.10.2 respectivamente. No observamos diferencias en la tolerancia a la glucosa oral entre los dos grupos, alcanzando ambos el máximo pico de absorción a los 15 minutos de la administración de la solución de glucosa.

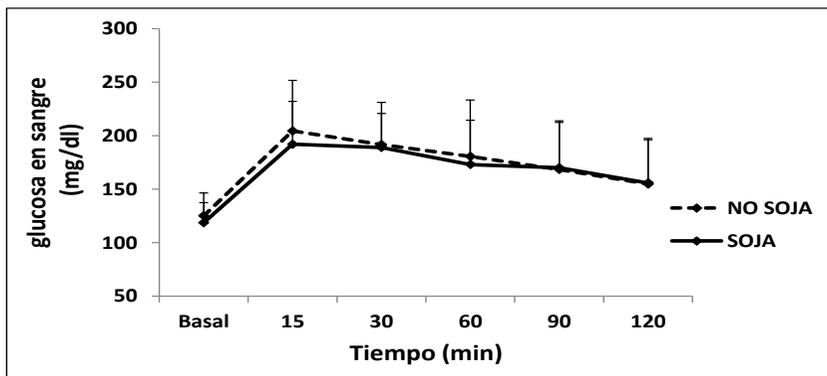


Figura 4.10.1.- Test de Tolerancia a la Glucosa Oral en ratones OF1 machos alimentados con dieta rica o sin soja.

Al 50% de supervivencia. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas entre ambos grupos. La n es de 11 ratones por cada grupo.

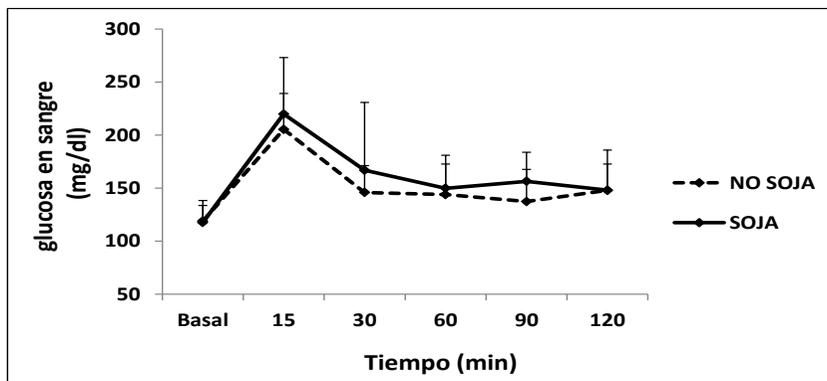


Figura 4.10.2.- Test de Tolerancia a la Glucosa Oral en ratones OF1 machos alimentados con dieta rica o sin soja.

Al 10% de supervivencia. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas entre ambos grupos. La n es de 6 ratones del grupo control y 5 del grupo soja.

Otro dato observado es que ni al 50 ni al 10% de supervivencia se estabilizaron los valores basales al cabo de los 120 minutos.

Como conclusión, no podemos afirmar que el consumo de dieta rica en soja mejore la tolerancia a la glucosa.

4.11 ACLARAMIENTO HEPÁTICO EN RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA

Como ya hemos visto en el apartado de la introducción, el envejecimiento se define como un proceso multifactorial que conlleva el deterioro de las funciones fisiológicas y, por consiguiente, pérdida en la homeostasis celular.

Basándonos en el trabajo de Zhang y Cuervo, publicado en Nature (Zhang et al., 2008), donde se demuestra la correlación entre el deterioro en la

función hepática y el envejecimiento; en nuestro estudio procedimos a analizar si el consumo de una dieta rica en soja podría tener o no efecto sobre la función hepática de los ratones OF1 machos.

Para ello, evaluamos el tiempo de parálisis inducida por un relajante muscular, la Zoxazolamina, siendo ésta una prueba común para valorar la función hepática.

La figura 4.11 nos muestra el tiempo medio de parálisis muscular de los dos grupos experimentales, al 50% de supervivencia, y en la cual no observamos diferencias significativas entre ambos grupos.

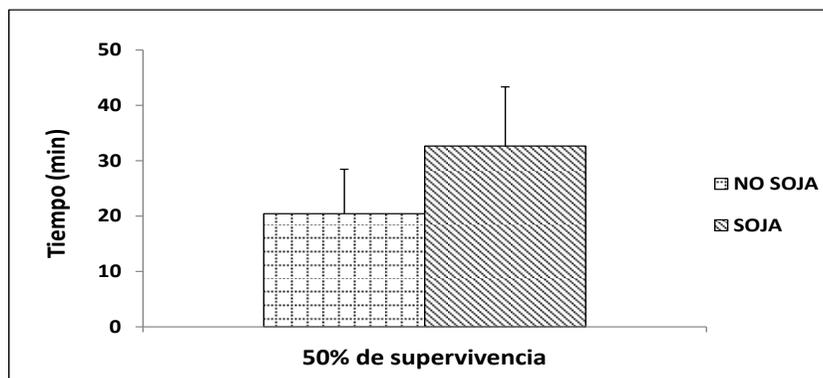


Figura 4.11.- Tiempo de parálisis muscular con Zoxazolamina de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica o sin soja.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm SEM. No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales. $n = 7$ ratones del grupo control y 6 del grupo soja.

Tras este resultado, visto que el grupo alimentado con dieta rica en soja tiende a tardar más en metabolizar el relajante muscular (aunque no sean significativas las diferencias), no podemos concluir que el consumo de soja tenga efectos beneficiosos sobre la función hepática.

4.12 RECONOCIMIENTO DE OBJETOS NUEVOS DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON O SIN SOJA

El proceso de envejecimiento en muchos casos conlleva también el declive en las capacidades cognitivas, tales como la memoria y el aprendizaje (Erickson et al., 2003; Rosenzweig et al., 2003; Frick 2009).

Si bien ha habido numerosos estudios sobre los posibles efectos beneficiosos de las isoflavonas de la soja en varias enfermedades relacionadas con la edad, poco se sabe de su influencia sobre la función cognitiva.

Gracias al efecto estrogénico de los fitoestrógenos se cree que pueden mejorar las funciones cognitivas al imitar los efectos del estrógeno en el cerebro (Pan et al., 1999; Bansal et al., 2010).

Por ello, realizamos el “test de reconocimiento de objetos nuevos” para evaluar el efecto del consumo de soja sobre el aprendizaje y la memoria de ratones OF1 machos alimentados durante toda su vida con dieta rica en soja, en comparación con un grupo control alimentados con dieta sin soja.

El experimento lo hemos llevado a cabo en cuatro puntos de la curva (a diferentes edades) para comparar así los dos grupos entre sí y a lo largo de su vida. Evaluamos la memoria a corto plazo (a la hora) y a largo plazo (a las 24 horas).

Las figuras 4.12.1 4.12.2 nos muestran el porcentaje de exploraciones realizadas, al cabo de una hora y 24 horas respectivamente, por los ratones de los dos grupos de la curva, al objeto nuevo en comparación con uno familiar. Nuestros resultados no muestran diferencias en cuanto al índice de preferencia por el objeto nuevo ni a la hora ni al cabo de 24 horas. Tampoco vemos diferencias con la edad de los ratones.

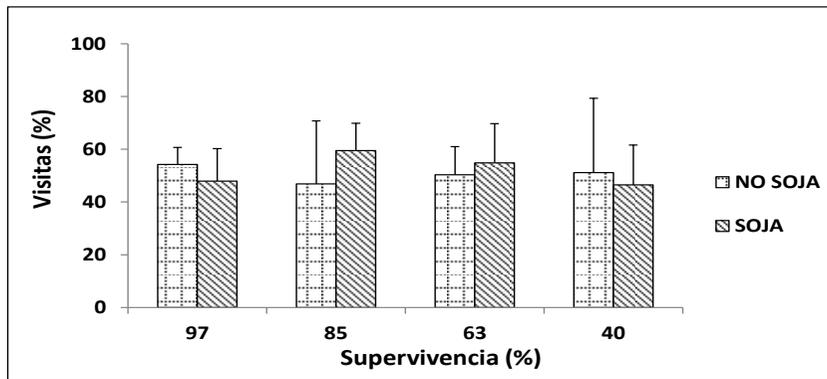


Figura 4.12.1.- Reconocimiento de objetos nuevos a la hora.

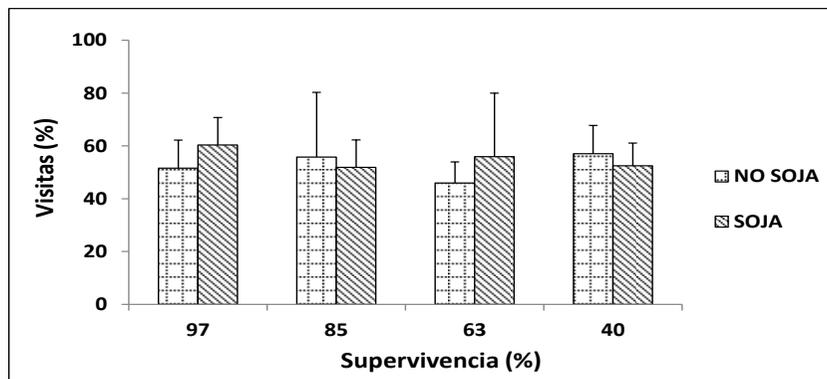


Figura 4.12.2.- Reconocimiento de objetos nuevos a las 24 horas.

Índice de reconocimiento de objetos nuevos al 97, 85, 63 y 40% de supervivencia del grupo control.

$$\text{Índice de preferencia} = \frac{\text{Nuevo}}{(\text{Familiar} + \text{Nuevo})} * 100$$

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas. La n es de 6 ratones de cada grupo en cada punto del experimento.

Por lo tanto no parece que ni la edad ni el consumo de soja tengan efecto sobre la capacidad cognitiva de ratones OF1 machos.

4.13 COORDINACIÓN MOTORA DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADOS CON DIETA CON O SIN SOJA

Entre los biomarcadores de envejecimiento adicionales bien establecidos que ya existen, decidimos valorar la pérdida progresiva de coordinación neuromuscular (Ingram et al., 1986), la cual puede ser medida con el llamado “Test de la Cuerda ‘Tirante’” (ver en el apartado de materiales y métodos, *Tightrope Test*).

Como muestra la figura 4.13 que representa el resultado obtenido al 50% de supervivencia (con 17 meses de edad), no encontramos diferencias significativas entre los animales alimentados con una dieta rica en soja y sin soja.

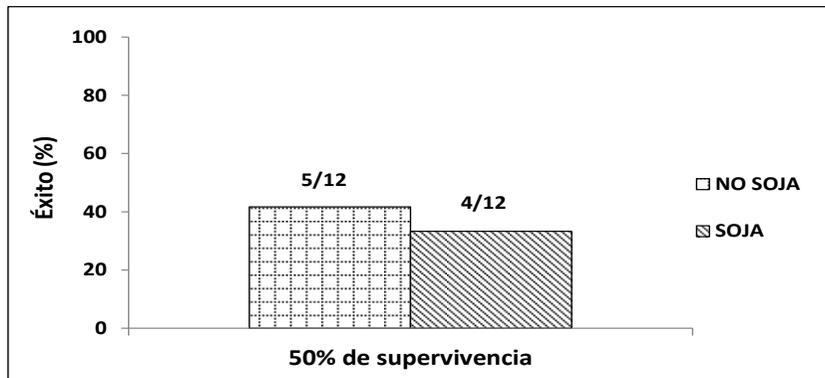


Figura 4.13.- Coordinación motora de ratones OF1 machos alimentados con o sin soja.

Al 50% de supervivencia. Los valores se expresan como “porcentaje de éxito” (n = 12 por grupo).

4.14 FUERZA DE AGARRE DE LOS MIEMBROS ANTERIORES DE RATONES OF1 MACHOS ALIMENTADO CON O SIN SOJA

La prueba de la fuerza de agarre mide el reflejo de agarre de los miembros anteriores, que es un reflejo de la fuerza muscular y la integración neuromuscular de las extremidades anteriores (Tanase et al., 2004).

Así pues, se considera un test que proporciona información del rendimiento motor y de comportamiento de los animales, complementando la información obtenida en la prueba anterior (coordinación motora).

Ambas pruebas tienen la misma tendencia, como refleja en este caso la figura 4.14, ya que no existen diferencias significativas entre los dos grupos, al medir la fuerza de agarre de los miembros anteriores.

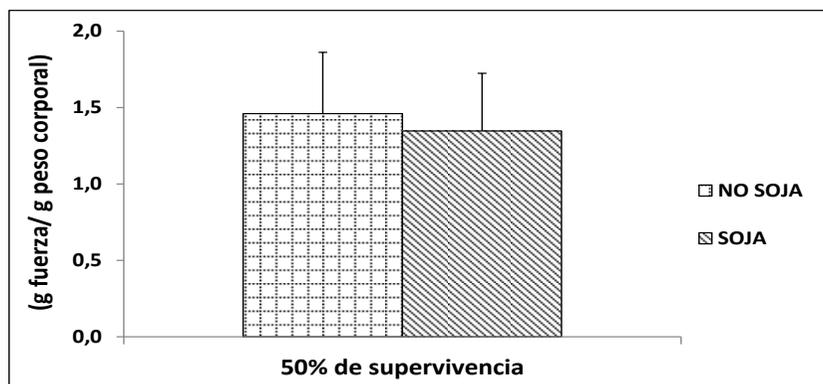


Figura 4.14.- Test de fuerza de agarre de los miembros anteriores.

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas entre ambos grupos. La n es de 17 ratones por grupo. Al 50% de supervivencia de ambos grupos experimentales.

A la luz de los últimos resultados de estas pruebas, parece ser que la alimentación con una dieta rica o no en soja, no afecta significativamente al rendimiento motor y de comportamiento.

5 DISCUSIÓN

5.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El proceso de envejecimiento es extremadamente complejo y multifactorial (Vina et al., 2007a). Todas las contradicciones que derivan de sus teorías sólo acentúan dicha complejidad.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que las diferencias de longevidad entre machos y hembras tienen una base biológica: los estrógenos suponen una ventaja en la supervivencia de las hembras frente a los machos, puesto que inducen la expresión de enzimas antioxidantes, y ello las protege frente al estrés oxidativo, y por tanto les confiere una mayor longevidad (Borras et al., 2003; Vina et al., 2005a). Sin embargo, la administración de estrógenos a humanos presenta una serie de efectos muy perjudiciales, tales como riesgo de cáncer (Rossouw et al., 2002) o un efecto feminizante en el caso de los hombres (Coveney et al., 2001).

Hay gran interés de la investigación científica en los últimos años sobre los fitoestrógenos, que se definen como cualquier sustancia vegetal o metabolito biológicamente activo, con estructura química similar al estrógeno endógeno y por ello induce respuestas biológicas en vertebrados modulando o imitando las acciones de éste (Madej et al., 2002). Dicha atención, se debe a su papel protector contra enfermedades relacionadas con la edad (enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, etc.), los cánceres hormono-dependientes (cáncer de mama o de próstata) y los síntomas climatéricos (Anthony et al., 1996; Barnes 1998; Aoyama et al., 2000; Lephart et al., 2004a; Mahn et al., 2005; Park et al., 2005).

Las isoflavonas se han clasificado dentro de los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (con acción estrógeno-agonistas y antagonistas) (Miksicek et al., 1995), en parte debido a su unión preferencial y transactivación del ER- β en comparación con ER- α (Kuiper et al., 1998b).

Las diferencias en la afinidad y la actividad estrogénica entre los fitoestrógenos y los estrógenos endógenos hacen difícil evaluar si la actividad biológica es debida a unos u otros en el caso de las hembras. En los machos los compuestos estrogénicos endógenos están presentes en cantidades insignificantes, por lo que el pleno efecto de los fitoestrógenos se observaría únicamente en los órganos diana.

En 2005, nuestro grupo en colaboración con el grupo del profesor Giovanni Mann del King's College de Londres, descubrió que el consumo habitual de soja en ratas induce la expresión de genes antioxidantes y de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en distintos tejidos, produciendo una mejora en la función endotelial y una reducción de la presión arterial *in vivo*, concluyendo así, que las isoflavonas de soja podían ser alternativa en la terapia de síntomas de la menopausia y las enfermedades coronarias (Mahn et al., 2005).

También en nuestro laboratorio se ha demostrado que la genisteína, el fitoestrógeno más abundante en la soja, a concentraciones nutricionalmente relevantes, reproduce los efectos antioxidantes del estradiol mediante el mismo mecanismo, activando la vía de señalización de las MAPK (ERK1/ 2) y la translocación del NF-kB (Borras et al., 2006).

Así pues, con el objeto de determinar los posibles beneficios sobre la longevidad de una dieta rica en soja realizamos una curva de supervivencia en poblaciones controladas de ratones OF1 machos alimentados con una dieta rica en soja (150-250 mg/kg de isoflavonas) para mimetizar la sociedad consumidora de estas sustancias de forma habitual, y otro grupo alimentado con una dieta sin soja que representaría la sociedad occidental (ver apartado Materiales y Métodos).

5.2 CONCENTRACIÓN DE ISOFLAVONAS EN PLASMA

La soja es la fuente alimenticia más rica en fitoestrógenos bioactivos llamados isoflavonas, y su biodisponibilidad es altamente dependiente del metabolismo bacteriano-intestinal (Setchell et al., 2002).

Según la bibliografía, las acciones beneficiosas de las isoflavonas se producen a concentraciones nutricionalmente relevantes, como las encontradas en el plasma de la sociedad oriental consumidora de dieta rica en soja de forma habitual (Setchell et al., 1999; Brown et al., 2001; Borrás et al., 2006).

Hay que ser cauteloso a la hora de interpretar los posibles efectos de la suplementación con isoflavonas ya que deben considerarse factores que influyen en la absorción y metabolismo de dichas sustancias, la dieta y la microflora intestinal, la dosis ingerida, la duración de la ingesta, entre otros (Rowland et al., 2003; Cassidy et al., 2006a).

Según varios autores, la concentración plasmática de isoflavonas en adultos que consumen cantidades diarias moderadas de soja, como es el caso de los japoneses, oscila entre 200 nM y 3200 nM (50-800 ng/mL) (Adlercreutz et al., 1993b; Setchell et al., 1999; Uehar et al., 2000; Morton et al., 2002). En los humanos con dieta habitual sin soja, estas concentraciones son <40 nM (10 ng/mL) (Adlercreutz et al., 1993a).

En nuestro caso, además de haber administrado una dieta equiparable a la oriental en su contenido de isoflavonas, era necesario determinar su concentración plasmática donde también hemos observado que son similares, con un total de casi 600 nM (≈ 150 ng/mL) en nuestro grupo de ratones alimentados con dieta rica en soja, que supone cerca de 20 veces el grupo control (30 nM ≈ 7.6 ng/mL). La cantidad tan baja de isoflavonas encontrada en el plasma de algunos ratones del grupo control (alimentado con dieta sin soja), probablemente, es producto de trazas de isoflavonas procedentes de otros

granos que componen la dieta, teniendo en cuenta que la dieta control es sin soja.

Por lo tanto, los ratones alimentados con una dieta rica en soja muestran niveles significativamente más altos de genisteína, daidzeína y equol en comparación con los ratones alimentados con dieta sin soja. Así mismo, son similares a las concentraciones encontradas en humanos.

El equol es la isoflavona predominante en el plasma, en nuestro caso, representa hasta más del 90% de la concentración total de isoflavonas, resultado consistente con otros datos del metabolismo de estos compuestos en roedores (Brown et al., 2001; Setchell et al., 2005; Setchell et al., 2011).

En resumen, con la determinación de la concentración plasmática de isoflavonas nos aseguramos de que efectivamente los ratones empleados en este estudio han sido capaces de absorber y metabolizar estas sustancias y que la dosis administrada nos proporciona valores equivalentes a los obtenidos en poblaciones consumidoras habituales de soja en la dieta.

5.3 PERFIL METABÓLICO

Como ya hemos destacado anteriormente, la metabolómica es una disciplina emergente que se basa en la medición y el estudio de todos los metabolitos de bajo peso molecular endógenos para establecer una visión general del estado metabólico de un sistema biológico. La caracterización de los metabolitos puede proporcionar información sobre los mecanismos subyacentes a las acciones genómicas o ambientales en el metabolismo (Tikunov et al., 2010).

Y así se ha observado en nuestros resultados, obteniendo perfiles metabólicos generales totalmente diferentes en las mitocondrias aisladas de hígados de ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja frente a otros alimentados con dieta sin soja.

No obstante, a nivel sistémico el perfil metabólico en plasma no observamos diferencias ni entre los dos grupos ni con la edad. Este hecho podría explicar algunos de los resultados paradójicos que hemos observado.

Si con la concentración de isoflavonas nos aseguramos de que realmente los animales empleados son capaces de metabolizar las isoflavonas ingeridas, con el perfil metabólico podemos corroborar tal hecho. Esto también nos permite interpretar, como afirma el grupo de Cassidy, cualquier efecto de las isoflavonas sobre vías de metabolismo energético así como sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud (Solanky et al., 2005).

5.4 EFECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA LONGEVIDAD

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. Hasta hace muy poco se ha descrito a la restricción calórica como la única medida dietética conocida, capaz de reducir la tasa de envejecimiento, aumentando la longevidad media y máxima y que daba lugar a efectos beneficiosos sobre el estado general de salud de una amplia variedad de especies (Weindruch 1996a; b; Colman et al., 2009); sin embargo, un estudio reciente realizado por el grupo liderado por Rafael de Cabo, rechaza la capacidad de la restricción calórica en la prolongación de la vida, al menos en monos Rhesus (*Macaca mulatta*), aunque sí reconoce sus efectos positivos sobre la salud de estos primates (Mattison et al., 2012). Posibles razones de la variación en el efecto de la restricción calórica sobre la longevidad de los monos son la composición de la dieta y la genética de los monos estudiados.

Existe mucha controversia sobre los efectos de las sustancias estrogénicas, como son los fitoestrógenos, sobre la longevidad.

Estudios epidemiológicos sugieren que la dieta tradicional oriental tiene efectos beneficiosos sobre la salud y la longevidad humana; se sospecha que los componentes nutricionales derivados de la soja, por sus efectos estrogénicos, juegan un papel importante en estos efectos (Anderson et al., 1995; Adlercreutz 1998; Suzuki et al., 2001).

En contraste, el estudio realizado por Altun y colaboradores, indica una correlación negativa entre la concentración ingerida de genisteína y la longevidad de la *Drosophila melanogaster* (Altun et al., 2011). También se ha encontrado un efecto negativo sobre la supervivencia en ratas hipertensas tratadas con isoflavonas (Gilani et al., 2009).

En nuestro estudio no observamos ningún efecto del consumo de soja sobre la vida media ni la máxima de ratones OF1 machos, en comparación con los alimentados con dieta sin soja.

Resulta difícil una conclusión contundente al respecto, ya que depende de muchos factores entre ellos el genotipo, como demostraron en su estudio del 2004, Bartke y colaboradores, donde concluyeron que el efecto del consumo de productos derivados de soja sobre la expectativa de vida era dependiente del genotipo (Bartke et al., 2004).

Otro aspecto a tener en cuenta es que las condiciones de vida de los ratones en el laboratorio son tan favorables que una intervención nutricional no es suficiente para modificar la longevidad. Pensamos que sí podría tener efecto en condiciones más desfavorables.

5.5 EFECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTOS Y EL PESO CORPORAL

Revisando la bibliografía encontramos que la soja en la dieta podría ser útil sobre el consumo de energía y en la prevención de la obesidad y los trastornos asociados (Aoyama et al., 2000; Bhathena et al., 2002; Lee 2006; Velasquez et al., 2007; Cederroth et al., 2008; Blake et al., 2011).

Parte del efecto antiobesidad de proteína de soja puede ser debido a la presencia de las isoflavonas, ya que las isoflavonas de la soja han demostrado disminuir el acúmulo de determinados depósitos de grasa en varios modelos animales de obesidad (Ali et al., 2004; Manzoni et al., 2005).

En nuestro estudio, que ha sido realizado en ratones OF1 machos, no hemos visto tal efecto beneficioso de la alimentación con dieta enriquecida en soja frente a una sin soja, sobre la reducción del peso corporal. De hecho, como hemos visto en nuestros resultados, durante el periodo en el que la ingesta de alimentos no se controlaba sino que era *ad libitum*, al contrario de lo esperado, el grupo con una dieta rica en soja pesaba más que el grupo sin soja, pues la cantidad de alimento ingerida era mayor. Sin embargo, dicha diferencia, en el consumo y peso corporal entre los dos grupos, desaparece al controlar la ingesta y limitarla a siete gramos diarios.

Otro dato curioso, es que ambos grupos, posiblemente, tengan sobrepeso si tenemos en cuenta que el peso medio de esta cepa de ratones machos está entre los 40 y 50 gramos. Mientras que los de nuestro estudio superan los 60 gramos. Esto puede ser debido a su condición sedentaria al estar enjaulados individualmente y, particularmente porque la dieta ingerida está enriquecida, con un contenido proteico del 18% y 6% de lípidos (especial para crías y condiciones especiales), en cambio la dieta normal contiene 14% de proteínas y 4% de lípidos.

En base a nuestro resultado, no podemos atribuirles a las isoflavonas de la soja efectos beneficiosos sobre el consumo de energía ni sobre el peso corporal. Lo mismo demostró Martin O Weickert en 2006, en su estudio en mujeres postmenopáusicas sanas (Weickert et al., 2006). Sin embargo, Lephart en 2004 y Cederroth en 2007, en sus estudios en ratas Long-Evans machos y ratones CD-1 machos, respectivamente, concluyeron que los alimentados con dieta rica en isoflavonas de soja, aunque pesaran menos que los que no comían soja, su consumo energético era mayor (Lephart et al., 2004b; Cederroth et al., 2007). Ambos autores sugieren que la regulación central del balance energético en el hipotálamo puede ser modulada por la soja o sus fitoestrógenos, por ejemplo modificando los niveles de neuropéptidos como NPY y AgRP estimulando o inhibiendo la ingesta de alimentos.

También se ha visto en otros estudios más recientes un efecto beneficioso en la capacidad de las isoflavonas de soja en reducir el peso corporal de roedores (Cederroth et al., 2008; Blake et al., 2011). Por el contrario, otros han observado un aumento del peso en cerdos enanos que ingerían altas dosis de isoflavonas (Li et al., 2011).

Para concluir, podríamos sospechar que dicho efecto beneficioso de las isoflavonas no se ha visto en nuestro estudio porque supuestamente son animales sanos, y en condiciones de salud parece no tener efecto ninguno, tal y como se confirma en otro estudio realizado por Penza y colaboradores (Penza et al., 2006). Sin embargo, sí se ha observado un efecto beneficioso en modelos animales obesos u ovariectomizadas (Ali et al., 2004; Kim et al., 2006a).

5.6 EFECTO DE LA EDAD Y EL CONSUMO DE SOJA SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO

Un hecho muy bien documentado es que el envejecimiento induce pérdida en la función mitocondrial en hígado de roedores y humanos, entre otras especies (Alemany et al., 1988; Navarro et al., 2007; Modi et al., 2008; Sabaretnam et al., 2010; Castro Mdel et al., 2012).

Revisadas ambas teorías, 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 como los estrógenos o análogos de éstos, como los fitoestrógenos de la soja, que podrían retardar el daño que acompaña al proceso de envejecer.

En la presente tesis hemos querido estudiar si la producción de ROS por las mitocondrias hepáticas y el daño a macromoléculas, como lípidos y proteínas, están efectivamente asociados al proceso de envejecimiento como describen las teorías mencionadas anteriormente. Así mismo, pretendimos determinar el efecto de la ingesta de isoflavonas de soja sobre estos parámetros relacionados con estrés oxidativo.

5.6.1 Efecto de la edad y el consumo de soja sobre la producción de H_2O_2 en mitocondrias hepáticas aisladas

La producción mitocondrial de ROS puede dañar la mitocondria, y hay una pérdida, bien documentada, de la función mitocondrial con la edad cronológica (Shigenaga et al., 1994; Cadenas et al., 2000).

Por otro lado, nuestro laboratorio observó cómo la genisteína disminuye los niveles de peróxido en células MCF-7 (Borras et al., 2006). Otros también han visto como la genisteína disminuía los niveles de ROS en células DU145 de cáncer de próstata (Park et al., 2010)

En la presente tesis, no hemos encontrado efecto del consumo de soja sobre la producción de peróxidos de hidrógeno por las mitocondrias hepáticas aisladas, en comparación con una dieta sin soja. Sin embargo, observamos un aumento, estadísticamente significativo, en dicha producción con el envejecimiento en el grupo control, mientras que en el grupo alimentado con dieta rica en soja, hay una tendencia a aumentar pero no es estadísticamente significativo.

Estos resultados sugieren que, efectivamente hay un incremento en la producción mitocondrial de H₂O₂ asociado al proceso de envejecimiento y que el consumo de dieta rica en soja mitiga ligeramente este aumento. Sin embargo, esto no indica que la producción mitocondrial de ROS sea determinante de la longevidad en ratones OF1 machos. Al igual que en nuestro caso, otros estudios realizaron manipulaciones nutricionales en ratones y llegaron a la misma conclusión (Sanz et al., 2006a; Sanz et al., 2006b).

5.6.2 Efecto de la edad y el consumo de soja sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias hepáticas aisladas

Se ha demostrado que el contenido de peroxidación lipídica aumenta con la edad, tanto en mitocondrias aisladas como en tejido hepático (Hruszkewycz 1992; Andziak et al., 2006).

En cuanto al efecto del consumo de isoflavonas de soja sobre este marcador de estrés oxidativo, malondialdehído, Mahn y colaboradores observaron una disminución en sus niveles en las mitocondrias aisladas de hígado de ratas machos alimentadas con dieta rica en soja frente a un grupo con dieta sin soja (Mahn et al., 2005). El mismo efecto reductor de la peroxidación lipídica se ha observado en hígado de ratones C57BL6 machos alimentados con dieta rica en isoflavonas de soja (Ibrahim et al., 2008). En contraste, otros grupos no encontraron diferencias en la concentración de MDA en diferentes tejidos, hígado entre otros, de ratas Wistar machos alimentados con dieta rica en

isoflavonas de soja en comparación con los alimentados con dieta sin estas sustancias (Wiegand et al., 2009; Barbosa et al., 2011). Tampoco se ha encontrado efecto ninguno de la genistéina sobre los niveles de MDA en mitocondrias hepáticas aisladas de ratones C57BL/6J alimentados con dieta alta en grasa, aunque sí se redujo en homogenado de hígado (Lee et al., 2006)

En la presente tesis medimos la concentración de MDA en las mitocondrias hepáticas de los ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja y los comparamos con los alimentados con dieta sin soja. También valoramos su cambio con la edad.

Al 80% de supervivencia, cuando los ratones tenían un año de vida, los valores de MDA son más altos de lo esperable, podría deberse a algún error metodológico o a que la muestra se haya oxidado a la hora de procesamiento. En el resto de los puntos, vemos cómo en el grupo control los de mayor edad tienen mayor concentración de MDA que los jóvenes, mientras que el grupo de soja, los de muy avanzada edad tienen menos que los jóvenes. Además, al 10% de supervivencia se observa un efecto beneficioso del consumo de una dieta rica en soja sobre los niveles de MDA en las mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos frente a ratones que no ingieren soja, dicho efecto beneficioso podría ser debido al incremento de MnSOD y GPx observado en este grupo al 10% de supervivencia.

Lo observado en nuestro estudio podría indicar que la suplementación con antioxidantes, como las isoflavonas de soja, podría no causar efecto sobre los niveles de la peroxidación lipídica, bajo condiciones fisiológicas normales, hecho también descrito por Barbosa y colaboradores (Barbosa et al., 2011). Sin embargo, sí podría ser beneficioso en situaciones patológicas, como se ha visto en ratones con hígado graso y obesidad inducida con dieta alta en grasa (Lee et al., 2006) o en animales con daño inducido por irradiación gamma (Song et al., 2006); lo cual podría explicar nuestro hallazgo en ratones muy viejos (10% de supervivencia).

5.6.3 Efecto de la edad y el consumo de soja sobre la oxidación proteica en mitocondrias hepáticas aisladas

Una de las características únicas de la oxidación de proteínas por una gran variedad de rutas es la generación de grupos carbonilo. La acumulación de proteínas carboniladas es un indicador de daño oxidativo durante el envejecimiento de las células y tejidos (Agarwal et al., 1994; Sohal 2002; Chaudhuri et al., 2006; Jha et al., 2011).

Y así se observa en esta tesis, en ambos grupos experimentales hay un incremento en la acumulación de proteínas carboniladas con la edad.

En lo que se refiere al efecto de las isoflavonas de soja sobre este marcador de estrés oxidativo, se ha visto que tienen un efecto beneficioso al reducir la formación de grupos carbonilos en hígado de ratones (Choi 2009; Hsieh et al., 2009).

En esta tesis, los resultados demuestran que el consumo de soja disminuye la oxidación proteica en ratones OF1 machos de edad adulta, con un año de vida (que corresponde al 80% de supervivencia en nuestra curva). Sin embargo, a edad muy avanzada ocurre lo contrario, un aumento frente al grupo control y por tanto un efecto pro-oxidante.

No nos consta que se haya medido este parámetro en mitocondrias hepáticas de roedores, ni el efecto de las isoflavonas sobre éste, en edades muy avanzadas. Por lo que, en vista a nuestros resultados podríamos concluir que el efecto del consumo de soja depende de factores como la edad o el tejido estudiado.

5.7 EFECTO DE LA EDAD Y EL CONSUMO DE SOJA SOBRE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

La producción excesiva de radicales libres en el organismo y el desequilibrio entre la concentración de éstos y las defensas antioxidantes se ha relacionado con el proceso de envejecimiento (Humphries et al., 2006).

Existe mucha controversia con respecto al efecto de los antioxidantes sobre la longevidad (Muller et al., 2007; Doonan et al., 2008; Perez et al., 2009a; Perez et al., 2009b; Lapointe et al., 2010; Salmon et al., 2010).

En nuestro laboratorio, al estudiar la diferencia de longevidad entre machos y hembras, propusimos que la regulación positiva de las enzimas antioxidantes puede ser un factor importante para promover la longevidad (Vina et al., 2005b). Este hecho lo apoyan muchos experimentos moleculares en los que los animales vivían más tiempo cuando sobre-expresaban enzimas antioxidantes (Orr et al., 1994; Arking et al., 2000; Sun et al., 2002; Sun et al., 2004; Curtis et al., 2007).

Por otro lado, son varios los estudios que han visto que las isoflavonas de soja exhiben capacidades antioxidantes, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes (Yen et al., 2003; Liu et al., 2005; Borrás et al., 2006).

Uno de los objetivos de la presente tesis era determinar el efecto del consumo de soja sobre genes antioxidantes, concretamente, GPx y MnSOD, además de evaluar su cambio con la edad.

5.7.1 Efecto de la edad y el consumo de soja sobre los niveles del mRNA, niveles proteicos y actividad enzimática de GPx

Tal y como observamos en nuestros resultados, no hay influencia ninguna del envejecimiento sobre la GPx, ya que no encontramos cambios con la edad, en sus niveles de mRNA ni en su actividad enzimática, en ninguno de

los dos grupos experimentales. Con la excepción de los niveles proteicos que son mayores en los ratones de avanzada edad (10% de supervivencia) de ambos grupos experimentales.

Sin embargo, observamos cómo el consumo de soja aumenta los niveles proteicos y del mRNA a partir del año de vida (80% de supervivencia). Su efecto sobre la actividad se observa a edades más tardías (10% de supervivencia).

Teniendo en cuenta que la GPx juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células (Chance et al., 1979a), el aumento en su expresión y su actividad enzimática al 10% de supervivencia, en el grupo alimentado con soja, explica la reducción en los niveles de MDA observados en las mitocondrias hepáticas del grupo alimentado con soja, en este mismo punto de la curva de longevidad.

En cualquier caso, recordemos que no observamos diferencias en la longevidad, por lo que aunque haya habido un incremento de la GPx por el consumo de soja, nuestros resultados no sugieren una relación entre la glutatión peroxidasa y la longevidad, así como ha sido afirmado por otros autores (Perez et al., 2009a; Page et al., 2010).

5.7.2 Efecto de la edad y el consumo de soja sobre los niveles del mRNA, niveles proteicos y actividad enzimática de MnSOD

Si bien no observamos variación en los niveles del mRNA de GPx con la edad, los de MnSOD sí decrecen en ambos grupos experimentales.

En cuanto al efecto del consumo de soja sobre la MnSOD, sólo se observa en los ratones de avanzada edad (10% de supervivencia), donde vemos cómo los niveles de mRNA de MnSOD son mayores en los ratones que consumen soja frente a los controles.

Respecto a los niveles proteicos y actividad enzimática, se observa en ambos casos, una tendencia o, incluso aumento significativo (en algunos puntos) con la edad. El efecto del consumo de soja es ambiguo, aumenta los niveles

proteicos de MnSOD en los ratones viejos, y la actividad enzimática a edades más tempranas.

Así como en la presente tesis, otros grupos estudiaron el efecto de la manipulación de genes antioxidantes, como la GPx y la MnSOD, no encontrando efecto ninguno sobre la longevidad de los ratones (Jang et al., 2009; Perez et al., 2009b). Tal hecho ha sido revisado recientemente por Salmon y colaboradores, donde queda evidente que en la mayoría de los casos, en los ratones con manipulación genética en el sistema de defensa antioxidante no se ve afectada su esperanza de vida (Salmon et al., 2010).

Los resultados de esta tesis son contradictorios. Por un lado, algunos parámetros de estrés oxidativo aumentan con la edad mientras que otros no, como es el caso del MDA. Existe una variación ambigua en la expresión de los genes antioxidantes a medida que envejecen los ratones. No existe una clara correlación entre mayor actividad de enzimas antioxidantes con menor daño oxidativo y mayor longevidad.

Esta contradicción puede tener sentido o porque el estrés oxidativo juega un papel limitado en el proceso de envejecimiento; y/ o porque el papel del estrés oxidativo en el envejecimiento depende de factores como el entorno. Así, en ambientes con mínima carga de estrés, como podría ser el caso de nuestros ratones que crecieron en condiciones óptimas de vida, el daño oxidativo juega un rol menos relevante sobre el envejecimiento.

Sin embargo, bajo un estrés crónico, incluyendo fenotipos patológicos que disminuyen la salud óptima, el estrés/ daño oxidativo desempeña un papel importante en el envejecimiento. En estas condiciones, la mejora de las defensas antioxidantes puede ejercer una acción "anti-envejecimiento", dando lugar a cambios en la esperanza de vida, las patologías relacionadas con la edad y la alteración de la función fisiológica, tal y como predice la teoría del estrés oxidativo del envejecimiento.

5.8 EFECTO DE LA EDAD Y LA SOJA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA *IN VIVO*

Por más de dos décadas se lleva estudiando el consumo cerebral de ^{18}F -FDG mediante PET. Un patrón común de los resultados de muchos estudios es que hay una reducción en el consumo cerebral de glucosa con el envejecimiento normal (Borras et al., 2009) y en procesos de deterioro cognitivo (Mosconi et al., 2008b). De hecho en preclínica se usa como posible predictor de posibles trastornos neurodegenerativos futuros (Small 2006; Mosconi et al., 2008a; Small et al., 2008).

En este sentido, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que tanto el envejecimiento como la ovariectomía (debido a la ausencia de estrógenos) producen una disminución del metabolismo cerebral de glucosa en ratas Wistar (Lopez-Grueso et al., 2010).

Por ello, en la presente tesis se ha medido el consumo cerebral de glucosa a lo largo de la curva de longevidad y se ha evaluado el efecto del consumo de soja sobre este indicador.

En contra de lo esperado, nuestros resultados no solo no demuestran una reducción sino un incremento del consumo cerebral de glucosa con el envejecimiento, que además se ve más pronunciado en los ratones alimentados con dieta sin soja.

Este hecho se puede explicar con un informe reciente de Xiaoyan Shen y colaboradores (Shen et al., 2012), donde se ha visto que la correlación entre el consumo cerebral de glucosa y la edad, depende de factores como el género y la región del cerebro analizada. En 108 mujeres, de edades comprendidas entre 26 y 71 años, no encontraron en ninguna región del cerebro correlación positiva entre el consumo de glucosa y la edad. Mientras que en el caso de los hombres, 126 de entre 28 y 77 años de edad, han observado cómo dependiendo de la región cerebral, la correlación puede ser negativa o positiva. Es decir, que en

algunas regiones del cerebro masculino, el consumo de glucosa aumenta con la edad.

En nuestro caso, aunque no se haya hecho el análisis de las diferentes regiones del cerebro, cabe destacar que son ratones machos.

Con respecto al consumo de soja, en nuestro estudio sólo observamos un efecto positivo al 100% de supervivencia. No nos consta que haya estudios previos sobre su efecto en el metabolismo cerebral de glucosa. Por el efecto mimético de las isoflavonas de soja al estradiol femenino, sospechábamos que iba a producir algún cambio, tal y como se ha descrito antes en nuestro laboratorio en ratas ovariectomizadas con reposición con estradiol (Lopez-Grueso et al., 2010), cambio que sin embargo no hemos observado de forma clara en la presente tesis.

5.9 EFECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA FUNCIÓN HEPÁTICA

El proceso de envejecimiento se acompaña de una disminución de la capacidad para mantener la homeostasis, con una pérdida progresiva del rendimiento de cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, provocando una mayor vulnerabilidad que conlleva finalmente al fallecimiento del organismo (Hayflick 1998; de Magalhaes 2005).

Una de esas funciones es la regulación de la glucemia tras una sobrecarga oral de glucosa, y otra sería el deterioro del metabolismo hepático.

5.9.1 Efecto de la edad y la soja sobre la tolerancia a la glucosa

Entre los trastornos asociados al envejecimiento está la intolerancia a la glucosa (Chang et al., 2003; Goren et al., 2004).

Estudios en animales (Mezei et al., 2003; Bartke et al., 2004; Lee 2006; Shim et al., 2007; Cederroth et al., 2008; Lu et al., 2008) y estudios observacionales en humanos (Yang et al., 2004; Villegas et al., 2008; Nanri et al., 2010), han llevado a muchos investigadores a la hipótesis de que la soja puede ser beneficiosa en la homeostasis de la glucosa, por ejemplo mejorando el control glucémico y aumentando la sensibilidad a la insulina.

No obstante, según un meta-análisis reciente, el consumo de soja no tiene efectos notables sobre el control glucémico (Liu et al., 2011).

Volviendo a nuestros resultados, efectivamente observamos un empeoramiento en la tolerancia a la glucosa con la edad.

Sin embargo, y contra a lo que defiende la mayoría de bibliografía al respecto, no encontramos efecto beneficioso del consumo de soja sobre la tolerancia a la glucosa oral en nuestros ratones.

Resultados semejantes a los nuestros los encontró Edwin D Lephart en 2004, en su estudio en ratas machos alimentadas con dieta rica en soja o sin soja, donde vio que los niveles de la glucosa circulante en el caso de los que comían soja eran levemente más altos, a la vez que aumentaban con la edad (Lephart et al., 2004b).

5.9.2 Efecto del consumo de soja sobre la función hepática

Otra de las consecuencias del proceso de envejecimiento es la pérdida de la función hepática. Según la Dra. Ana María Cuervo, este hecho puede ser debido al declive en la actividad autofágica con la edad, lo cual puede conllevar a la acumulación de componentes dañinos dentro de la célula (Cuervo et al., 2005).

En cuanto al efecto de las isoflavonas sobre la función hepática, existe mucha controversia; así como algunos autores creen que están asociados a un peor funcionamiento hepático (Setchell et al., 1987), otros han observado que pueden tener efecto protector (Kuzu et al., 2007; Wong et al., 2007).

En nuestro estudio, analizamos la capacidad hepática de los ratones para detoxificar zoxazolamina, anotando el tiempo que tarda cada grupo en recuperarse de la parálisis inducida por esta sustancia. Lo realizamos al 50% de supervivencia y no observamos diferencias entre ambos grupos experimentales.

5.10 EFECTO DE LA EDAD Y EL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE

Como ya se ha mencionado anteriormente, el proceso de envejecimiento en muchos casos conlleva también al declive en las capacidades cognitivas, tales como la memoria y el aprendizaje (Erickson et al., 2003; Rosenzweig et al., 2003; Burke et al., 2006; Frick 2009).

En la actualidad, muchos productos que contienen fitoestrógenos de soja se recomiendan a las mujeres para el tratamiento de síntomas de la menopausia y /o para prevenir las enfermedades relacionadas con la edad. Sin embargo, sus efectos sobre la cognición siguen sin conocerse. Por ejemplo, en mujeres menopáusicas sanas no se ha visto que las isoflavonas de soja tengan ningún efecto sobre la cognición global (Fournier et al., 2007; Henderson et al., 2012).

Sin embargo, según estudios recientes en roedores, la soja podría ser un recurso útil para los déficits cognitivos, ya que aumenta la capacidad de aprendizaje y memoria (Bansal et al., 2010; Yang et al., 2011).

No obstante, nuestros resultados en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos, para evaluar el efecto de la edad y el consumo de soja sobre el aprendizaje y la memoria, no corroboran las investigaciones mencionadas previamente con respecto a los efectos negativos del envejecimiento, ni los positivos del consumo de soja sobre la cognición.

Las investigaciones sobre el efecto de las isoflavonas de soja, en su mayoría, se han llevado a cabo en mujeres o en ratas hembras, en muchos casos ovariectomizadas. Los pocos que han evaluado su efecto en la cognición

masculina, tanto en humanos como animales, muestran resultados inconsistentes (Lee et al., 2005). Recientemente se ha descrito cómo la genisteína es capaz de mejorar la memoria y el aprendizaje por su función estrogénica y atenuando el incremento del MDA, en ratas Wistar machos con enfermedad de Alzheimer inducida con la inyección de β -amiloide (Bagheri et al., 2011). En un modelo de ratón, Swiss albino como el nuestro, la soja puede revertir el déficit de memoria debido a la edad, de nuevo con una mejora en los parámetros de estrés oxidativo (Bansal et al., 2010).

En definitiva, una explicación a la ambigüedad de los resultados observados en el sexo masculino es que las isoflavonas de soja pueden mejorar los procesos cognitivos que parecen depender de la activación estrogénica, como se ha descrito en hombres sanos (Thorp et al., 2009).

Por lo que en base a nuestros resultados no podemos sacar ninguna conclusión ya que debimos hacer más pruebas que evalúen diferentes tipos de memoria y su seguimiento con la edad.

5.11 EFECTO DEL CONSUMO DE SOJA SOBRE LA COORDINACIÓN MOTORA Y FUERZA MUSCULAR

Otros parámetros que se han relacionado negativamente con el proceso de envejecimiento son la coordinación neuromuscular y la fuerza de agarre de los miembros anteriores (Ingram et al., 1986; Matheu et al., 2007).

En nuestra curva de longevidad, no hemos podido realizar estas pruebas en todos los puntos, así que sólo tenemos resultados al 50% de supervivencia, en el que no observamos efecto beneficioso del consumo de soja, sino una tendencia a ser perjudicial.

Cabe destacar que la prueba de coordinación motora ha tenido poco éxito en ambos grupos experimentales, lo cual se puede explicar por el posible sobrepeso de los ratones, así como lo han descrito otras investigaciones (Miquel et al., 1978; Ingram 1983).

5.12 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Como en cualquier estudio de investigación hay limitaciones que pueden interferir a la hora de llevar a cabo los objetivos planteados. En la presente tesis podrían ser los siguientes:

1. La curva de longevidad ha sido realizada en ratones OF1 machos estabulados de forma individual y en condiciones óptimas, por ello los resultados son poco extrapolables a la población humana que vivimos en condiciones heterogéneas, y en mayor o menor medida, con algún tipo de estrés.
2. Las condiciones son tan favorables que una intervención nutricional no es suficiente para modificar la longevidad. Pensamos que sí podría tener efecto en condiciones más desfavorables.
3. La dieta suministrada es una dieta enriquecida, especial para crías y condiciones especiales, con mayor contenido proteico y lipídico que la dieta normal, por tal motivo, empezamos a controlar la ingesta diaria a partir de las 45 semanas de edad. Este hecho podría ser limitante ya que no se ha realizado desde el comienzo del estudio.
4. Por la supuesta condición de ratones sedentarios, derivada del punto anterior, éstos podrían haberse diabetizado con la edad. Para demostrarlo teníamos que haber realizado el test de tolerancia a la glucosa oral desde el principio del estudio y no sólo al 50 y 10% de supervivencia.
5. En cuanto a parámetros de estrés oxidativo, en este estudio hemos medido la peroxidación lipídica y la oxidación proteica en mitocondrias hepáticas aisladas. Ha sido difícil comparar nuestros resultados con otras publicaciones ya que la mayoría miden estos parámetros en tejido completo o plasma.

6 SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

6.1 BACKGROUND AND JUSTIFICATION OF STUDY

Finding good models of ageing is a major aim of Gerontology. The different longevity between genders, i.e. that females live around 10% more than males in many species, including humans, offers a unique opportunity to study fundamental aspects of ageing.

In the context of the mitochondrial theory of ageing, studies accomplished by our research group have found that mitochondrial oxidant production is approximately double in males compared to females (Borras et al., 2003). We have traced this advantage of females due to the presence of estrogens, which act via a pathway that comprises membrane estrogen receptors, MAP kinase, NFkappaB signalling and the up-regulation of the expression of the antioxidant enzymes MnSOD and GPx (Borras et al., 2005). It is remarkable that estrogens activate proliferation genes (related to their feminizing function and also to their cancer-promoting effects) by binding to estrogen receptor alpha whereas longevity-related genes, in particular the antioxidant ones, are mediated by binding to estrogen receptor beta. Furthermore, estrogen administration after the menopause has clinical problems and, obviously, cannot be given to males. On the other hand, phytoestrogens, which in vast majority bind to the estrogen receptor beta, promote longevity-related genes without increasing the rate of cell division or promoting feminization. These substances offer an interesting alternative to estrogens. In our laboratory, we could observe that at concentrations found in plasma of people fed a traditional diet with soya, they increase the expression of antioxidant enzymes (Borras et al., 2006). Thus, the possibility of using these compounds to increase the longevity of males to reach the longevity of females should be seriously considered.

In the current study, the environmental and internal factors that might affect the longevity of the groups have been dropped down to a minimum at the

application medium. We performed a longevity curve of 157 male Swiss mice (OF1), divided into two groups. Depending on the type of diet, the animals were consuming a soya-free diet (similar to the Western diet for humans) or a soya-rich diet (equivalent to the Eastern type diet), since weaning.

Here we studied possible differences in longevity, the occurrence of oxidative damage and antioxidant defense in mice at the age of 5, 12, 17.5 and 23.5 months; corresponding to 100, 80, 50 and 10% survival, respectively. These represent a broad range of ages, from very young to very old OF1 mice.

We also performed some metabolic and physical tests. These experiments were accomplished to determine the effect of aging and soya intake on oxidative stress parameters, organic and neuromuscular functions.

6.2 PLASMA CONCENTRATION OF ISOFLAVONES

Although ubiquitous in their occurrence in the plant kingdom, these bioactive non-nutrients are found in particularly high concentrations in soybeans and have been found to have a wide range of hormonal and non-hormonal activities that serve to provide plausible mechanisms for the potential health benefits of diets rich in phytoestrogens.

According to numerous studies, beneficial actions of isoflavones occur at nutritionally relevant concentrations found in the plasma of Eastern populations consuming a traditional soya-rich diet (Setchell et al., 1999; Borrás et al., 2006).

In the current study, to test that soya feeding did indeed affect the concentration of isoflavones in plasma of mice fed soya rich diet we measured the concentration of genistein, daidzein and equol by UPLC.

As by design, concentration of isoflavones in plasma were directly correlated; mice fed on the soya-rich diet displayed significantly higher levels of genistein, daidzein, and equol compared with animals fed with the soya-free diet.

Table 6.1.1 shows the concentration of isoflavones in plasma of each mouse that was studied. Here we can see that increases observed in plasma of mice fed with soya-rich diet were from 10 to 100-fold compared with mice fed with soya-free diet, in all age-ranges.

At the same time, in most cases of mice fed soya-free diet, isoflavones were not detected.

Survival (%)	Group	Sample	Genistein (nM)	Daidzein (nM)	Equol (nM)
100	NO SOYA	1	0,3	0,9	ND
		2	ND	ND	ND
		3	0,5	0,7	ND
		4	0,1	0,3	ND
		5	1,4	1,4	ND
	SOYA	1	11,4	11,1	239,1
		2	3,2	4,0	613,4
		3	4,6	4,8	167,7
4		4,1	5,7	573,9	
80	NO SOYA	1	ND	0,6	5,7
		2	0,1	0,3	120,5
		3	0,8	2,7	109,3
		4	0,1	0,2	59,1
		5	0,1	0,2	59,1
	SOYA	1	2,4	2,2	574,0
		2	2,7	2,7	467,8
		3	15,9	16,6	740,1
		4	33,2	27,8	418,2
		5	0,7	1,4	709,9
50	NO SOYA	1	0,2	ND	ND
		2	ND	0,2	26,5
		3	ND	ND	ND
		4	ND	ND	148,5
		5	0,1	0,2	63,9
	SOYA	1	19,7	15,5	564,4
		2	9,0	7,7	301,8
		3	19,3	19,9	395,1
		4	5,5	4,3	1460,5
10	NO SOYA	1	ND	0,2	ND
		2	ND	0,1	ND
		3	0,5	ND	ND
		4	0,2	ND	ND
	SOYA	1	4,0	3,8	787,8
		2	12,6	10,3	1068,9
		3	2,9	2,2	630,4
		4	7,2	5,8	63,4

Table 6.1.1.- Concentration of isoflavones in plasma of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

ND, not detectable.

Total n is 4 to 5 mice in each group and survival percentage.

This is summarized in Table 6.1.2: in mice which consumed the soya-rich diet, the average plasma concentration of total isoflavones (~600 nM = 150 ng/mL) was well within the range observed in humans consuming soya food in their traditional diet. While, in mice fed with soya-free diet isoflavones were relatively low (~30 nM = 7.6 ng/mL) as Western population consuming diets without soya (Adlercreutz et al., 1993a). These few concentrations observed in the control group could be due to traces of isoflavones present in the diet without soya, but in other possible sources.

Equol was the predominant isoflavone in plasma (Table 6.1.2), representing more than 90% of all circulating isoflavones, consistent with previously reported data on the metabolism of isoflavones in rodents (Brown et al., 2001; Setchell et al., 2005; Setchell et al., 2011).

Group	n		Genistein (nM)	Daidzein (nM)	Equol (nM)	Total (nM)
NO SOYA	18	Mean	0,24	0,44	29,64	30,32
		SD	0,36	0,68	49,12	
SOYA	17	Mean	9,32	8,59	575,08	592,99
		SD	8,56	7,42	336,07	
		<i>p value</i>	0,000080	0,00005318	0,00000009	0,000066

Table 6.1.2.- Total concentration of isoflavones in plasma of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

We can conclude that, there is indeed a change in the concentration of soya isoflavones in plasma, which means that OF1 mice are able to metabolize such substances. This is essential in order to determine if consumption of soya can affect whether or not the parameters that we have set as aims of this study, considering that the only variable is the presence or absence of soya in the diet.

6.3 METABOLIC PROFILE BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (^1H NMR)

Principal Component Analysis (PCA) was applied to the centered spectral data in order to explore any clustering behavior of the samples based on intrinsic biochemical similarities or differences, and thus determine whether inter-sample and inter-variable relationships existed between the spectral profile of plasma and hepatic mitochondrial samples, collected from mice fed with diet without soya in comparison with others fed soya rich diet.

When samples are close to each other, means that they are similar in a number of variables. By contrast, the samples that are far from each other, are different in a large number of variables.

Figure 6.1.1 and figure 6.1.2 represent PCA of NMR spectrum, of plasma and hepatic mitochondria respectively, in which we can detect clusters and patterns of the different samples based on their overall metabolic composition. In case of plasma we don't observe metabolic differences between experimental groups or any change with age. However in mitochondria, there are differences between experimental groups and between their tendencies with age.

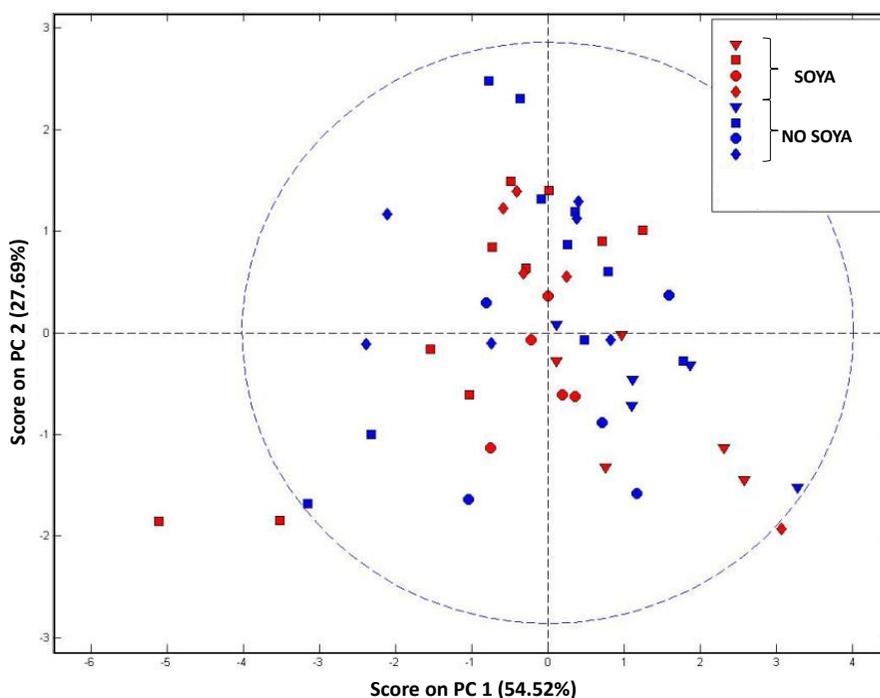


Figure 6.1.1.- Scores plot for the Principal Components Analysis of NMR spectra of plasma of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Total n is 21 mice fed soya-free diet and 20 mice fed soya-rich diet. 5 of each group at 100% (▼), 80% (■), and 50% (●) survival. At 10% (◆) n = 6 mice soya-free diet and 5 mice fed soya-rich diet.

In hepatic mitochondria (Figure 6.1.2), the PCA score plots of mice at 80%, 50% and 10% survival move away from mice at 100% in mice without soya, while in soya group we observe the movement at 80% and 50% survival but at 10% this group is more dispersed. At the same, they show clear metabolic differences between both experimental groups at every point of survival curve.

The results could help to supplement and interpret the results obtained in other experiments.

Furthermore, as Cassidy's group informed, they can provide a biochemical relationship between the many health benefits of an isoflavones-rich diet in relation to some diseases (Solanky et al., 2005).

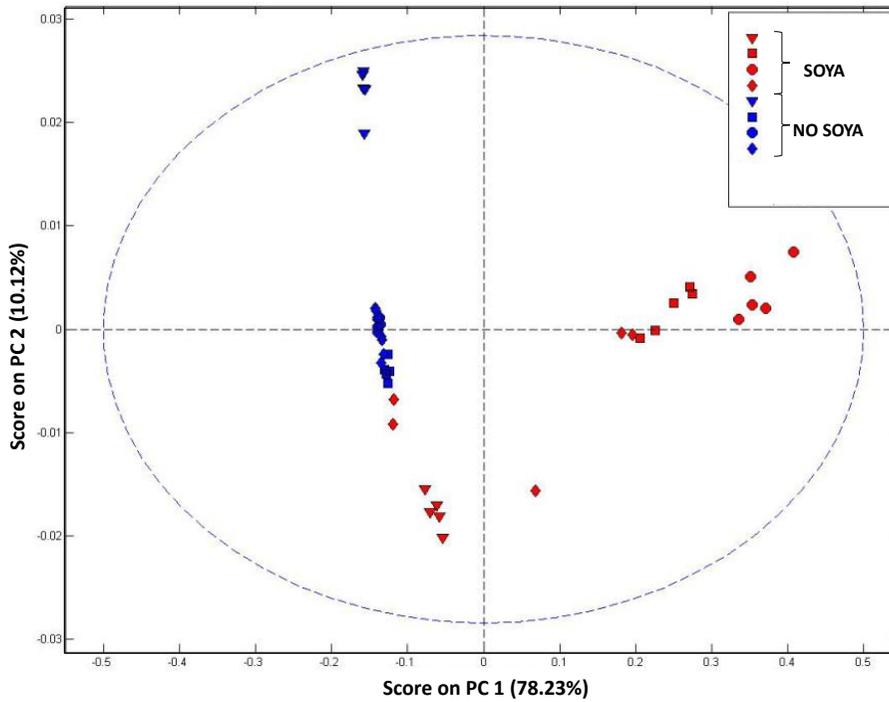


Figure 6.1.2.- Scores plot for the Principal Components Analysis of NMR spectra of hepatic mitochondria of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Total n is 21 mice fed soya-free diet and 20 mice fed soya-rich diet. 5 of each group at 100% (\blacktriangledown), 80% (\blacksquare) and 50% (\bullet) survival. At 10% (\blacklozenge) n = 6 mice soya-free diet and 5 mice fed soya-rich diet.

6.4 THE EFFECT OF LIFELONG SOYA FEEDING ON LONGEVITY

Epidemiological studies suggest that the eastern traditional diet has beneficial effects on human health and longevity. It is suspected that the nutritional components derived from soybeans, for its estrogenic effects, play an important role in these effects (Adlercreutz 1998; Suzuki et al., 2001).

In contrast, the study by Altun *et al*, indicates a negative correlation between the concentration of genistein (the most abundant isoflavone in soya) and longevity of *Drosophila melanogaster* (Altun et al., 2011).

Interestingly, a shorter survival time was also observed in spontaneously hypertensive rats treated with isoflavones (Gilani et al., 2009).

In this study, the main aim was to investigate the effect of soya on longevity of male OF1 mice. For that, mice were observed daily for survival and the data of spontaneous death were recorded.

Figure 6.2 shows that neither mean life span nor maximum life span, were different between the control group and the group fed with soya-rich diet.

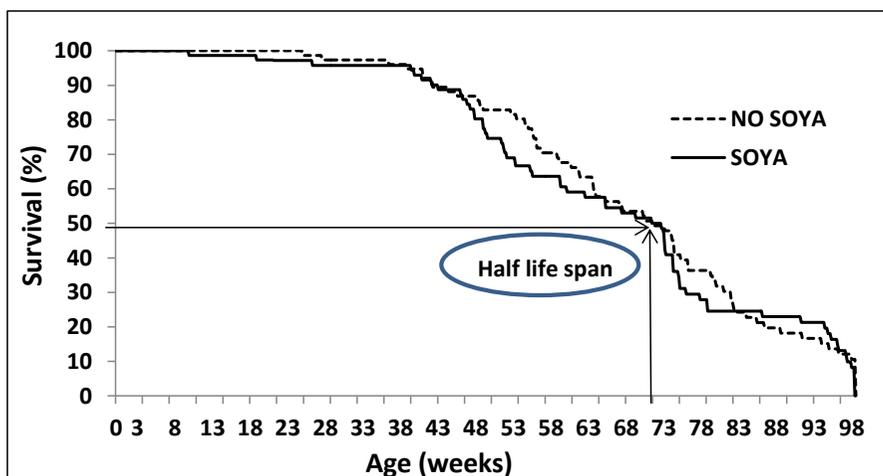


Figure 6.2.- The survival curve of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Total of 157 mice; 81 fed with soya-free diet and 76 fed with soya-rich diet.

As it was described in 2004, the beneficial effects of dietary soya isoflavones on parameters, such as, plasma and hepatic lipid profiles, fasting glucose, the capacity for glucose tolerance and longevity, are all strongly genotype-dependent (Bartke et al., 2004).

So, we can conclude that soya feeding does not prolong half life span neither maximum life span, at least in this animal model.

Another aspect to consider is that the conditions are so favorable that a nutritional intervention is not enough to modify longevity. We think it could have some beneficial effect under more unfavorable conditions.

In other words, one way to address this issue would be to determine whether supplementation with antioxidants could modify longevity under adverse conditions, for example, inducing some sort of stress.

6.5 FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT

It is a matter of debate whether changes in food intake influence the animal results, as this factor is not accounted for in many experiments.

Moreover, most animal models used to elucidate the effects of isoflavones on body weight are rodent strains with either genetically or diet-induced obesity. Ovariectomy of female animals is also a common tool (Ali et al., 2004; Kim et al., 2006a).

Thus, there is a controversy on the effect of isoflavones on food intake and body weight. We have selected only a few studies to underline this controversy.

It has been reported that isoflavones increase food intake, in mice or rats fed soya-rich diets, feeding behavior and locomotor activity were significantly affected, suggesting that the central regulation of energy balance in the hypothalamus may be modulated by soya or phytoestrogens (Lephart et al.,

2004b; Cederroth et al., 2007), whereas others have shown that isoflavones decrease food intake (Penza et al., 2006).

About its effect on body weight, a recent study reported that high dose of soya isoflavones increased the body weight gain of minipigs (Li et al., 2011). However, another recent study demonstrated the contrary: the ability of isoflavones to decrease body weight of female Long-Evans rats at various stages of life (rats were intact, ovariectomized or experienced natural ovarian failure) (Blake et al., 2011).

In this study, we sought to determine whether soya isoflavones affect food intake and body weight by weekly monitoring of both parameters.

As to food intake (Figure 6.3), our result shows that, mice fed a soya-rich diet consumed more food than the control group through week 44 of age when the diet was administered *ad libitum*. From week 45 on, we started to control the daily intake, and then the differences between the two groups disappeared.

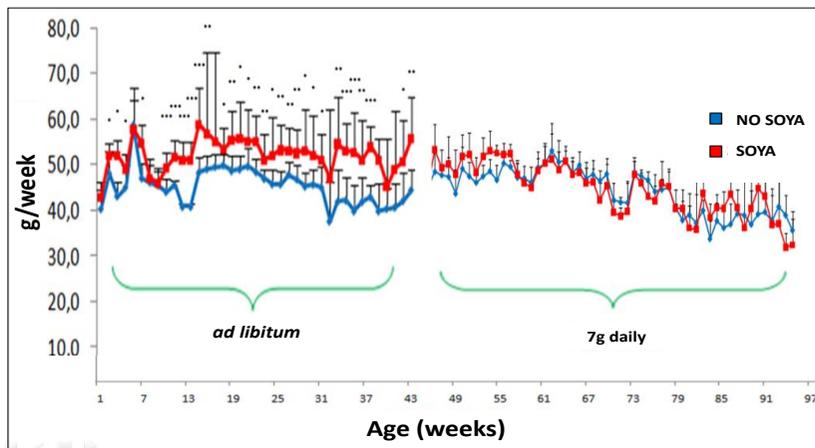


Figure 6.3.- Differences in weekly food intake between male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 10 mice in each group up to 44 weeks of age. Then we controlled all mice of the curve. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The same pattern observed in food intake was found in body weight, shown in Figure 6.4. Till 44 weeks of age, mice fed with soya-rich diet weighed more than mice fed soya-free diet. These differences disappeared after week 45 of age, when we controlled intake.

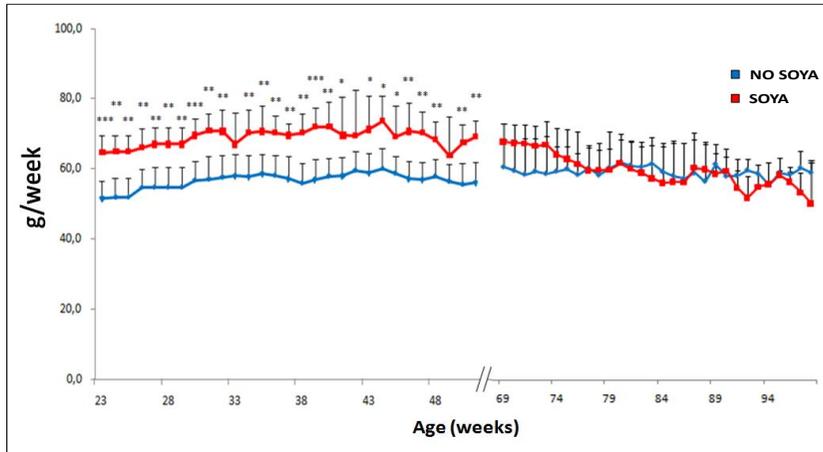


Figure 6.4.- Differences in body weight between male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD. From 23 to 52 weeks of age: n = 6 mice in each group. From 57 weeks of age the weight was controlled to 11 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Based on our results, we cannot attribute any beneficial effects to soya isoflavones on energy consumption nor on body weight. Consistent with Martin O Weickert who found that daily treatment of postmenopausal women with 50 mg isoflavones (genistein and daidzein) for 2 months had no effect on energy intake and body weight (Weickert et al., 2006).

We might suspect that the beneficial effect of isoflavones has not been seen in our study because supposedly they are healthy animals, and in health conditions it seems not to have any effect, as confirmed in another study conducted by Penza *et al* (Penza et al., 2006)

6.6 EFFECT OF AGING AND SOYA INTAKE ON OXIDATIVE DAMAGE

In the mid-1950s, Denham Harman articulated a ‘free-radical theory’ of ageing, speculating that endogenous oxygen radicals were generated in cells and resulted in a pattern of cumulative damage (Harman 1956).

This theory was later developed, pointing out mitochondria as the main source and target of free radicals (Harman 1972). Dr. Jaime Miquel Calatayud also gave the importance of age-associated oxidative stress to mitochondria as main source and target of free radicals (Miquel et al., 1980).

The normal cell function requires a stable oxidation-reduction environment. When there is an imbalance between the prooxidant and antioxidant substances in favor of the first ones, the result is oxidative stress damage that affects several molecules in the cells (Sies 1985), and this would be reflected on their physiological functions.

A primary prediction of both the oxidative stress and mitochondrial theories of aging is that production of mitochondrial ROS increases with age. Several studies have shown that mitochondria from older organisms produce a greater amount of ROS than mitochondria from younger organisms. This had been demonstrated in a variety of organisms ranging from insects to mammals (Nohl et al., 1978; Sohal 1991; Sohal et al., 1994a).

On the other hand, a well-documented fact is that aging induces loss in mitochondrial function in liver of rodents and humans, among other species (Alemany et al., 1988; Modi et al., 2008; Sabaretnam et al., 2010; Castro Mdel et al., 2012).

Reviewing the two theories, the free radicals theory of aging and mitochondrial theory of aging, they are particularly attractive because they allow a rational intervention. For example, the administration of estrogens as

antioxidants or their analogs, such as soya phytoestrogens that may delay the damage which accompanies the aging process.

Although, over the last five years, a clear controversy with some authors providing evidence in favor and some against the free radical theory of aging (Muller et al., 2007; Doonan et al., 2008; Perez et al., 2009a; Perez et al., 2009b; Lapointe et al., 2010; Salmon et al., 2010).

In this thesis we wanted to study whether ROS production by liver mitochondria and damage to macromolecules such as lipids and proteins are indeed associated with the aging process as described by theories mentioned earlier. At the same time we wanted to determine the effect of soya intake on these parameters.

6.6.1 Hydrogen peroxide production by isolated liver mitochondria

Mitochondrial ROS can damage the mitochondria, and there is a well-documented loss of mitochondrial function with chronological age (Shigenaga et al., 1994; Cadenas et al., 2000).

In fact, alterations in mitochondrial functions and increased generations of mitochondrial ROS have long been correlated with the reduced capacity in cellular function that occurs with aging (Navarro et al., 2007).

Furthermore, our laboratory found that genistein decreases peroxide levels in MCF-7 (Borras et al., 2006).

To determine the effect of aging and if soya intake influences the hydrogen peroxide production by mitochondria, we measured the production of H₂O₂ by hepatic isolated mitochondria, providing substrates for complex II (succinate) of the mitochondrial respiratory chain.

Our results show that, mice fed with soya-free diet (Figure 6.5.1.) significantly increase their H₂O₂ mitochondrial production rates with aging, while mice fed soya-rich diet don't show this increase (Figure 6.5.2.). There were

no differences between both experimental groups at any time considered (Figure 6.5.3).

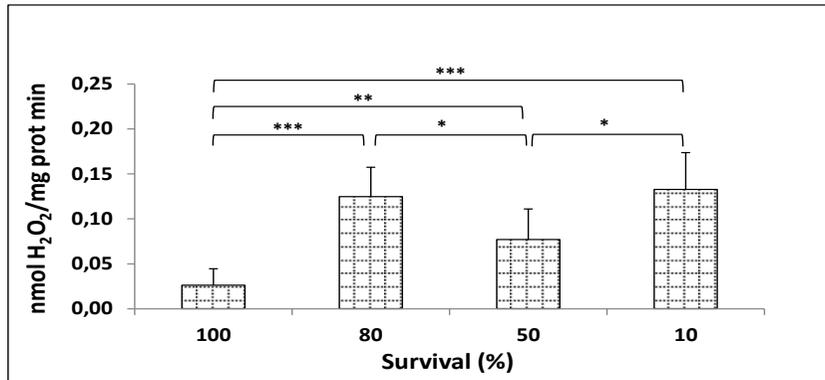


Figure 6.5.1.- Hydrogen peroxide production in isolated mitochondria from liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

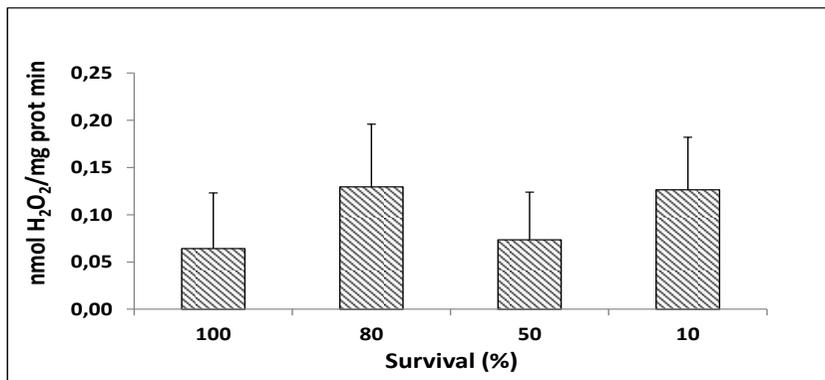


Figure 6.5.2.- Hydrogen peroxide production in isolated mitochondria from liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. No statistical differences were observed.

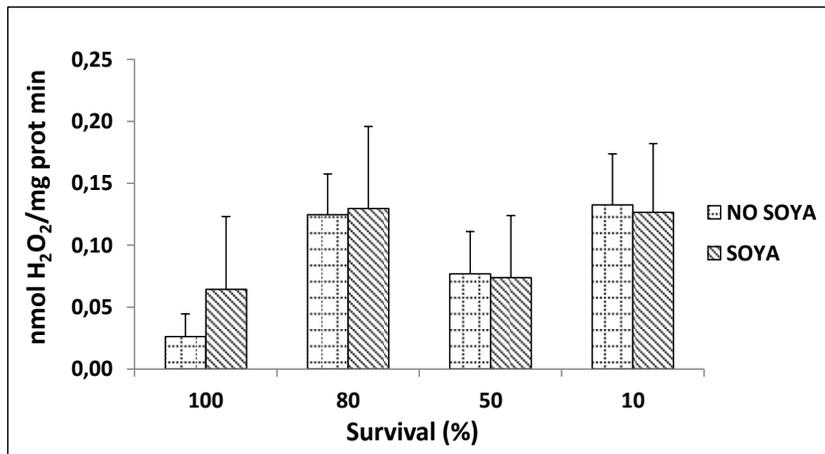


Figure 6.5.3.- Hydrogen peroxide production in isolated mitochondria from liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. No statistical differences were observed.

These results suggest that indeed there is an increase in mitochondrial H₂O₂ production associated with the aging process and consumption of a soya diet mitigates this increase. However, this does not indicate that mitochondrial ROS production is a determinant of longevity in male OF1 mice. Other studies conducted in mice with other nutritional manipulations came to the same conclusion as we did (Sanz et al., 2006a; Sanz et al., 2006b).

6.6.2 Oxidative damage to macromolecules

The balance between ROS production and antioxidant defenses determines the degree of oxidative stress. Consequences of this stress include modifications to cellular proteins, lipids and DNA (Bokov et al., 2004).

In the current study, we determined whether there are differences in oxidative damage to biomolecules such as lipids or proteins with age and if soya intake protects against this damage.

To assess this oxidative damage, we studied the lipid peroxidation levels determined as malondialdehyde (MDA) measured by HPLC and protein

oxidation determined as carbonyls groups by Western blotting in isolated mitochondria of liver.

a. Lipid peroxidation determined by measuring malondialdehyde (MDA)

It has been shown that the content of lipid peroxides in mitochondria as well as in liver increases during aging (Hruszkewycz 1992; Navarro et al., 2004a; Navarro et al., 2004b; Andziak et al., 2006).

Regarding the effect of soya isoflavones consumption on MDA, some studies observed a decrease in their levels in isolated mitochondria from rat liver and in liver of male C57BL6 mice who consumed soya-rich diet (Mahn et al., 2005; Ibrahim et al., 2008).

In contrast, other groups, found no difference in the concentration of MDA in different tissues, including liver of male Wistar rats fed with diets rich in soya isoflavones compared to those fed a diet without these substances (Wiegand et al., 2009; Barbosa et al., 2011).

In our results, at 80% survival when mice were a year old, we find an atypical result, too high levels of MDA, which could result from a methodological error by which the samples might have been oxidized while processing. In the other survival percentages, we see in the control group, shown in Figure 6.6.1, that MDA concentration in hepatic mitochondria increases with age.

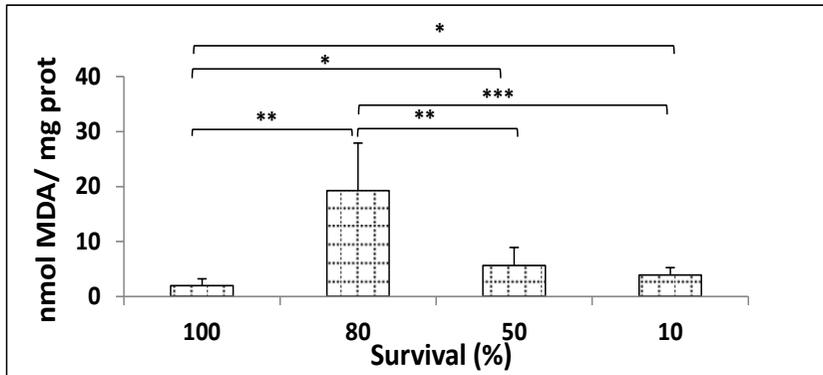


Figure 6.6.1.- Lipid peroxidation levels (MDA) in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The soya group, represented in Figure 6.6.2, shows lower MDA levels in the very elderly mice compared to younger ones, and also at this age (corresponding to 10% survival) there is a beneficial effect of consuming a soya-rich diet (Figure 6.6.3), which could be due to increased MnSOD and GPx observed in this group when survival is 10%.

Contrary to the predictions of the oxidative stress theory, lipid damage levels did not increase clearly with age in hepatic mitochondria of male OF1 mice.

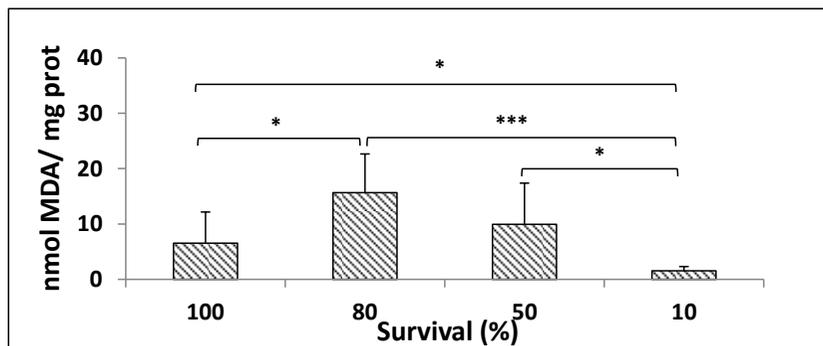


Figure 6.6.2.- Lipid peroxidation levels (MDA) in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

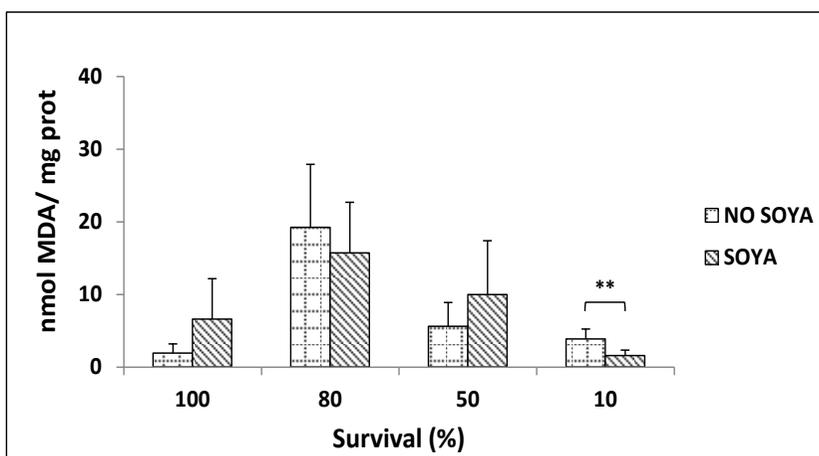


Figure 6.6.3.- Lipid peroxidation levels (MDA) in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$.

What we have observed in our study may indicate that supplementation with antioxidants, such as soya isoflavones, causes no effect on the levels of lipid peroxidation, under normal physiological conditions. This was also described by Barbosa et al (Barbosa et al., 2011). However, it could be beneficial in pathological situations, as observed in mice with obesity and fatty liver induced by high fat diet (Lee et al., 2006) or in animals with damage induced by gamma irradiation (Song et al., 2006). This fact could explain our finding in very old mice (when survival is 10%), which are protected against lipid peroxidation when taking a soya rich-diet.

b. Protein oxidation determined as carbonyls groups

The most widely studied oxidative stress-induced modification to proteins is the formation of carbonyl derivatives (Stadtman 1992).

Carbonylated protein accumulation is an indicator of oxidative damage in aging cells and tissues (Agarwal et al., 1994; Sohal 2002; Chaudhuri et al., 2006; Jha et al., 2011). This also has been found by Navarro and Boveris in

brain mitochondria and liver mitochondria, when they studied the effect of aging in rats (Navarro et al., 2004a).

Regarding to the effect of soya on this marker of oxidative stress, a beneficial effect in reducing the formation of carbonyl groups in liver of mice has been shown (Choi 2009; Hsieh et al., 2009).

In this study we found that, in both experimental groups (Figure 6.7.1 and Figure 6.7.2), there is an increase in the accumulation of carbonylated proteins with age.

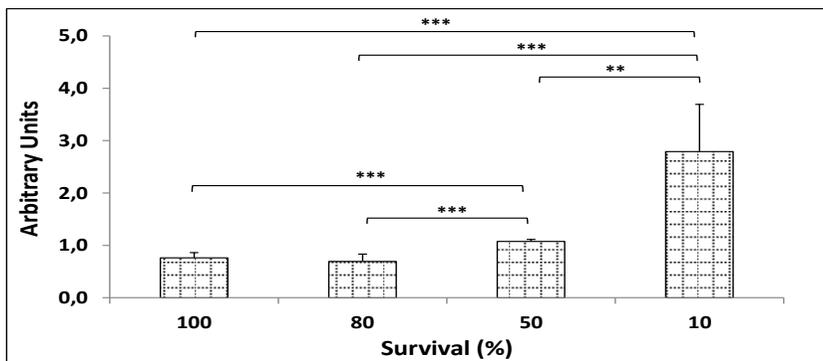


Figure 6.7.1.- Protein carbonylation in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as means \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

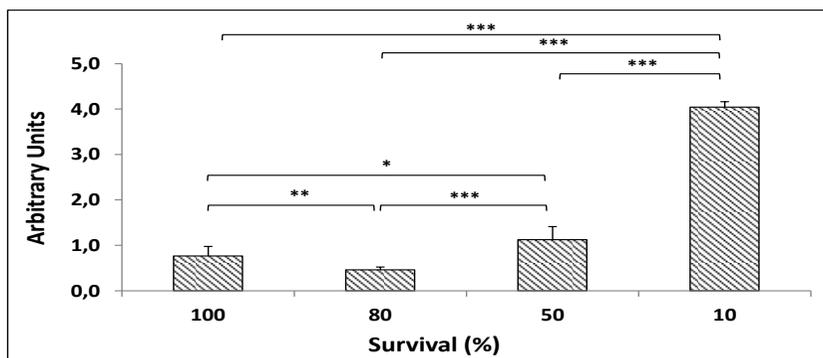


Figure 6.7.2.- Protein carbonylation in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as means \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

However, the results represented in Figure 6.7.3 show that soya intake decreases protein oxidation in adult mice, when survival is 80%. However, in very old mice (10% survival), an increase of protein oxidation is found in mice fed with soya versus the control group and thus a pro-oxidant effect by soya intake is shown.

To our knowledge, this parameter has not been measured before in hepatic mitochondria of mice, neither the effect of soya on it, at a very advanced age. So, in view of our results we conclude that the aging process is associated with an increased content of protein oxidation products; however, the effect of soya consumption depends on factors such as age or tissue.

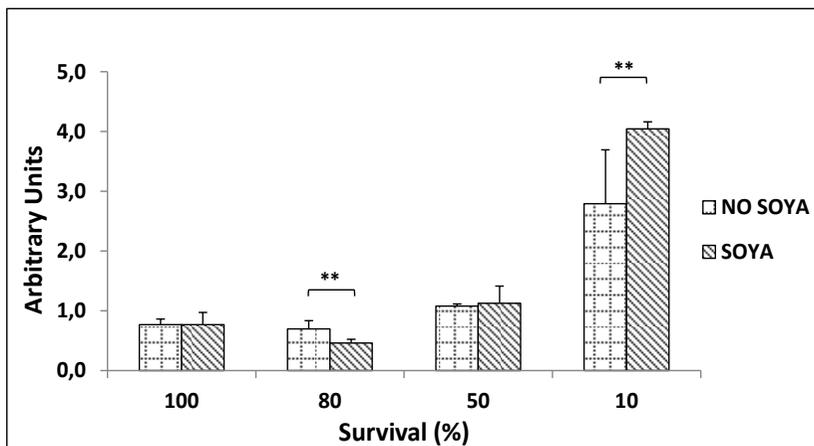


Figure 6.7.3.- Protein carbonylation in hepatic mitochondria from male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$.

6.7 EFFECT OF AGING AND SOYA INTAKE ON ANTIOXIDANT DEFENSE

If oxidative stress and the ability to respond appropriately to it is important in ageing, then it follows that factors that increase resistance to stress should have anti-ageing benefits and lead to enhanced life span.

Although ageing is likely to be a multifactorial process, there is significant evidence implicating the generation of ROS and the corresponding response to oxidative stress as key factors in determining longevity (Borras et al., 2007; Vina et al., 2011).

Mammalian cells scavenge ROS to nontoxic forms through a sophisticated antioxidant defense that includes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx).

Studies aimed at testing the role of oxidative stress in aging have used genetic manipulations to alter antioxidant status and oxidative damage in traditional experimental animal models, namely nematodes, fruit flies and mice. These studies have generated equivocal and contradictory results (Perez et al., 2009a; Perez et al., 2009b). Several studies in invertebrates have shown an increase in lifespan in response to increased antioxidant defense, but other studies show no beneficial effect of increased antioxidant defense. The great majority of studies in mice show no change in lifespan following increased or reduced antioxidant enzyme activity (Perez et al., 2009b).

On the other hand, several studies described that soya isoflavones exhibit antioxidant capabilities, both *in vitro* and *in vivo*, in addition to increment the activity of antioxidant enzymes (Yen et al., 2003; Liu et al., 2005; Mahn et al., 2005; Borras et al., 2006).

One objective of this thesis was to determine the effect of soya intake on antioxidant genes, specifically, GPx and MnSOD. We also aimed to evaluate their change with age.

For this purpose we measured their mRNA levels by RT-PCR, protein expression by western blotting and enzymatic activity by spectrophotometry, in liver homogenates.

6.7.1 Glutathione peroxidase

As we observe in our results, there is no influence of aging on GPx, since we found no changes in mRNA levels or enzymatic activity in either of the two experimental groups (See Figure 6.8.1.a., Figure 6.8.1.b, Figure 6.8.3.a. and Figure 6.8.3.b.), with the exception of protein expression that is higher 10% survival (Figure 6.8.2.a. and Figure 6.8.2.b.).

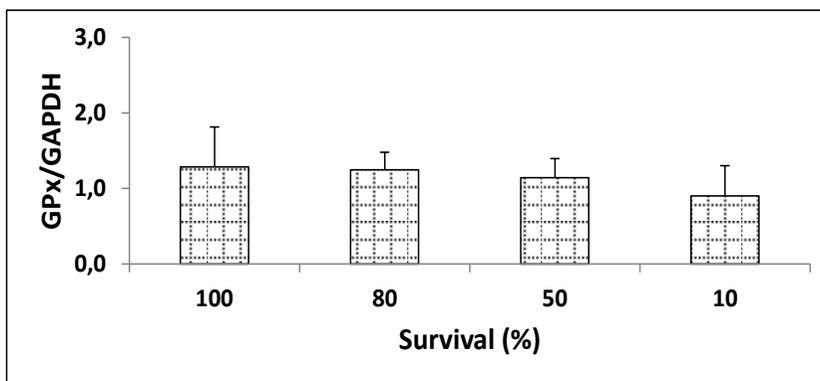


Figure 6.8.1. a.- mRNA levels of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. No statistical differences were observed.

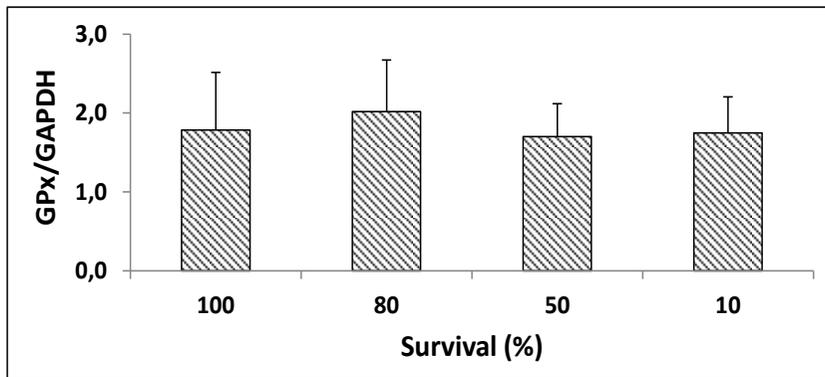


Figure 6.8.1. b.- mRNA levels of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. No statistical differences were observed.

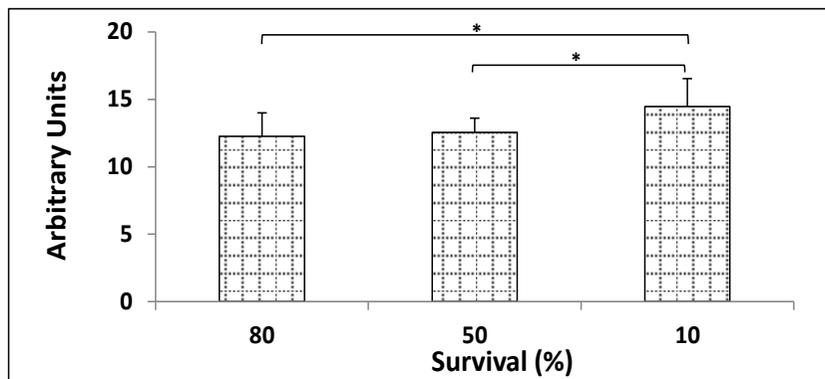


Figure 6.8.2. a.- Protein expression of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$.

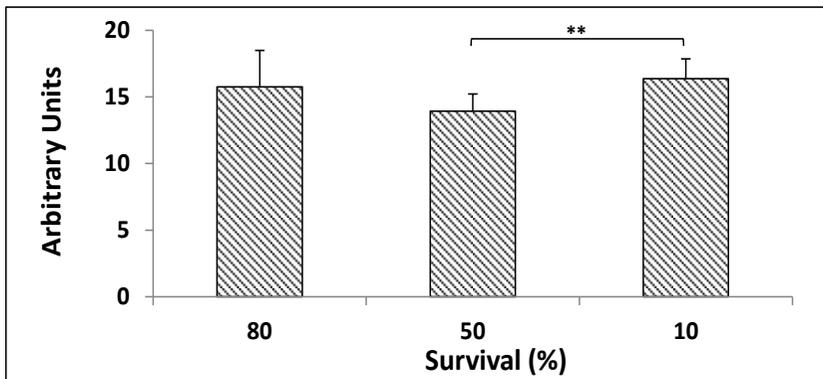


Figure 6.8.2. b.- Protein expression of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$.

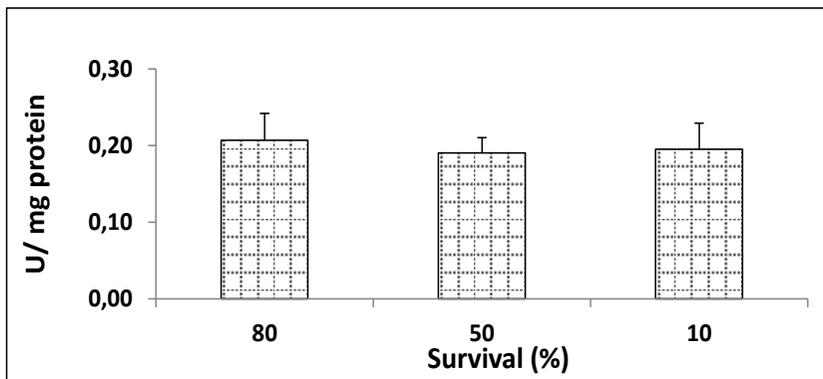


Figure 6.8.3. a.- Enzymatic activity of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. No statistical differences were observed.

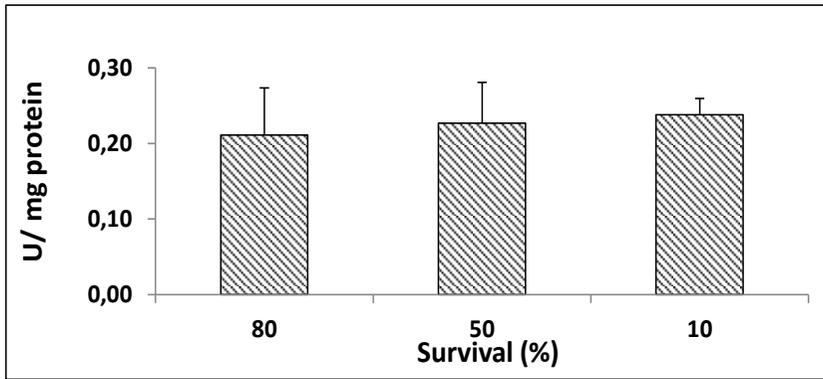


Figure 6.8.3. b.- Enzymatic activity of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. No statistical differences were observed.

About the effect of soya intake, Figure 6.8.1.c. and Figure 6.8.2.c. show how its consumption increases mRNA levels and protein expression, respectively, from 80% survival till 10% survival. Enzymatic activity of GPx is only increased when survival of mice is 10% (Figure 6.3.8.c).

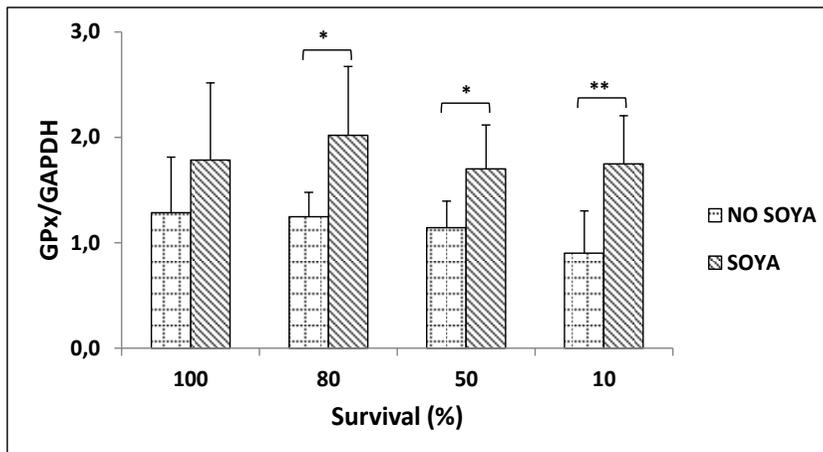


Figure 6.8.1. c.- mRNA levels of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

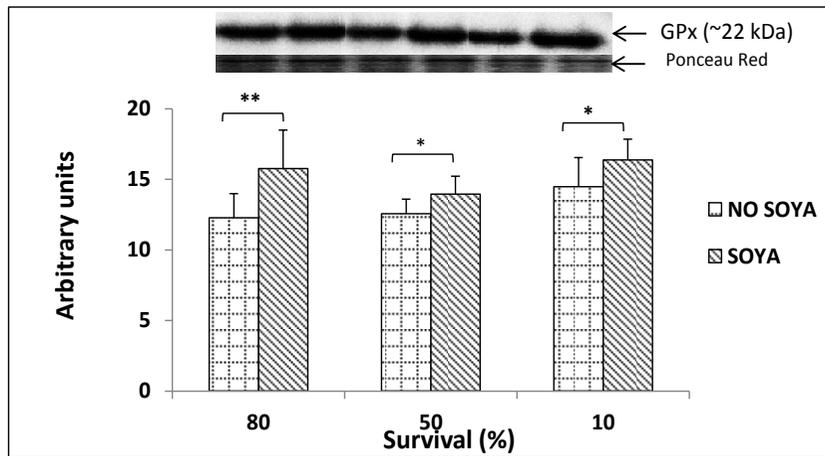


Figure 6.8.2. c.- Protein expression of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

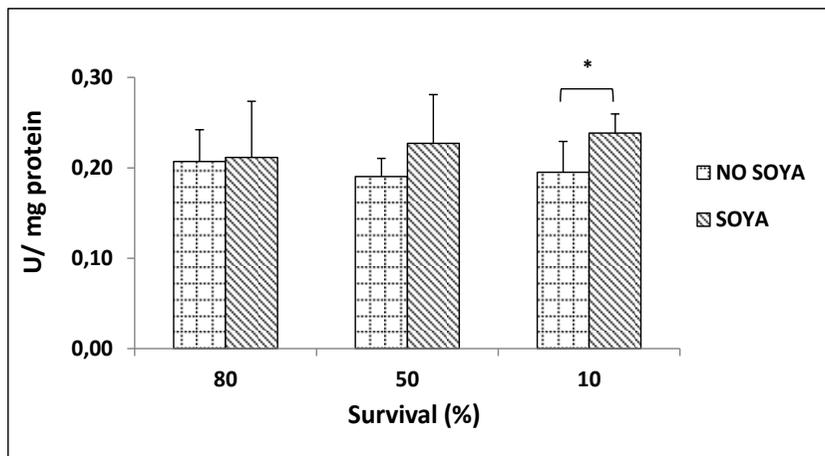


Figure 6.8.3. c.- Enzymatic activity of GPx in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$.

In any case, we did not observe differences in longevity, so although there has been an increase in GPx by soya consumption our results do not suggest a relationship between glutathione peroxidase and longevity, as others have stated (Perez et al., 2009a; Page et al., 2010).

6.7.2 Manganese superoxide dismutase

Manipulation of MnSOD expression has been attempted in a variety of species and experimental contexts, and the majority of reported results suggests beneficial effects on age-related diseases, if not on aging *per se* (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2009). In fact, conflicting results of the effect of increased MnSD expression on aging are obtained using different transgenic mouse strains (Hu et al., 2007; Jang et al., 2009).

In contrast to GPx which did not change during aging, mRNA expression of MnSOD was decreased with age in both experimental groups, suggesting that compensation maintained by the up-regulated GPx cannot be sustained and that the down-regulation of MnSOD expression could be a result of the aging process (Figure 6.8.4.a. and Figure 6.8.4.b.). This might explain the effect of soya consumption observed when survival is 10% (Figure 6.8.4.c.).

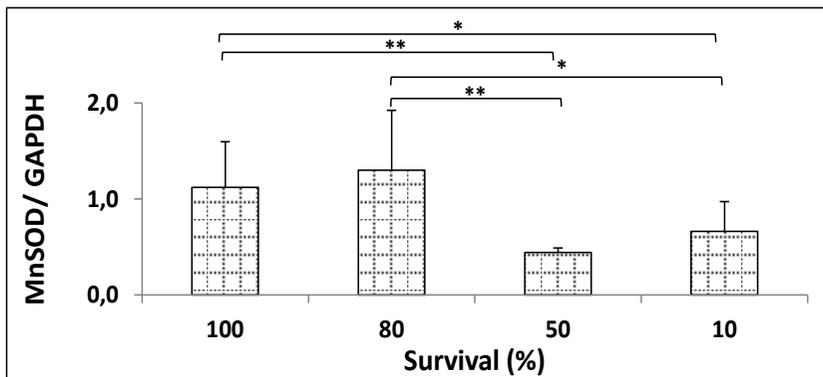


Figure 6.8.4. a.- mRNA levels of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

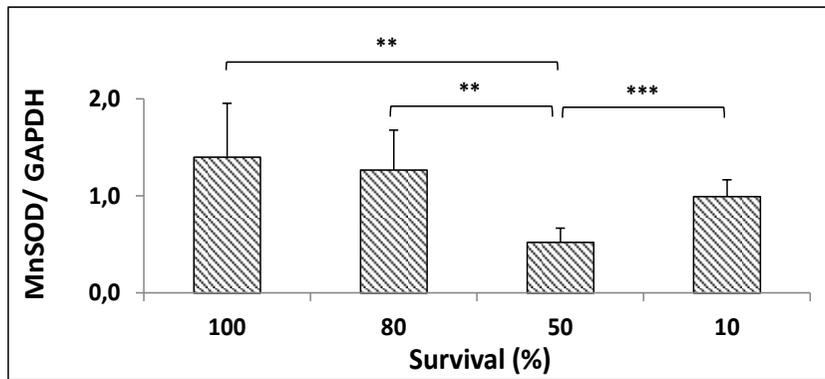


Figure 6.8.4. b.- mRNA levels of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

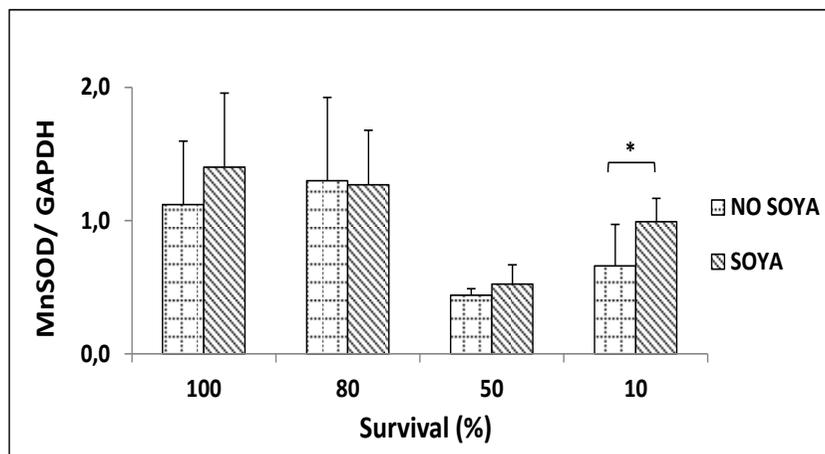


Figure 6.8.4. c.- mRNA levels of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$.

Protein levels and enzymatic activity show a tendency or even a significant increase with aging in both experimental groups (Figure 6.8.5.a., Figure 6.8.5.b., Figure 6.8.6.a. and Figure 6.8.6.b.). This contrasts with what is described in terms of loss of enzyme activity of MnSOD during aging (Navarro et al., 2004a).

The increase in MnSOD activity obtained in our study is conform with the results found by others in rodents and even in humans (Ji et al., 1990; Pansarasa et al., 1999; Andziak et al., 2005). These data could indicate the existence of regulatory mechanisms in senescent tissues which provide an induction of the defenses against ROS, and which may be generated at a higher rate during aging.

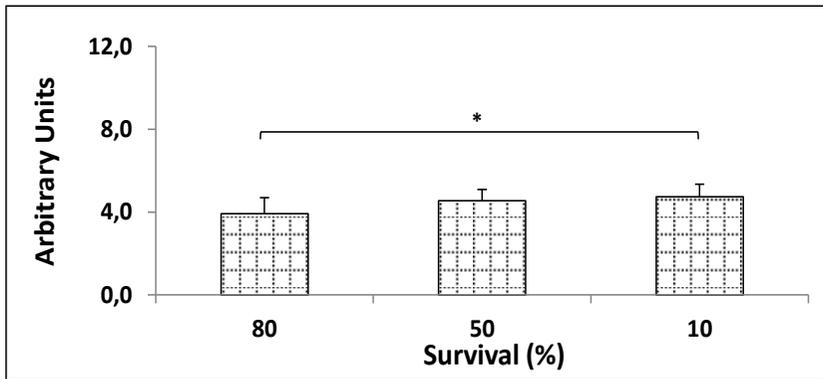


Figure 6.8.5. a.- Protein expression of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$.

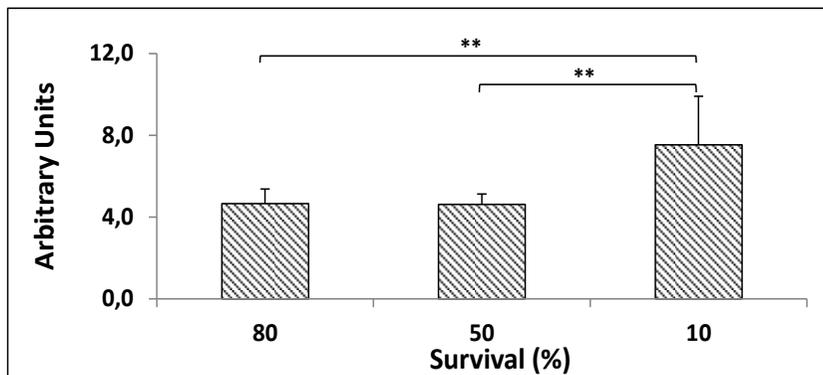


Figure 6.8.5. b.- Protein expression of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$.

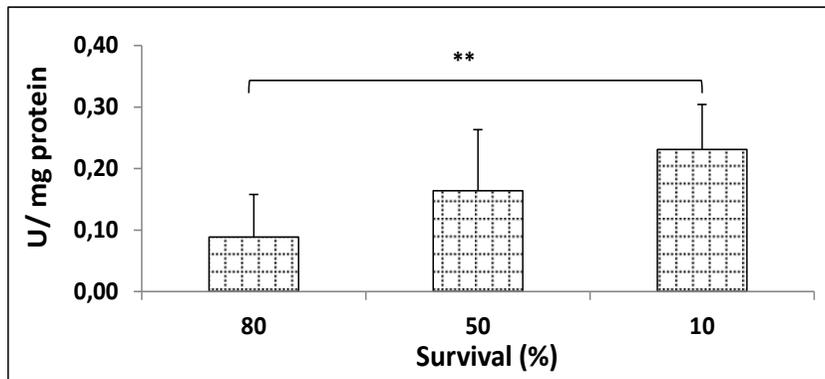


Figure 6.8.6. a.- Enzymatic activity of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$.

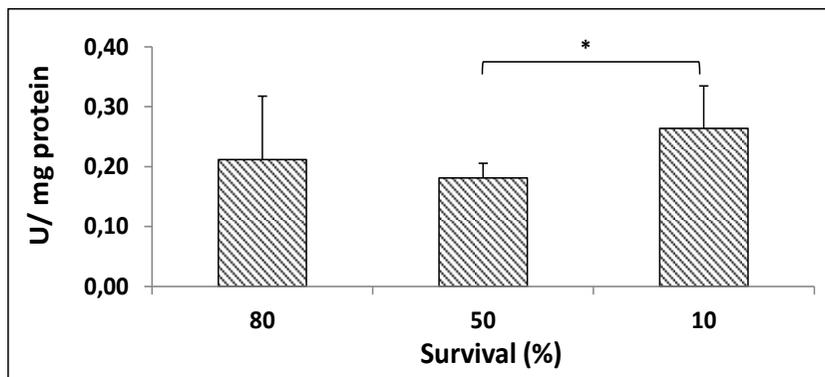


Figure 6.8.6. b.- Enzymatic activity of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$.

The effect of soya intake is ambiguous, it induces an increase in the protein expression of MnSOD when survival is 10% (Figure 6.8.5.c), but not in the enzyme activity, which increases when survival is 80% (Figure 6.8.6.c).

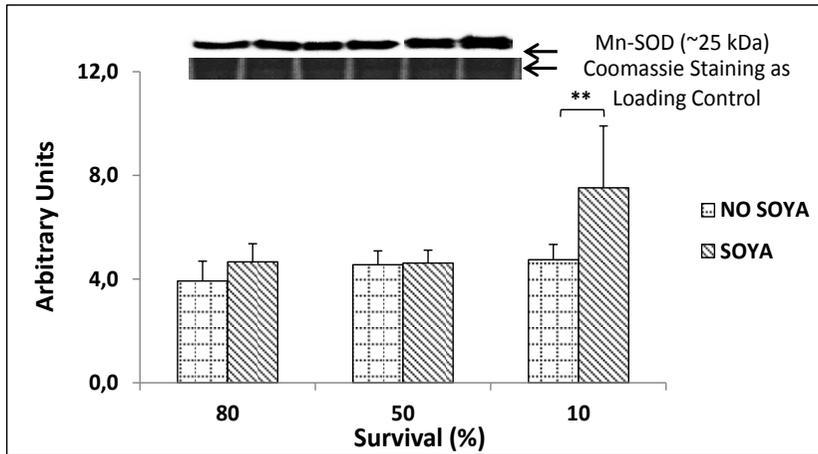


Figure 6.8.5. c.- Protein expression of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. No statistical differences were observed.

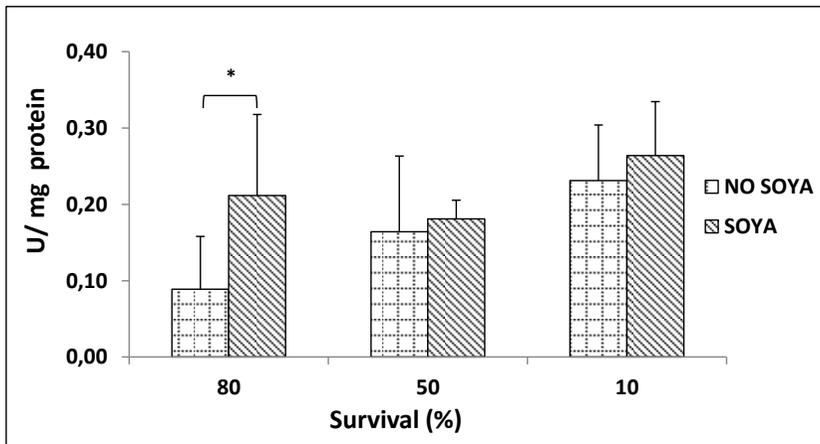


Figure 6.8.6. c.- Enzymatic activity of MnSOD in liver of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$.

Taking the above into consideration, soya increases the antioxidant gene expression and its activity at different points of the survival curve. Their effects on oxidative stress parameters are conflicting; however, they do not affect the longevity of male OF1 mice.

From the perspective of Mitochondrial Free Radical Theory of Aging, lowering ROS levels by increasing cellular antioxidant defenses should slow the progression of age-related alterations and eventually result in the life span prolongation. In contrast to expectations, our results are not consistent with a causal role of intracellular antioxidant enzymes on longevity, similar to recent reports from studies utilizing genetic modifications of mice (Jang et al., 2009; Perez et al., 2009a). This fact has been reviewed recently by Salmon et al, where it is clear that in most cases, mice with genetic manipulations in the antioxidant defense system, with few exceptions, do not show an increase in their life expectancy (Salmon et al., 2010).

This contradiction may make sense, because oxidative stress plays a limited role in the aging process, and / or because the role of oxidative stress in aging depends on factors such as the environment. Thus, in environments with a minimal stress load, as might be the case of our mice grew under optimal conditions, oxidative damage plays a negligible role on aging.

6.8 EFFECT OF AGING AND SOYA CONSUMPTION ON GLUCOSE UPTAKE BY THE BRAIN *IN VIVO*

For over two decades, the uptake of ^{18}F -FDG by the brain has been studied using PET, and a common pattern of the results of many studies is a reduction of brain glucose consumption in the normal aging process and cognitive impairment. In fact, it is used in preclinical diagnosis as a possible predictor of neurodegenerative disorders (Small 2006; Mosconi et al., 2008a; Small et al., 2008).

Previous studies from our group have shown how brain glucose metabolism is decreased with aging (Borras et al., 2009) and ovariectomy (by the absence of estrogen) (Lopez-Grueso et al., 2010).

Because one of the aims of this thesis is to determine the effect of aging and soya consumption on brain glucose metabolism, the mice underwent a PET test before their sacrifice at 100, 50 and 10% survival.

Contrary to expectations, our results do not only demonstrate lack of reduction but show an increase of glucose consumption with aging, and it is more pronounced in mice fed soya-free diet (Figure 6.9.1 and Figure 6.9.2).

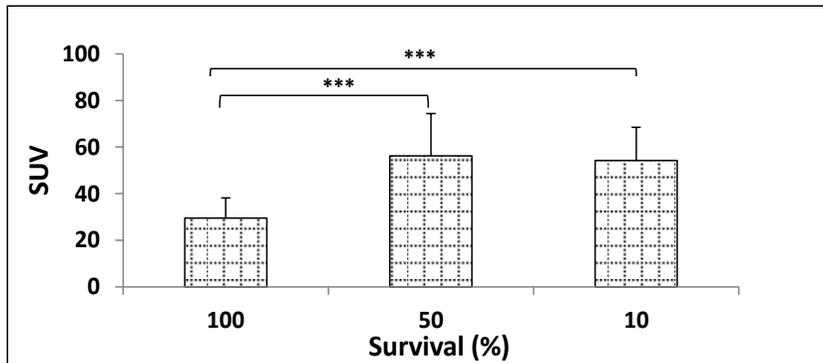


Figure 6.9.1.- *in vivo* brain glucose uptake of male OF1 mice fed with soya-free diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: *** $P < 0.001$.

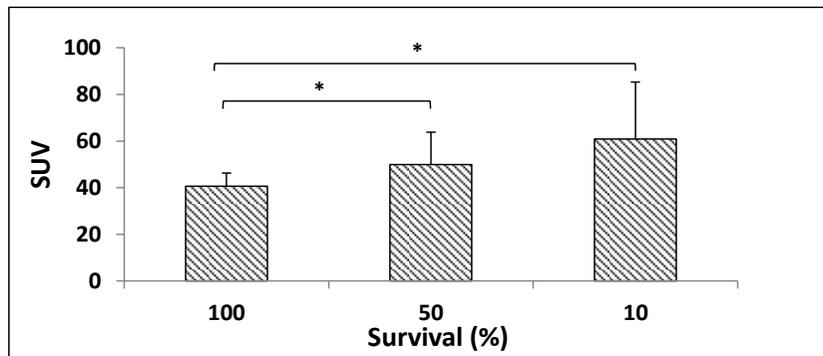


Figure 6.9.2.- *in vivo* brain glucose uptake of male OF1 mice fed with soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: * $P < 0.05$.

This fact can be explained by a recent report of Xiaoyan Shen and colleagues (Shen et al., 2012), where it is seen that the correlation between brain glucose consumption and age, depends on factors such as gender and brain region. In case of men, Shen has observed how the correlation can be negative or positive depending on the brain region. This means that in some regions of the male brain, the glucose uptake increases with age. This could explain our results because we have determined whole brain glucose consumption.

Regarding the consumption of soya, in our study we observed a positive effect only at 100% survival of mice (Figure 6.9.3).

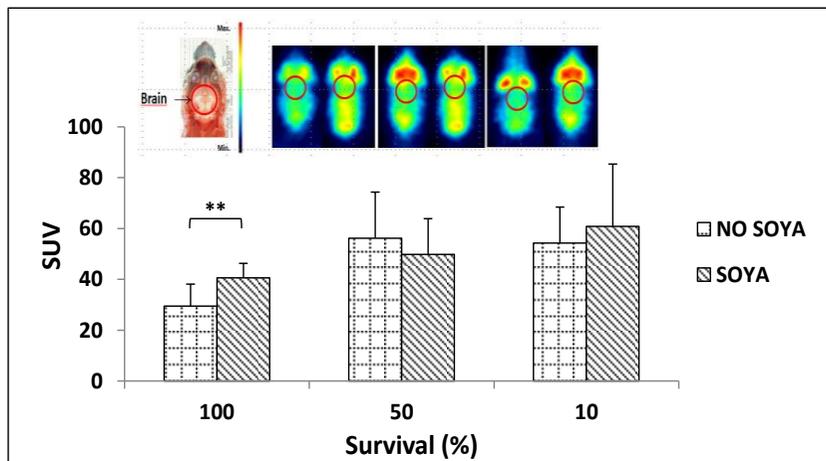


Figure 6.9.3.- *in vivo* brain glucose uptake of male OF1 mice fed with soya-free or soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SD of 5 mice in each group. We performed *t* test: ** $P < 0.01$.

We cannot contrast our results because to our knowledge there are no studies on the effect of soya on the brain metabolism of glucose.

6.9 EFFECT OF SOYA ON GLUCOSE TOLERANCE AND HEPATIC FUNCTION

The aging process is accompanied by a decreased ability to maintain homeostasis with a progressive loss of performance of each of the organs or organ systems, causing increased vulnerability which finally leads to the death of the organism (Hayflick 1998; de Magalhaes 2005).

6.9.1 Oral glucose tolerance

Among the disorders associated with aging is glucose intolerance (Chang et al., 2003; Goren et al., 2004).

Encouraging findings from animals (Mezei et al., 2003; Bartke et al., 2004; Lee 2006; Shim et al., 2007; Cederroth et al., 2008; Lu et al., 2008) and observational studies in humans (Yang et al., 2004; Villegas et al., 2008; Nanri et al., 2010) have led many researchers to hypothesize that soya intake may be beneficial for glucose homeostasis, for example to improve glycemic control and increasing the sensitivity to insulin. Whereas others observed no significant effect (Liu et al., 2010; Liu et al., 2011).

We performed an oral glucose tolerance test when survival was 50 and 10%, represented in Figure 6.10.1 and Figure 6.10.2, respectively. And effectively we saw an impaired glucose tolerance with age.

However, there were no significant differences between our experimental groups. In both cases, they reached the highest glucose level at 15 min after its administration. Even though the levels decreased gradually, none returned to their fasting levels at 120 minutes as it had been expected. So could be that these mice were intolerant to glucose.

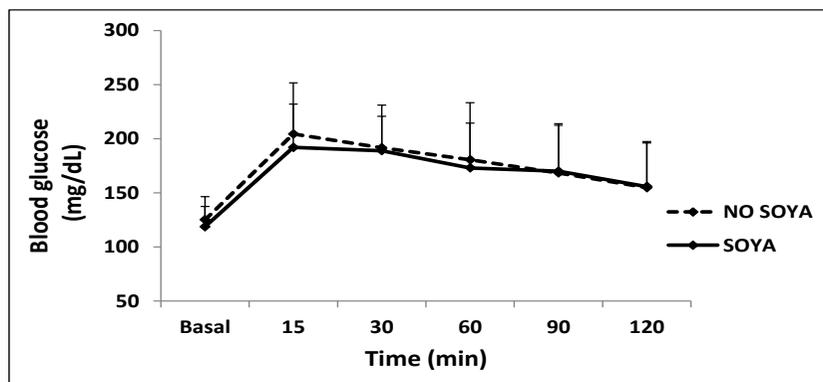


Figure 6.10.1.- Blood glucose curves during OGTT in male OF1 mice fed with soya-free and soya-rich diet, at 50% survival.

Data are expressed as mean \pm SD of 11 mice in each group. No statistical differences were observed.

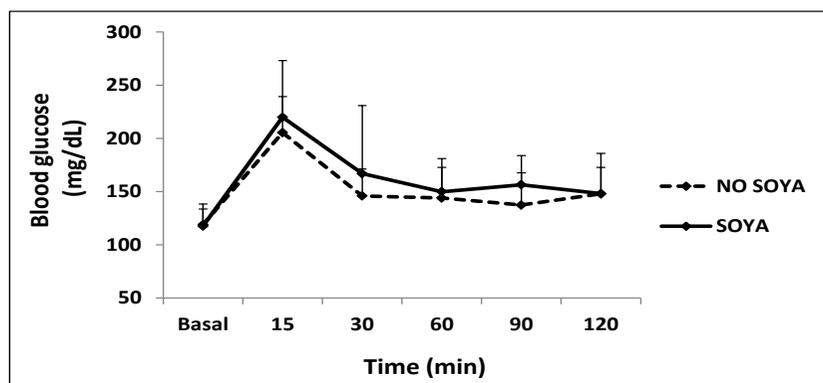


Figure 6.10.2.- Blood glucose curves during OGTT in male OF1 mice fed with soya-free and soya-rich diet, at 10% survival.

Data are expressed as mean \pm SD of 6 mice in soya-free group and 5 mice in soya-rich group. No statistical differences were observed.

Therefore, there was no effect attributable to the soya on glucose tolerance in the male OF1 mice.

Similarly, Edwin D Lephart *et al* evaluated the effect of dietary soy-derived phytoestrogens on glucose levels in male Long-Evans rats and they showed that these rats displayed slightly higher values, but not statistically significant, compared to males fed phytoestrogens-free diet (Lephart *et al.*, 2004b).

6.9.2 Hepatic function

Dr. Ana Cuervo *et al* in 2005 concluded that there is a decrease in autophagic activity with age, described in almost all model organisms analyzed, and this has been proposed to contribute to age-dependent accumulation of damaged intracellular components, that lead to altered cellular homeostasis and loss of function in aging (Cuervo *et al.*, 2005).

As for the effect of isoflavones on liver function, there is much controversy, some believe they are associated with worse liver function (Setchell *et al.*, 1987), others have observed that they may have a protective effect against several damages to this organ (Kuzu *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007).

We analyzed the clearance time of zoxazolamine, a muscle relaxant, as an index of liver function (Pappas *et al.*; 1998). At 50% survival, we gave mice a single intraperitoneal injection of zoxazolamine (150 mg kg^{-1} , in corn oil), placed them on their backs and recorded the time required to regain righting reflex after the paralysis induced by this compound.

Our result, shown in Figure 6.11, suggests that soya feeding has no effect on hepatic function in male OF1 mice.

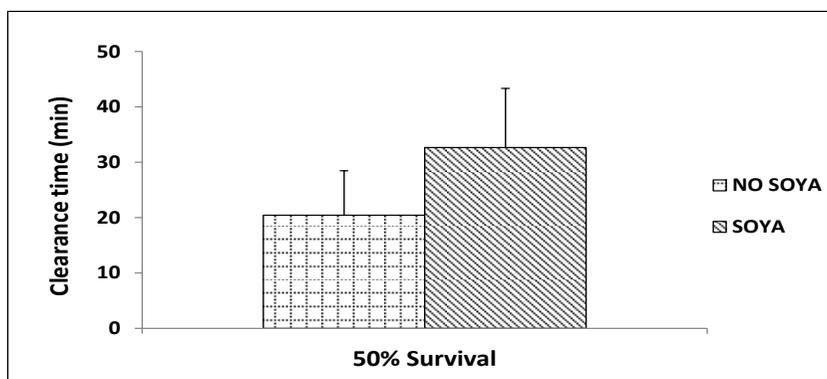


Figure 6.11.- Time of recovery from the muscular paralysis male OF1 mice fed with soya-free and soya-rich diet.

Data are expressed as mean \pm SEM of the recovery times in six mice in each group. No statistical differences were observed.

6.10 BEHAVIORAL AND MOTOR FUNCTION TESTING

6.10.1 Novel objects recognition

The aging process in many cases also involves a decline in cognitive abilities such as memory and learning (Erickson et al., 2003; Rosenzweig et al., 2003; Burke et al., 2006; Frick 2009).

At present, many products containing soya phytoestrogens are recommended for the treatment of menopausal symptoms and / or prevention of age-related diseases. However, its effects on cognition remain ambiguous.

According to recent studies in rodents, soya appears to be a useful resource for cognitive deficits, increasing the ability of learning and memory (Bansal et al., 2010; Yang et al., 2011).

Nevertheless, our results in testing Novel Objects Recognition (NOR) to evaluate the effect of age and soya intake on learning and memory, represented in Figure 6.12.1 and Figure 6.12.1, were maintained throughout all studied ages and they do not corroborate the previously mentioned research regarding the negative effects of aging, nor the positive effects of soya consumption on cognition.

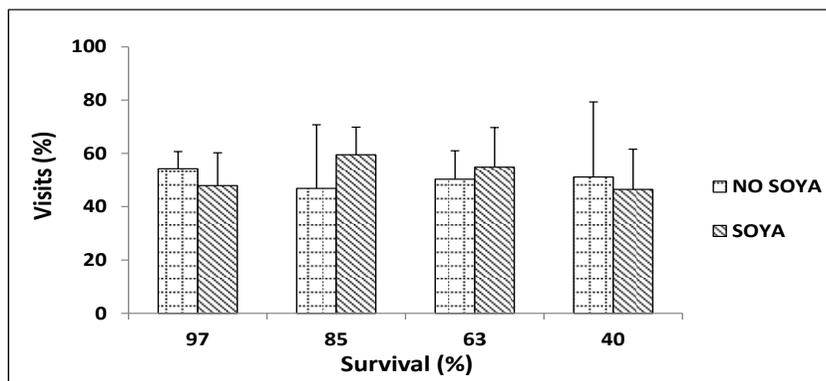


Figure 6.12.1.- Percentage of visits in NOR test after 1 hour.

Data are expressed as mean \pm SD of six mice in each group. No statistical differences were observed.

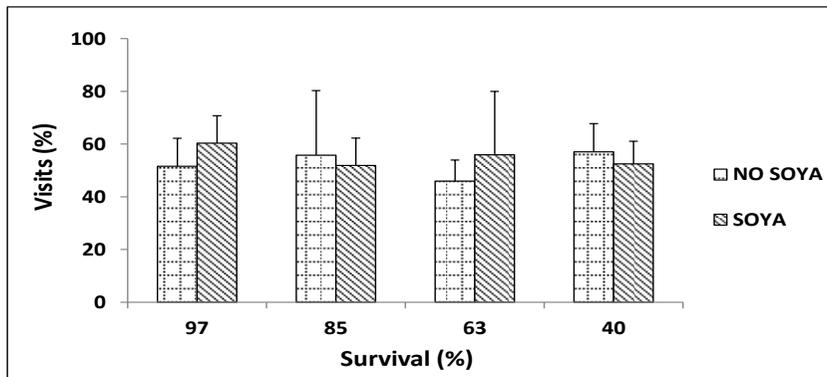


Figure 6.12.2.- Percentage of visits in NOR test after 24 hours.

Data are expressed as mean \pm SD of six mice in each group. No statistical differences were observed.

There are weaknesses of the available data regarding the effect of soya isoflavones on cognition; in our case we cannot attribute to soya consumption any effect on memory of male OF1 mice. But further tests are necessary to assess different types of memory and its evolution with age.

6.10.2 Motor coordination and grip strength

Other parameters which have been negatively related to the aging process are neuromuscular coordination and grip strength of the forelimbs (Ingram et al., 1986; Matheu et al., 2007).

We performed functional tests of “tightrope test” to evaluate muscular coordination and “forelimb grip strength analysis” which measures the grasping reflex in the forepaws (a reflective of muscle strength) that evaluate neuromuscular integration of the forelimbs (Tanase et al., 2004).

We could not perform these tests at all points, so we only have results at 50% survival, represented in Figure 6.13 and Figure 6.14, in which we observed no beneficial effect of soya consumption, rather a tendency to be harmful.

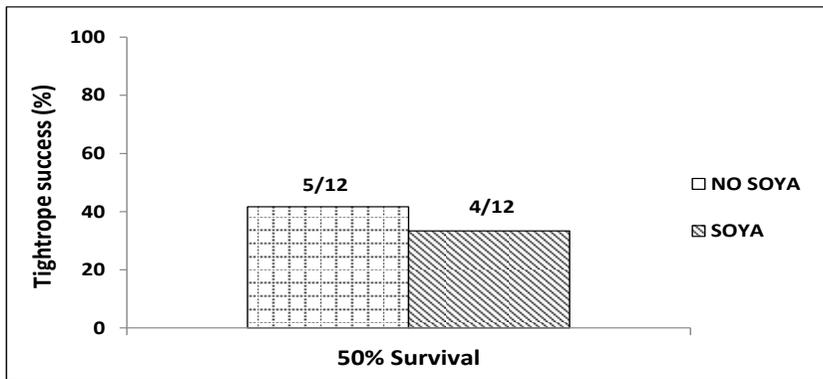


Figure 6.13.- Muscular coordination in male OF1 mice fed soya-free diet o soya-rich diet.

Data are expressed as percentage of success in “tightrope test” of twelve mice in each group. No statistical differences were observed.

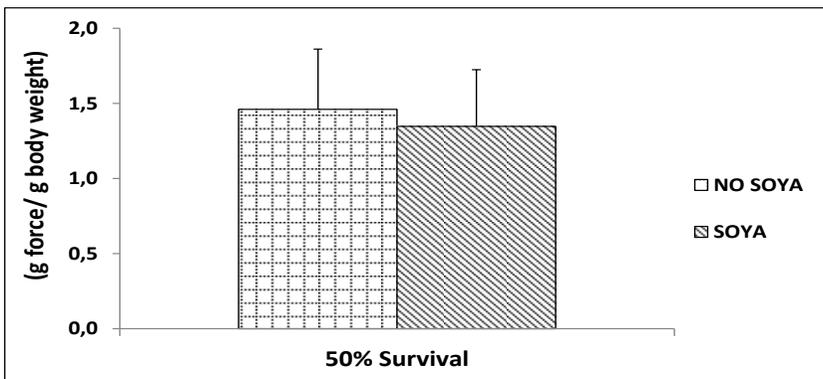


Figure 6.14.- Grip strength in male OF1 mice fed soya-free diet o soya-rich diet.

Values are means \pm SD of 17 mice in each group. No statistical differences were observed.

6.11 LIMITATIONS OF THE STUDY

As in any research study there are limitations that may hinder achieving all the objectives. In this thesis, these could be:

1. The longevity curve was performed in male OF1 mice housed individually and in optimal conditions, so the results are not extrapolated to the human population that live in heterogeneous conditions, and to a greater or lesser extent, with some kind of stress.
2. The conditions are so favorable that nutritional intervention is not enough to modify longevity. We think it could have an effect on most unfavorable conditions.
3. The diet used is fortified and especially for pups and specific conditions. It has more proteins and lipids than the normal diet, therefore, we started to monitor the daily intake from 45 weeks of age. This could be limiting because it was not performed from the beginning of the study.
4. Regarding the assumed status of sedentary mice, which was derived from the previous point, they could have developed diabetes with age. To demonstrate this we should have run the oral glucose tolerance test from the beginning of the study and not only when survival was 50 and 10%.
5. In terms of oxidative stress parameters, in this study we measured lipid peroxidation and protein oxidation in isolated liver mitochondria. It was difficult to compare our results with those of other publications since these parameters are mostly measured in tissue or plasma.

7 CONCLUSIONES

7.1 CONCLUSIÓN GENERAL

El consumo de una dieta rica en soja no alarga ni la vida media ni la vida máxima de ratones OF1 machos, bajo condiciones óptimas de vida.

7.2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. El consumo de soja no tiene ningún papel favorable sobre la reducción del peso corporal ni como supresor del apetito de ratones OF1 machos.
2. El perfil metabólico a nivel sérico no cambia con la edad ni con el consumo de soja. Sin embargo, a nivel de las mitocondrias hepáticas sí cambia tanto con la edad como con el consumo de soja.
3. Hay una correlación positiva entre el envejecimiento y la producción mitocondrial de peróxidos de hidrógeno, sin embargo, el consumo de soja podría paliar el efecto de la edad sobre dicha producción por las mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos.
4. El envejecimiento aumenta los niveles de peroxidación lipídica. No obstante, el consumo de soja evita dicho aumento e incluso lo disminuye al 10% de supervivencia, en las mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos.
5. Con el envejecimiento aumenta la oxidación proteica de las mitocondrias hepáticas de ratones OF1 machos. El consumo de soja previene dicha oxidación al 80% de supervivencia, sin embargo, la aumenta al 10% de supervivencia.

6. El envejecimiento no afecta ni los niveles de mRNA ni la actividad enzimática de GPx, pero sí incrementa sus niveles proteicos, y el consumo de soja induce su expresión e incrementa su actividad enzimática.
7. Con el envejecimiento disminuyen los niveles de mRNA, pero aumentan los niveles proteicos y la actividad enzimática de MnSOD. El consumo de soja aumenta su expresión al 10% de supervivencia, y su actividad enzimática al 80% de supervivencia.
8. El consumo cerebral de glucosa aumenta con la edad en ratones OF1 machos. El consumo de soja sólo lo aumenta al 100% de supervivencia.
9. El envejecimiento empeora la tolerancia a la glucosa oral en ratones OF1 machos, y el consumo de soja no tiene ningún efecto sobre éste.
10. El consumo de soja no tiene efecto ninguno sobre la función hepática de ratones OF1 machos, al 50% de supervivencia.
11. Ni la edad ni el consumo de soja afectan la capacidad cognitiva de ratones OF1 machos.
12. El consumo de soja no afecta ni la coordinación motora ni la fuerza muscular de los ratones OF1 machos, al 50% de supervivencia.

8 CONCLUSIONS

8.1 MAIN CONCLUSION

Soya feeding does not increase lifespan (neither maximum nor average) in a controlled population of male OF1 mice.

8.2 SPECIFIC CONCLUSIONS

1. Soya consumption has no effect on reducing body weight or as an appetite suppressant in male OF1 mice.
2. The serum metabolic profile does not change with age or with soya consumption in male OF1 mice. However, the metabolic profile in liver mitochondria does change with age and with soya intake.
3. There is a positive correlation between aging and mitochondrial production of hydrogen peroxide, however soya intake may mitigate the effect of age on this production by liver mitochondria of male OF1 mice.
4. Aging increases the levels of lipid peroxidation in hepatic mitochondria of male OF1 mice. However, soya intake prevents this increase and even lowers it when survival is 10%.
5. Aging increases protein oxidation in hepatic mitochondria of male OF1 mice. Soya consumption protects against this oxidation when survival is 80%, however it has a pro-oxidant effect when survival is 10%.
6. Aging affects neither mRNA levels nor the enzymatic activity of GPx, but increases its protein levels. Soya intake induces its overexpression and increases its enzymatic activity.

7. Aging decreases mRNA levels but increases protein levels and enzymatic activity of MnSOD. Soya intake induces overexpression of this gene when survival is 10%; however it increases its enzymatic activity when survival is 80%.
8. Cerebral glucose consumption increases with age in male OF1 mice. Soya intake increases this when survival is 100%.
9. Aging impairs oral glucose tolerance in male OF1 mice and soya consumption has no effect on it.
10. Soya intake has no effect on liver function of male OF1 mice when survival is 50%.
11. Neither aging nor soya intake affect cognitive ability of male OF1 mice.
12. Soya intake affects neither motor coordination nor grip strength of male OF1 mice when survival is 50%.

9 ANEXOS

9.1 ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

NOMENCLATURA	SÍMBOLO	NOMENCLATURE
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	Singlet oxygen
Absorbancia	Abs	Absorbance
Análisis de Componentes Principales	ACP - PCA	Principal Components Analysis
Ácido desoxirribonucleico	DNA	Deoxyribonucleic acid
Análisis de la varianza	ANOVA	Analysis of variance
Persulfato Amónico	APS	Ammonium persulphate
Ácido Ribonucleico mensajero	mRNA	Messenger RNA
Ácido Ribonucleico	RNA	Ribonucleic acid
Ácido Tricloroacético	ATC / TCA	Trichloroacetic acid
Adenosín-5'-trifosfato	ATP	Adenosin-5'-triphosphate
Ácido batofenantrolindisulfónico	BPDS	Bathophenanthroline disulfonic acid
Suero bovino albúmina	BSA	Bovine Serum Albumin
Ciclo umbral	Ct	Threshold cycle
Cobre/Zinc Superóxido Dismutasa	Cu/Zn-SOD	Copper/Zinc superoxide dismutase
Dietilpirocarbonato	DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
Dimetilsulfóxido	DMSO	Dimethylsulfoxide
2,4-dinitrofenilhidrazina	DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine
Desoxinucleótidos	dNTPs	Deoxynucleotides
Desoxicolato	DOC	Deoxycholate
Ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Etileno glico-bis (aminoetil éter)- N,N,N',N'-ácido tetracético	EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
Receptor estrogénico	ER	Estrogen receptor
Federación de asociaciones científicas europeas de animales de laboratorio	FELASA	Federation of European laboratory animal science associations
Fe Superóxido dismutasa	Fe-SOD	Fe superoxide dismutase
^{18}F -Fluorodesoxiglucosa	^{18}F -FDG	^{18}F fluoro-2-Deoxy-D-glucose
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
Glutación peroxidasa	GPx	Glutathione peroxidase
Glutación-disulfuro reductasa	GR	Glutathione-disulfide reductase

Glutación reducido	GSH	Reduced glutathione
Glutación oxidado	GSSG	Oxidized glutathione
Peróxido de hidrógeno	H₂O₂	Hydrogen Peroxide
Ácido clorídrico	HCl	Chloride acid
N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-ácido etanosulfónico	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid
Radical hidroxilo	HO[•]	Hydroxyl radical
Cromatografía líquida de alta resolución	HPLC	High-performance liquid chromatography
Hidrogenofosfato potásico	K₂HPO₄	Potassium hydrogen phosphate
Dihidrogenofosfato potásico	KH₂PO₄	Potassium dihydrogen phosphate
Hidróxido potásico	KOH	Potassium Hydroxide
Proteín quinasas activadas por mitógenos	MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Malondialdehído	MDA	Malondialdehyde
Manganeso superóxido dismutasa	MnSOD	Manganese Superoxide Dismutase
Ácido propano sulfónico	MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic Acid
Nicotiamida adenín dinucleótido	NADH	Reduced Nicotine Adenine Dinucleotide
Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato oxidado	NADP⁺	Oxidized Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate
Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato reducido	NADPH	Reduced Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate
Bicarbonato sódico	NaHCO₃	Sodium bicarbonate
Hidróxido de sodio	NaOH	Sodium hydroxide
Facto nuclear kappa B	NFκB	Nuclear factor kappa B
Óxido nítrico	NO[•]	Nitric Oxide
Dióxido de nitrógeno	NO₂[•]	Nitrogen dioxide
Reconocimiento de objetos nuevos	NOR	Novel Objects Recognition
Anión superóxido	O₂^{•-}	Superoxide anion
Peroxinitrito	ONOO⁻	Peroxynitrite
Óxidoreductasa	OR	Oxidoreductase
Fosfato tampón salino	PBS	Phosphate buffered <i>saline</i>
Tampón fosfato salino-Tween	PBS-T	Phosphate buffered saline-Tween
Análisis de Componentes Principales	PCA	Principal Components Analysis
Tomografía por Emisión de Positrones	PET	Positron Emission Tomography

Polifluoruro de vinilideno	PVDF	Polivinil Difluoride
Resonancia magnetica cluclear	RMN - NMR	Nuclear magnetic resonance
Ribonucleasa	RNAsas	Ribonuclease
Especies reactivas de nitrógeno	RNS	Reactive nitrogen species
Radical peroxilo	ROO[•]	Radical peroxil
Especies Reactivas de Oxígeno	ROS	Reactive oxygen species
Transcripción reversa	RT	Reverse transcription
Transcriptasa reversa	RT	Reverse Transcriptase
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	RT-PCR	Real time-polymerase chain reaction
Error estándar	SEM	Standard error of mean
Desviación típica	SD	Standard deviation
Sodio dodecil sulfato	SDS	Sodium dodecyl sulfate
Superóxido dismutasa	SOD	Superoxide dismutase
Ácido tiobarbitúrico	TBA	Thio-barbituric acid
Tris tampón salino	TBS	Tris buffered saline
Tris Tampón salino con tween	TBS-T	Tris buffered saline-tween
N,N,N,N'-tetrametilnetilendiamina	TEMED	Tetramethylethylenediamine
2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol	TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Unidades arbitrarias	U.A.	Arbitrary Units
Unidades Internacionales	UI	International Units
Ultra cromatografía líquida	UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
Volumen/volumen	v/v	Volume/ volume

10 BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz, C. H., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Hockerstedt, K. A., Watanabe, S., Hamalainen, E. K., Markkanen, M. H., Makela, T. H., Wahala, K. T. and Adlercreutz, T. (1995). "Soybean phytoestrogen intake and cancer risk." J Nutr **125**(3 Suppl): 757S-770S.
- Adlercreutz, H. (1984). "Does fiber-rich food containing animal lignan precursors protect against both colon and breast cancer? An extension of the "fiber hypothesis"." Gastroenterology **86**(4): 761-764.
- Adlercreutz, H. (1990). "Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations." Scand J Clin Lab Invest Suppl **201**: 3-23.
- Adlercreutz, H. (1998). "Epidemiology of phytoestrogens." Baillieres Clin Endocrinol Metab **12**(4): 605-623.
- Adlercreutz, H. (2002). "Phyto-oestrogens and cancer." Lancet Oncol **3**(6): 364-373.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G. and Hase, T. (1993a). "Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry." Scand J Clin Lab Invest Suppl **215**: 5-18.
- Adlercreutz, H., Markkanen, H. and Watanabe, S. (1993b). "Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men." Lancet **342**(8881): 1209-1210.
- Adlercreutz, H. and Mazur, W. (1997). "Phyto-oestrogens and Western diseases." Ann Med **29**(2): 95-120.
- Agarwal, S. and Sohal, R. S. (1994). "Aging and protein oxidative damage." Mech Ageing Dev **75**(1): 11-19.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987). "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases." J Biol Chem **262**(12): 5592-5595.
- Aleman, J., de la Cruz, M. J., Roncero, I. and Miquel, J. (1988). "Effects of aging on respiration, ATP levels and calcium transport in rat liver mitochondria. Response to theophylline." Exp Gerontol **23**(1): 25-34.
- Ali, A. A., Velasquez, M. T., Hansen, C. T., Mohamed, A. I. and Bhatena, S. J. (2004). "Effects of soybean isoflavones, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes." J Nutr Biochem **15**(10): 583-590.
- Alonso-Fernandez, P. and De la Fuente, M. (2011). "Role of the immune system in aging and longevity." Curr Aging Sci **4**(2): 78-100.
- Altun, D., Uysal, H., Askin, H. and Ayar, A. (2011). "Determination of the effects of genistein on the longevity of *Drosophila melanogaster* meigen (Diptera; Drosophilidae)." Bull Environ Contam Toxicol **86**(1): 120-123.
- Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." Science **221**: 1256-1264.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 7915-7922.
- Anderson, J. J. and Garner, S. C. (1998). "Phytoestrogens and bone." Baillieres Clin Endocrinol Metab **12**(4): 543-557.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. and Cook-Newell, M. E. (1995). "Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids." N Engl J Med **333**(5): 276-282.

- Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C. and Proietto, J. (2008). "Evaluating the glucose tolerance test in mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(6): E1323-1332.
- Andziak, B. and Buffenstein, R. (2006). "Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice." Aging Cell **5**(6): 525-532.
- Andziak, B., O'Connor, T. P. and Buffenstein, R. (2005). "Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat." Mech Ageing Dev **126**(11): 1206-1212.
- Anson, R. M., Senturker, S., Dizdaroglu, M. and Bohr, V. A. (1999). "Measurement of oxidatively induced base lesions in liver from Wistar rats of different ages." Free Radic Biol Med **27**(3-4): 456-462.
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B., Hughes, C. L., Jr., Morgan, T. M. and Burke, G. L. (1996). "Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys." J Nutr **126**(1): 43-50.
- Aoyama, T., Fukui, K., Takamatsu, K., Hashimoto, Y. and Yamamoto, T. (2000). "Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK)." Nutrition **16**(5): 349-354.
- Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimira, M., Eboshida, A., Adlercreutz, H. and Watanabe, S. (2000). "Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake." J Epidemiol **10**(2): 127-135.
- Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P. and Kukreja, S. C. (1996). "Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis." J Nutr **126**(1): 161-167.
- Arjmandi, B. H. and Smith, B. J. (2002). "Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action." J Nutr Biochem **13**(3): 130-137.
- Arking, R., Burde, V., Graves, K., Hari, R., Feldman, E., Zeevi, A., Soliman, S., Saraiya, A., Buck, S., Vettraino, J., Sathrasala, K., Wehr, N. and Levine, R. L. (2000). "Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns." Exp Gerontol **35**(2): 167-185.
- Arora, A., Nair, M. G. and Strasburg, G. M. (1998). "Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system." Free Radic Biol Med **24**(9): 1355-1363.
- Asdell, S. A., Doornenbal, H., Joshi, S. R. and Sperling, G. A. (1967). "The effects of sex steroid hormones upon longevity in rats." J Reprod Fertil **14**(1): 113-120.
- Atkinson, C., Compston, J. E., Day, N. E., Dowsett, M. and Bingham, S. A. (2004). "The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." Am J Clin Nutr **79**(2): 326-333.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C. L. and Lampe, J. W. (2005). "Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health." Exp Biol Med (Maywood) **230**(3): 155-170.
- Atkinson, C., Newton, K. M., Bowles, E. J., Yong, M. and Lampe, J. W. (2008). "Demographic, anthropometric, and lifestyle factors and dietary intakes in

- relation to daidzein-metabolizing phenotypes among premenopausal women in the United States." *Am J Clin Nutr* **87**(3): 679-687.
- Axelsson, M., Kirk, D. N., Farrant, R. D., Cooley, G., Lawson, A. M. and Setchell, K. D. (1982). "The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine." *Biochem J* **201**(2): 353-357.
- Azadbakht, L., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Esmailzadeh, A., Hu, F. B. and Willett, W. C. (2007). "Dietary soya intake alters plasma antioxidant status and lipid peroxidation in postmenopausal women with the metabolic syndrome." *Br J Nutr* **98**(4): 807-813.
- Baba, T., Shimizu, T., Suzuki, Y., Ogawara, M., Isono, K., Koseki, H., Kurosawa, H. and Shirasawa, T. (2005). "Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate longevity signals to enhance resistance to oxidative stress in mice." *J Biol Chem* **280**(16): 16417-16426.
- Bagheri, M., Joghataei, M. T., Mohseni, S. and Roghani, M. (2011). "Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid beta(1-40) rat model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Learn Mem* **95**(3): 270-276.
- Bansal, N. and Parle, M. (2010). "Soybean supplementation helps reverse age- and scopolamine-induced memory deficits in mice." *J Med Food* **13**(6): 1293-1300.
- Barbosa, A. C., Lajolo, F. M. and Genovese, M. I. (2011). "Effect of free or protein-associated soy isoflavones on the antioxidant status in rats." *J Sci Food Agric* **91**(4): 721-731.
- 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 Bioenerg Biomembr* **31**(4): 347-366.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R. and Lopez-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 Radic Res* **21**(5): 317-327.
- Barja, G. and 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): 312-318.
- Barnes, S. (1995). "Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer." *J Nutr* **125**(3 Suppl): 777S-783S.
- Barnes, S. (1998). "Evolution of the health benefits of soy isoflavones." *Proc Soc Exp Biol Med* **217**(3): 386-392.
- Barnes, S., Peterson, T. G. and Coward, L. (1995). "Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer." *J Cell Biochem Suppl* **22**: 181-187.
- Barrett, E. L. and Richardson, D. S. (2011). "Sex differences in telomeres and lifespan." *Aging Cell* **10**(6): 913-921.
- Bartke, A., Peluso, M. R., Moretz, N., Wright, C., Bonkowski, M., Winters, T. A., Shanahan, M. F., Kopchick, J. J. and Banz, W. J. (2004). "Effects of Soy-derived diets on plasma and liver lipids, glucose tolerance, and longevity in normal, long-lived and short-lived mice." *Horm Metab Res* **36**(8): 550-558.
- 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.
- Begun, A. Z., Iachine, I. A. and Yashin, A. I. (2000). "Genetic nature of individual frailty: comparison of two approaches." *Twin Res* **3**(1): 51-57.

- Behl, C.,Skutella, T.,Lezoualc'h, F.,Post, A.,Widmann, M.,Newton, C. J. and Holsboer, F. (1997). "Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship." *Mol Pharmacol* **51**(4): 535-541.
- Bennetts, H. W. (1946). "Metaplasia in the sex organs of castrated male sheep maintained on early subterranean clover pastures." *Aust Vet J* **22**(3): 70-78.
- Bennetts, H. W.,Underwood, E. J. and Shier, F. L. (1946). "A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia." *Aust Vet J* **22**: 2-12.
- 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 Radic Biol Med* **19**(1): 77-101.
- Bhathena, S. J. and Velasquez, M. T. (2002). "Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes." *Am J Clin Nutr* **76**(6): 1191-1201.
- Bhattacharya, A.,Leonard, S.,Tardif, S.,Buffenstein, R.,Fischer, K. E.,Richardson, A.,Austad, S. N. and Chaudhuri, A. R. (2011). "Attenuation of liver insoluble protein carbonyls: indicator of a longevity determinant?" *Aging Cell* **10**(4): 720-723.
- Bingham, S. A.,Atkinson, C.,Liggins, J.,Bluck, L. and Coward, A. (1998). "Phytoestrogens: where are we now?" *Br J Nutr* **79**(5): 393-406.
- Bird, R. P. and Draper, H. H. (1984). "Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination." *Methods Enzymol* **105**: 299-305.
- Bjelakovic, G.,Nikolova, D.,Gluud, L. L.,Simonetti, R. G. and Gluud, C. (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis." *Jama* **297**(8): 842-857.
- Blagosklonny, M. V. (2010). "Why men age faster but reproduce longer than women: mTOR and evolutionary perspectives." *Aging (Albany NY)* **2**(5): 265-273.
- Blake, C.,Fabick, K. M.,Setchell, K. D.,Lund, T. D. and Lephart, E. D. (2011). "Neuromodulation by soy diets or equol: anti-depressive & anti-obesity-like influences, age- & hormone-dependent effects." *BMC Neurosci* **12**: 28.
- Bobe, G.,Sansbury, L. B.,Albert, P. S.,Cross, A. J.,Kahle, L.,Ashby, J.,Slattery, M. L.,Caan, B.,Paskett, E.,Iber, F.,Kikendall, J. W.,Lance, P.,Daston, C.,Marshall, J. R.,Schatzkin, A. and Lanza, E. (2008). "Dietary flavonoids and colorectal adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(6): 1344-1353.
- Bokov, A.,Chaudhuri, A. and Richardson, A. (2004). "The role of oxidative damage and stress in aging." *Mech Ageing Dev* **125**(10-11): 811-826.
- Bordone, L. and Guarente, L. (2005). "Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 298-305.
- Borras, C. (2003). *Importancia del estrés oxidativo en la diferencias de longevidad entre machos y hembras*. Valencia, Universidad de Valencia.
- Borras, C.,Gambini, J.,Gomez-Cabrera, M. C.,Sastre, J.,Pallardo, F. V.,Mann, G. E. and Vina, J. (2005). "17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade." *Aging Cell* **4**(3): 113-118.
- Borras, C.,Gambini, J.,Gomez-Cabrera, M. C.,Sastre, J.,Pallardo, F. V.,Mann, G. E. and Vina, J. (2006). "Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of

- antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB." Faseb J **20**(12): 2136-2138.
- Borras, C., Gambini, J., Lopez-Grueso, R., Pallardo, F. V. and Vina, J. (2010). "Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria." Biochim Biophys Acta **1802**(1): 205-211.
- Borras, C., Gambini, J. and Vina, J. (2007). "Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males." Front Biosci **12**: 1008-1013.
- Borras, C., Sastre, J., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F. V. and Vina, J. (2003). "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males." Free Radic Biol Med **34**(5): 546-552.
- Borras, C., Stvolinsky, S., Lopez-Grueso, R., Fedorova, T., Gambini, J., Boldyrev, A. and Vina, J. (2009). "Low in vivo brain glucose consumption and high oxidative stress in accelerated aging." FEBS Lett **583**(13): 2287-2293.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.
- Boveris, A., Oshino, N. and Chance, B. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxyde." Biochem. J. **128**: 617-630.
- Bowey, E., Adlercreutz, H. and Rowland, I. (2003). "Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats." Food Chem Toxicol **41**(5): 631-636.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- 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.
- Brauch, H. and Jordan, V. C. (2009). "Targeting of tamoxifen to enhance antitumour action for the treatment and prevention of breast cancer: the 'personalised' approach?" Eur J Cancer **45**(13): 2274-2283.
- Breen, A. P. and Murphy, J. A. (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Rad. Biol. Med. **18**(6): 1033-1077.
- Brink, E., Coxam, V., Robins, S., Wahala, K., Cassidy, A. and Branca, F. (2008). "Long-term consumption of isoflavone-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism, or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study." Am J Clin Nutr **87**(3): 761-770.
- Brown, N. M. and Setchell, K. D. (2001). "Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones." Lab Invest **81**(5): 735-747.
- Brunet-Rossinni, A. K. (2004). "Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) versus two non-flying mammals." Mech Ageing Dev **125**(1): 11-20.
- Brzezinski, A. and Debi, A. (1999). "Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators?" Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **85**(1): 47-51.
- Burke, S. N. and Barnes, C. A. (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." Nat Rev Neurosci **7**(1): 30-40.
- Cadenas, E. (1989). "Biochemistry of oxygen toxicity." Annu Rev Biochem **58**: 79-110.

- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I. and Stoppani, A. O. M. (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." Arch. Biochem. Biophys. **180**: 248-257.
- Cadenas, E. and Davies, K. J. (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-230.
- Cadenas, E. and Sies, H. (1998). "The lag phase." Free Radic Res **28**(6): 601-609.
- Cardillo, C., Kilcoyne, C. M., Cannon, R. O. I., Quyyumi, A. A. and Panza, J. A. (1997). "Xanthine Oxidase Inhibition With Oxypurinol Improves Endothelial Vasodilator Function in Hypercholesterolemic but Not in Hypertensive Patients." Hypertension **30**: 57-63.
- Carter, M. W., Matrone, G. and Smart, W. W., Jr. (1955). "Effect of genistin on reproduction of the mouse." J Nutr **55**(4): 639-645.
- Cassidy, A., Albertazzi, P., Lise Nielsen, I., Hall, W., Williamson, G., Tetens, I., Atkins, S., Cross, H., Manios, Y., Wolk, A., Steiner, C. and Branca, F. (2006a). "Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women." Proc Nutr Soc **65**(1): 76-92.
- Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K. (1995). "Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products." Br J Nutr **74**(4): 587-601.
- Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K. D. (1994). "Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women." Am J Clin Nutr **60**(3): 333-340.
- Cassidy, A., Brown, J. E., Hawdon, A., Faughnan, M. S., King, L. J., Millward, J., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. and Setchell, K. D. (2006b). "Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods." J Nutr **136**(1): 45-51.
- Castro Mdel, R., Suarez, E., Kraiselburd, E., Isidro, A., Paz, J., Ferder, L. and Ayala-Torres, S. (2012). "Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys." Exp Gerontol **47**(1): 29-37.
- Cederroth, C. R., Vinciguerra, M., Gjcinovci, A., Kuhne, F., Klein, M., Cederroth, M., Caille, D., Suter, M., Neumann, D., James, R. W., Doerge, D. R., Wallimann, T., Meda, P., Foti, M., Rohner-Jeanrenaud, F., Vassalli, J. D. and Nef, S. (2008). "Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism." Diabetes **57**(5): 1176-1185.
- Cederroth, C. R., Vinciguerra, M., Kuhne, F., Madani, R., Doerge, D. R., Visser, T. J., Foti, M., Rohner-Jeanrenaud, F., Vassalli, J. D. and Nef, S. (2007). "A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice." Environ Health Perspect **115**(10): 1467-1473.
- Cohen, L. A., Rose, D. P. and Wynder, E. L. (1993). "A rationale for dietary intervention in postmenopausal breast cancer patients: an update." Nutr Cancer **19**(1): 1-10.
- Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Cruzen, C., Simmons, H. A., Kemnitz, J. W. and Weindruch, R. (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science **325**(5937): 201-204.

- Cousins, S. W., Marin-Castano, M. E., Espinosa-Heidmann, D. G., Alexandridou, A., Striker, L. and Elliot, S. (2003). "Female gender, estrogen loss, and Sub-RPE deposit formation in aged mice." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(3): 1221-1229.
- Coveney, D., Shaw, G. and Renfree, M. B. (2001). "Estrogen-induced gonadal sex reversal in the tammar wallaby." Biol Reprod **65**(2): 613-621.
- Csiszar, A., Labinsky, N., Orosz, Z., Xiangmin, Z., Buffenstein, R. and Ungvari, Z. (2007). "Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(2): H919-927.
- Cuervo, A. M., Bergamini, E., Brunk, U. T., Droge, W., Ffrench, M. and Terman, A. (2005). "Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells." Autophagy **1**(3): 131-140.
- Cui, H., Kong, Y. and Zhang, H. (2012). "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." J Signal Transduct **2012**: 646354.
- Curtis, C., Landis, G. N., Folk, D., Wehr, N. B., Hoe, N., Waskar, M., Abdueva, D., Skvortsov, D., Ford, D., Luu, A., Badrinath, A., Levine, R. L., Bradley, T. J., Tavares, S. and Tower, J. (2007). "Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes." Genome Biol **8**(12): R262.
- Cutler, R. G. (1991). "Antioxidants and aging." Am J Clin Nutr **53**(1 Suppl): 373S-379S.
- Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F. and Nakase, Y. (1979a). "Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals." J Biol Chem **254**(11): 4764-4771.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979b). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol. Rev. **59**: 527-605.
- Chang, A. M. and Halter, J. B. (2003). "Aging and insulin secretion." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(1): E7-12.
- Chaudhuri, A. R., de Waal, E. M., Pierce, A., Van Remmen, H., Ward, W. F. and Richardson, A. (2006). "Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach." Mech Ageing Dev **127**(11): 849-861.
- Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br. Med. Bull. **49**(3): 588-603.
- Chen, J. H., Hales, C. N. and Ozanne, S. E. (2007). "DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?" Nucleic Acids Res **35**(22): 7417-7428.
- Chen, J. Q., Yager, J. D. and Russo, J. (2005). "Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications." Biochim Biophys Acta **1746**(1): 1-17.
- Chen, Z., Siu, B., Ho, Y. S., Vincent, R., Chua, C. C., Hamdy, R. C. and Chua, B. H. (1998). "Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice." J Mol Cell Cardiol **30**(11): 2281-2289.
- Cheng, E., Story, C. D., Yoder, L., Hale, W. H. and Burroughs, W. (1953). "Estrogenic activity of isoflavone derivatives extracted and prepared from soybean oil meal." Science **118**(3058): 164-165.
- Choi, E. J. (2009). "Evaluation of equol function on anti- or prooxidant status in vivo." J Food Sci **74**(2): H65-71.

- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Dai, D. F., Santana, L. F., Vermulst, M., Tomazela, D. M., Emond, M. J., MacCoss, M. J., Gollahon, K., Martin, G. M., Loeb, L. A., Ladiges, W. C. and Rabinovitch, P. S. (2009). "Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging." Circulation **119**(21): 2789-2797.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R. (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clin Chim Acta **329**(1-2): 23-38.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. and Packer, L. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-1205.
- Davies, K. J. A., Delsignore, M. E. and Lin, S. W. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids." J. Biol. Chem. **262**: 9902-9907.
- de Kleijn, M. J., van der Schouw, Y. T., Wilson, P. W., Grobbee, D. E. and Jacques, P. F. (2002). "Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S. women: the Framingham study." J Nutr **132**(2): 276-282.
- de Magalhaes, J. P. (2005). "Open-minded scepticism: inferring the causal mechanisms of human ageing from genetic perturbations." Ageing Res Rev **4**(1): 1-22.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. and Davies, M. J. (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochem J **324 (Pt 1)**: 1-18.
- Dean, R. T., Gieseg, S. and Davies, M. J. (1993). "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins." Trends Biochem Sci **18**(11): 437-441.
- Degen, G. H. (1990). "Interaction of phytoestrogens and other environmental estrogens with prostaglandin synthase in vitro." J Steroid Biochem **35**(3-4): 473-479.
- Deroo, B. J., Hewitt, S. C., Peddada, S. D. and Korach, K. S. (2004). "Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus." Endocrinology **145**(12): 5485-5492.
- Donald, R. and Johns, M. D. (1995). "Mitochondrial DNA and disease." N. Engl. J. Med. **333**: 638-644.
- Doonan, R., McElwee, J. J., Matthijssens, F., Walker, G. A., Houthoofd, K., Back, P., Matscheski, A., Vanfleteren, J. R. and Gems, D. (2008). "Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev **22**(23): 3236-3241.
- Driscoll, I., Howard, S. R., Stone, J. C., Monfils, M. H., Tomanek, B., Brooks, W. M. and Sutherland, R. J. (2006). "The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat." Neuroscience **139**(4): 1173-1185.
- Dumont, M., Wille, E., Stack, C., Calingasan, N. Y., Beal, M. F. and Lin, M. T. (2009). "Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." FASEB J **23**(8): 2459-2466.

- Ennaceur, A. and Delacour, J. (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." Behav Brain Res **31**(1): 47-59.
- Erickson, C. A. and Barnes, C. A. (2003). "The neurobiology of memory changes in normal aging." Exp Gerontol **38**(1-2): 61-69.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. and Zollner, H. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Ettinger, B., Black, D. M., Mitlak, B. H., Knickerbocker, R. K., Nickelsen, T., Genant, H. K., Christiansen, C., Delmas, P. D., Zanchetta, J. R., Stakkestad, J., Gluer, C. C., Krueger, K., Cohen, F. J., Eckert, S., Ensrud, K. E., Avioli, L. V., Lips, P. and Cummings, S. R. (1999). "Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators." JAMA **282**(7): 637-645.
- Farmer, K. J. and Sohal, R. S. (1987). "Effects of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, *Musca domestica*." Exp Gerontol **22**(1): 59-65.
- Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." J. Chem. Soc. Trans. **65**: 899-910.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.
- Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984). "Assays of glutathione peroxidase." Methods Enzymol **105**: 114-121.
- Folman, Y. and Pope, G. S. (1966). "The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compounds of low potency." J Endocrinol **34**(2): 215-225.
- Folman, Y. and Pope, G. S. (1969). "Effect of norethisterone acetate, dimethylstilboestrol, genistein and coumestrol on uptake of [³H]oestradiol by uterus, vagina and skeletal muscle of immature mice." J Endocrinol **44**(2): 213-218.
- Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R. and Schweigerer, L. (1993). "Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2690-2694.
- Fournier, L. R., Ryan Borchers, T. A., Robison, L. M., Wiediger, M., Park, J. S., Chew, B. P., McGuire, M. K., Sclar, D. A., Skaer, T. L. and Beerman, K. A. (2007). "The effects of soy milk and isoflavone supplements on cognitive performance in healthy, postmenopausal women." J Nutr Health Aging **11**(2): 155-164.
- Fowler, M. E. (1983). "Plant poisoning in free-living wild animals: a review." J Wildl Dis **19**(1): 34-43.
- Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P. and Ames, B. N. (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 and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." Am. J. Med. **97**(3A): 5S-13S.
- Frick, K. M. (2009). "Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here?" Horm Behav **55**(1): 2-23.

- Fridovich, I. (1974). "Superoxide Dismutases." *Adv Enzimol* **41**: 35-97.
- Fridovich, I. (1986). Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxigen Toxicity. *Free Radicals and Biology*. W. A. Pryor. New York, Academic Press. **1**: 239-246.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters." *J. Biol. Chem.* **272**(30): 18515-18517.
- Fueger, B. J., Czernin, J., Hildebrandt, I., Tran, C., Halpern, B. S., Stout, D., Phelps, M. E. and Weber, W. A. (2006). "Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice." *J Nucl Med* **47**(6): 999-1006.
- Fujimoto, K., Tanaka, M., Hirao, Y., Nagata, Y., Mori, M., Miyanaga, N., Akaza, H. and Kim, W. J. (2008). "Age-stratified serum levels of isoflavones and proportion of equol producers in Japanese and Korean healthy men." *Prostate Cancer Prostatic Dis* **11**(3): 252-257.
- Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1996). "Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products." *Food Chem Toxicol* **34**(5): 457-461.
- Gil, L., Siems, W., Mazurek, B., Gross, J., Schroeder, P., Voss, P. and Grune, T. (2006). "Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes." *Free Radic Res* **40**(5): 495-505.
- Gilad, G. M. and Gilad, V. H. (1995). "Strain, stress, neurodegeneration and longevity." *Mech Ageing Dev* **78**(2): 75-83.
- Gilani, G. S., Nimal Ratnayake, W. M., Mueller, R. and Mazza, G. (2009). "Effects of source of protein and supplementary extracted isoflavones and anthocyanins on longevity of Stroke-prone Spontaneously Hypertensive (SHRSP) rats." *J Toxicol Sci* **34**(3): 335-341.
- Ginaldi, L., De Martinis, M., D'Ostilio, A., Marini, L., Loreto, M. F., Corsi, M. P. and Quaglino, D. (2000). "Cell proliferation and apoptosis in the immune system in the elderly." *Immunol Res* **21**(1): 31-38.
- Giulivi, C. and Davies, K. J. A. (1993). "Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome." *J. Biol. Chem.* **268**: 8752-8759.
- Gonzalo, S. (2010). "Epigenetic alterations in aging." *J Appl Physiol* **109**(2): 586-597.
- Goren, H. J., Kulkarni, R. N. and Kahn, C. R. (2004). "Glucose homeostasis and tissue transcript content of insulin signaling intermediates in four inbred strains of mice: C57BL/6, C57BLKS/6, DBA/2, and 129X1." *Endocrinology* **145**(7): 3307-3323.
- Green, L. A., Gambhir, S. S., Srinivasan, A., Banerjee, P. K., Hoh, C. K., Cherry, S. R., Sharfstein, S., Barrio, J. R., Herschman, H. R. and Phelps, M. E. (1998). "Noninvasive methods for quantitating blood time-activity curves from mouse PET images obtained with fluorine-18-fluorodeoxyglucose." *J Nucl Med* **39**(4): 729-734.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. and Huber, J. C. (2002). "Production and actions of estrogens." *N Engl J Med* **346**(5): 340-352.
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G. and Siest, G. (1991). "Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood." *Clin Chem* **37**(11): 1932-1937.
- Gutteridge, J. M. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." *Clin Chem* **41**(12 Pt 2): 1819-1828.

- Ha, H.,Hajek, P.,Bedwell, D. M. and Burrows, P. D. (1993). "A mitochondrial porin cDNA predicts the existence of multiple human porins." *J Biol Chem* **268**(16): 12143-12149.
- Haber, F. and Weiss, J. (1934). "The catalitic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." *Proc. R. Soc. London.* **147**: 332-351.
- Hageman, J. J.,Bast, A. and Vermeulen, N. P. (1992). "Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects." *Chem Biol Interact* **82**(3): 243-293.
- 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. (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med* **18**(1): 125-126.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford, Clarendon Press.
- 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.
- Hamilton, M. L.,Van Remmen, H.,Drake, J. A.,Yang, H.,Guo, Z. M.,Kewitt, K.,Walter, C. A. and Richardson, A. (2001). "Does oxidative damage to DNA increase with age?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10469-10474.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* **55**(6): 481-504.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J. Gerontol.* **2**: 298-300.
- Harman, D. (1972). "The biological clock: The mitochondria." *Journal of de American Geriatrics Society.* **20**(4): 145-147.
- Harman, D. (1978). "Free radical theory of aging: Nutritional implications." *Age.* **1**: 145-152.
- Harman, D. (1981). "The aging process." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(11): 7124-7128.
- Harman, D. (2001). "Aging: overview." *Ann N Y Acad Sci* **928**: 1-21.
- Harper, J. M.,Leathers, C. W. and Austad, S. N. (2006). "Does caloric restriction extend life in wild mice?" *Aging Cell* **5**(6): 441-449.
- Harrington, L. A. and Harley, C. B. (1988). "Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*." *Mech Ageing Dev* **43**(1): 71-78.
- Hayflick, L. (1998). "How and why we age." *Exp Gerontol* **33**(7-8): 639-653.
- Hayflick, L. (2000). "The future of ageing." *Nature* **408**(6809): 267-269.
- Hayflick, L. (2004). "The not-so-close relationship between biological aging and age-associated pathologies in humans." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **59**(6): B547-550; discussion 551-543.
- Henderson, V. W.,St John, J. A.,Hodis, H. N.,Kono, N.,McCleary, C. A.,Franke, A. A. and Mack, W. J. (2012). "Long-term soy isoflavone supplementation and cognition in women: a randomized, controlled trial." *Neurology* **78**(23): 1841-1848.

- Hensley, K., Benaksas, E. J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q. N., Stoddard, M. F., Wallis, G., Williamson, K. S., West, M., Wechter, W. J. and Floyd, R. A. (2004). "New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine." *Free Radic Biol Med* **36**(1): 1-15.
- Herrero, A. and Barja, G. (1998). "H₂O₂ production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved." *Mech Ageing Dev* **103**(2): 133-146.
- Higashi, K. and Ogawara, H. (1994). "Daidzein inhibits insulin- or insulin-like growth factor-1-mediated signaling in cell cycle progression of Swiss 3T3 cells." *Biochim Biophys Acta* **1221**(1): 29-35.
- Honore, E. K., Williams, J. K., Anthony, M. S. and Clarkson, T. B. (1997). "Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques." *Fertil Steril* **67**(1): 148-154.
- Hood, D. A., Adhietty, P. J., Colavecchia, M., Gordon, J. W., Irrcher, I., Joseph, A. M., Lowe, S. T. and Rungi, A. A. (2003). "Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway." *Med Sci Sports Exerc* **35**(1): 86-94.
- Horn-Ross, P. L. (1995). "Phytoestrogens, body composition, and breast cancer." *Cancer Causes Control* **6**(6): 567-573.
- Howes, R. M. (2006). "The free radical fantasy: a panoply of paradoxes." *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 22-26.
- Hruszkewycz, A. M. (1992). "Lipid peroxidation and mtDNA degeneration. A hypothesis." *Mutat Res* **275**(3-6): 243-248.
- Hsieh, H. M., Wu, W. M. and Hu, M. L. (2009). "Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose." *Food Chem Toxicol* **47**(3): 625-632.
- Hu, D., Cao, P., Thiels, E., Chu, C. T., Wu, G. Y., Oury, T. D. and Klann, E. (2007). "Hippocampal long-term potentiation, memory, and longevity in mice that overexpress mitochondrial superoxide dismutase." *Neurobiol Learn Mem* **87**(3): 372-384.
- Huang, S. C., Wu, H. M., Shoghi-Jadid, K., Stout, D. B., Chatziioannou, A., Schelbert, H. R. and Barrio, J. R. (2004). "Investigation of a new input function validation approach for dynamic mouse microPET studies." *Mol Imaging Biol* **6**(1): 34-46.
- Huang, T. T., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Shi, Y. and Epstein, C. J. (2000). "Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**(1): B5-9.
- Huang, T. T., Naemuddin, M., Elchuri, S., Yamaguchi, M., Kozy, H. M., Carlson, E. J. and Epstein, C. J. (2006). "Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase." *Hum Mol Genet* **15**(7): 1187-1194.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W. A. (2007). "Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals." *Physiol Rev* **87**(4): 1175-1213.
- Humphries, K. M., Szweda, P. A. and Szweda, L. I. (2006). "Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage." *Free Radic Res* **40**(12): 1239-1243.

- Hwang, Y. W., Kim, S. Y., Jee, S. H., Kim, Y. N. and Nam, C. M. (2009). "Soy food consumption and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies." Nutr Cancer **61**(5): 598-606.
- Ibrahim, W. H., Habib, H. M., Chow, C. K. and Bruckner, G. G. (2008). "Isoflavone-rich soy isolate reduces lipid peroxidation in mouse liver." Int J Vitam Nutr Res **78**(4-5): 217-222.
- Inal, M. E., Kanbak, G. and Sunal, E. (2001). "Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging." Clin Chim Acta **305**(1-2): 75-80.
- Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. and Lopez, D. (1997). "Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer." Lancet **350**(9083): 990-994.
- Ingram, D. K. (1983). "Toward the behavioral assessment of biological aging in the laboratory mouse: concepts, terminology, and objectives." Exp Aging Res **9**(4): 225-238.
- Ingram, D. K. and Reynolds, M. A. (1986). "Assessing the predictive validity of psychomotor tests as measures of biological age in mice." Exp Aging Res **12**(3): 155-162.
- Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A. M., Kira, Y., Imada, I. and Utsumi, K. (2003). "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life." Curr Med Chem **10**(23): 2495-2505.
- Ishii, K., Sasaki, M., Kitagaki, H., Yamaji, S., Sakamoto, S., Matsuda, K. and Mori, E. (1997). "Reduction of cerebellar glucose metabolism in advanced Alzheimer's disease." J Nucl Med **38**(6): 925-928.
- Ishii, N., Senoo-Matsuda, N., Miyake, K., Yasuda, K., Ishii, T., Hartman, P. S. and Furukawa, S. (2004). "Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress." Mech Ageing Dev **125**(1): 41-46.
- Jang, Y. C., Perez, V. I., Song, W., Lustgarten, M. S., Salmon, A. B., Mele, J., Qi, W., Liu, Y., Liang, H., Chaudhuri, A., Ikeno, Y., Epstein, C. J., Van Remmen, H. and Richardson, A. (2009). "Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(11): 1114-1125.
- Jang, Y. M., Kendaiah, S., Drew, B., Phillips, T., Selman, C., Julian, D. and Leeuwenburgh, C. (2004). "Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats." FEBS Lett **577**(3): 483-490.
- Jensen, P. K. (1966). "Antimycin insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles." Biochem. Biophys. Acta. **122**: 157-161.
- Jha, R. and Rizvi, S. I. (2011). "Carbonyl formation in erythrocyte membrane proteins during aging in humans." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(1): 39-42.
- Ji, L. L., Dillon, D. and Wu, E. (1990). "Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver." Am J Physiol **258**(4 Pt 2): R918-923.
- Joannou, G. E., Kelly, G. E., Reeder, A. Y., Waring, M. and Nelson, C. (1995). "A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids." J Steroid Biochem Mol Biol **54**(3-4): 167-184.
- Jordan, V. C. (2004). "Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer." Cancer Cell **5**(3): 207-213.

- Jordan, V. C., Gapstur, S. and Morrow, M. (2001). "Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease." J Natl Cancer Inst **93**(19): 1449-1457.
- Kaeberlein, M., McVey, M. and Guarente, L. (2001). "Using yeast to discover the fountain of youth." Sci Aging Knowledge Environ **2001**(1): pe1.
- Kagan, A., Harris, B. R., Winkelstein, W., Jr., Johnson, K. G., Kato, H., Syme, S. L., Rhoads, G. G., Gay, M. L., Nichaman, M. Z., Hamilton, H. B. and Tillotson, J. (1974). "Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics." J Chronic Dis **27**(7-8): 345-364.
- Kardinaal, A. F., Morton, M. S., Bruggemann-Rotgans, I. E. and van Beresteijn, E. C. (1998). "Phyto-oestrogen excretion and rate of bone loss in postmenopausal women." Eur J Clin Nutr **52**(11): 850-855.
- Karvaj, M., Beno, P. and Fedor-Freybergh, P. G. (2007). "Positive effect of flavonoids to cardiovascular and central nervous system." Neuro Endocrinol Lett **28 Suppl 4**: 1-3.
- 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.
- Kelly, G. E., Joannou, G. E., Reeder, A. Y., Nelson, C. and Waring, M. A. (1995). "The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans." Proc Soc Exp Biol Med **208**(1): 40-43.
- Kenny, A. M., Mangano, K. M., Abourizk, R. H., Bruno, R. S., Anamani, D. E., Kleppinger, A., Walsh, S. J., Prestwood, K. M. and Kerstetter, J. E. (2009). "Soy proteins and isoflavones affect bone mineral density in older women: a randomized controlled trial." Am J Clin Nutr **90**(1): 234-242.
- Kim, H. K., Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M. A., Yang, J. Y., Zhang, W., Duan, J., Hartzell, D. L., Hamrick, M. W. and Baile, C. A. (2006a). "Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice." J Nutr **136**(2): 409-414.
- Kim, J., Herrero, P., Sharp, T., Laforest, R., Rowland, D. J., Tai, Y. C., Lewis, J. S. and Welch, M. J. (2006b). "Minimally invasive method of determining blood input function from PET images in rodents." J Nucl Med **47**(2): 330-336.
- Kim, J., Takahashi, M., Shimizu, T., Shirasawa, T., Kajita, M., Kanayama, A. and Miyamoto, Y. (2008). "Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*." Mech Ageing Dev **129**(6): 322-331.
- Klaunig, J. E. and Kamendulis, L. M. (2004). "The role of oxidative stress in carcinogenesis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 239-267.
- Knight, D. C. and Eden, J. A. (1996). "A review of the clinical effects of phytoestrogens." Obstet Gynecol **87**(5 Pt 2): 897-904.
- Knight, J. A., Smith, S. E., Kinder, V. E. and Pieper, R. K. (1988). "Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography, and determination of reference values for adults." Clin Chem **34**(6): 1107-1110.
- Korde, L. A., Wu, A. H., Fears, T., Nomura, A. M., West, D. W., Kolonel, L. N., Pike, M. C., Hoover, R. N. and Ziegler, R. G. (2009). "Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(4): 1050-1059.

- Korycka-Dahi, M. and Richardson, T. (1981). "Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk." J. Dairy. Sci. **63**: 1181-1208.
- Kowald, A. and Kirkwood, T. B. (1996). "A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process." Mutat Res **316**(5-6): 209-236.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castillo, R. F. and Vercesi, A. E. (2009). "Mitochondria and reactive oxygen species." Free Radic Biol Med **47**(4): 333-343.
- Kreijkamp-Kaspers, S., Kok, L., Grobbee, D. E., de Haan, E. H., Aleman, A., Lampe, J. W. and van der Schouw, Y. T. (2004). "Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial." JAMA **292**(1): 65-74.
- Krinsky, N. (1994). Natural antioxidants in human health and disease. B. Frei. San Diego, Academic Press: 239-262.
- Ku, H. H., Brunk, U. T. and Sohal, R. S. (1993a). "Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species." Free Radic Biol Med **15**(6): 621-627.
- Ku, H. H. and Sohal, R. S. (1993b). "Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential." Mech Ageing Dev **72**(1): 67-76.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." Endocrinology **138**(3): 863-870.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. and Gustafsson, J. A. (1998a). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta." Endocrinology **139**(10): 4252-4263.
- Kuiper, G. G., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I. and Gustafsson, J. A. (1998b). "The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems." Front Neuroendocrinol **19**(4): 253-286.
- Kuzu, N., Metin, K., Dagli, A. F., Akdemir, F., Orhan, C., Yalniz, M., Ozercan, I. H., Sahin, K. and Bahcecioglu, I. H. (2007). "Protective role of genistein in acute liver damage induced by carbon tetrachloride." Mediators Inflamm **2007**: 36381.
- Laforest, R., Sharp, T. L., Engelbach, J. A., Fittig, N. M., Herrero, P., Kim, J., Lewis, J. S., Rowland, D. J., Tai, Y. C. and Welch, M. J. (2005). "Measurement of input functions in rodents: challenges and solutions." Nucl Med Biol **32**(7): 679-685.
- Lambert, A. J., Boysen, H. M., Buckingham, J. A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S. N., Kunz, T. H., Buffenstein, R. and Brand, M. D. (2007). "Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms." Ageing Cell **6**(5): 607-618.
- Lampe, J. W., Karr, S. C., Hutchins, A. M. and Slavin, J. L. (1998). "Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet." Proc Soc Exp Biol Med **217**(3): 335-339.
- Lapointe, J. and Hekimi, S. (2010). "When a theory of aging ages badly." Cell Mol Life Sci **67**(1): 1-8.

- Latour, M. G., Brault, A., Huet, P. M. and Lavoie, J. M. (1999). "Effects of acute physical exercise on hepatocyte volume and function in rat." Am. J. Physiol. **276**: H1258-H1264.
- Lee, C. K., Klopp, R. G., Weindruch, R. and Prolla, T. A. (1999). "Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction." Science **285**(5432): 1390-1393.
- Lee, J. S. (2006). "Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats." Life Sci **79**(16): 1578-1584.
- Lee, Y. B., Lee, H. J. and Sohn, H. S. (2005). "Soy isoflavones and cognitive function." J Nutr Biochem **16**(11): 641-649.
- Lee, Y. B., Lee, K. H., Sohn, H. S., Lee, S. J., Cho, K. H., Kang, I. J., Kim, D. W., Shin, Y. K., Pai, T., Hwang, I. K. and Won, M. H. (2009). "Effects of soy phytoestrogens on reference memory and neuronal cholinergic enzymes in ovariectomized rats." J Med Food **12**(1): 64-70.
- Lee, Y. M., Choi, J. S., Kim, M. H., Jung, M. H., Lee, Y. S. and Song, J. (2006). "Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets." Nutrition **22**(9): 956-964.
- Lenz, E. M. and Wilson, I. D. (2007). "Analytical strategies in metabolomics." J Proteome Res **6**(2): 443-458.
- Lephart, E. D., Porter, J. P., Hedges, D. W., Lund, T. D. and Setchell, K. D. (2004a). "Phytoestrogens: implications in neurovascular research." Curr Neurovasc Res **1**(5): 455-464.
- Lephart, E. D., Porter, J. P., Lund, T. D., Bu, L., Setchell, K. D., Ramoz, G. and Crowley, W. R. (2004b). "Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats." Nutr Metab (Lond) **1**(1): 16.
- Lewisch, S. A. and Levine, R. L. (1995). "Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis." Anal Biochem **231**(2): 440-446.
- Li, F. N., Li, L. L., Yang, H. S., Yuan, X. X., Zhang, B., Geng, M. M., Xiao, C. W. and Yin, Y. L. (2011). "Regulation of soy isoflavones on weight gain and fat percentage: evaluation in a Chinese Guangxi minipig model." Animal **5**(12): 1903-1908.
- Liggins, J., Bluck, L. J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A. and Bingham, S. A. (2000). "Daidzein and genistein contents of vegetables." Br J Nutr **84**(5): 717-725.
- Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T. and Tanaka, M. (1989). "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases." Lancet: 642-645.
- Liochev, S. I. and Fridovich, I. (1994). "The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo." Free Radical Biol. Med. **16**: 29-33.
- 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.
- Lissin, L. W. and Cooke, J. P. (2000). "Phytoestrogens and cardiovascular health." J Am Coll Cardiol **35**(6): 1403-1410.
- Liu, J., Chang, S. K. and Wiesenborn, D. (2005). "Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo." J Agric Food Chem **53**(6): 2333-2340.

- Liu, Z. M., Chen, Y. M. and Ho, S. C. (2011). "Effects of soy intake on glycaemic control: a meta-analysis of randomized controlled trials." *Am J Clin Nutr* **93**(5): 1092-1101.
- Liu, Z. M., Chen, Y. M., Ho, S. C., Ho, Y. P. and Woo, J. (2010). "Effects of soy protein and isoflavones on glycaemic control and insulin sensitivity: a 6-mo double-blind, randomized, placebo-controlled trial in postmenopausal Chinese women with prediabetes or untreated early diabetes." *Am J Clin Nutr* **91**(5): 1394-1401.
- Loessner, A., Alavi, A., Lewandrowski, K. U., Mozley, D., Souder, E. and Gur, R. E. (1995). "Regional cerebral function determined by FDG-PET in healthy volunteers: normal patterns and changes with age." *J Nucl Med* **36**(7): 1141-1149.
- Lopez-Gruoso, R., Borrás, C., Gambini, J. and Vina, J. (2010). "[Aging and ovariectomy cause a decrease in brain glucose consumption in vivo in Wistar rats]." *Rev Esp Geriatr Gerontol* **45**(3): 136-140.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R. and Barja de Quiroga, 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): 655-661.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farrar, a. E. and Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lu, M. P., Wang, R., Song, X., Chibbar, R., Wang, X., Wu, L. and Meng, Q. H. (2008). "Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats." *Nutr Res* **28**(7): 464-471.
- Ma, D. F., Qin, L. Q., Wang, P. Y. and Katoh, R. (2008a). "Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials." *Clin Nutr* **27**(1): 57-64.
- Ma, D. F., Qin, L. Q., Wang, P. Y. and Katoh, R. (2008b). "Soy isoflavone intake inhibits bone resorption and stimulates bone formation in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials." *Eur J Clin Nutr* **62**(2): 155-161.
- Madej, A., Persson, E., Lundh, T. and Ridderstrale, Y. (2002). "Thyroid gland function in ovariectomized ewes exposed to phytoestrogens." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **777**(1-2): 281-287.
- Magee, P. J. and Rowland, I. R. (2004). "Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer." *Br J Nutr* **91**(4): 513-531.
- Mahn, K., Borrás, C., Knock, G. A., Taylor, P., Khan, I. Y., Sugden, D., Poston, L., Ward, J. P., Sharpe, R. M., Vina, J., Aaronson, P. I. and Mann, G. E. (2005). "Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo." *Faseb J* **19**(12): 1755-1757.
- Manzoni, M. S., Rossi, E. A., Carlos, I. Z., Vendramini, R. C., Duarte, A. C. and Damaso, A. R. (2005). "Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats." *Nutrition* **21**(10): 1018-1024.
- Markovits, J., Junqua, S., Goldwasser, F., Venuat, A. M., Luccioni, C., Beaumatin, J., Saucier, J. M., Bernheim, A. and Jacquemin-Sablon, A. (1995). "Genistein resistance in human leukaemic CCRF-CEM cells: selection of a diploid cell line

- with reduced DNA topoisomerase II beta isoform." *Biochem Pharmacol* **50**(2): 177-186.
- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J. M., Le Pecq, J. B. and Larsen, A. K. (1989). "Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II." *Cancer Res* **49**(18): 5111-5117.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C. (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." *J Nutr Biochem* **16**(10): 577-586.
- Mates, J. M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clin Biochem* **32**(8): 595-603.
- Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., Flores, I., Garcia-Cao, I., Borrás, C., Flores, J. M., Vina, J., Blasco, M. A. and Serrano, M. (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway." *Nature* **448**(7151): 375-379.
- Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satomi, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., Nishino, H. and Aoiike, A. (1993). "Genistein arrests cell cycle progression at G2-M." *Cancer Res* **53**(6): 1328-1331.
- Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L., Longo, D. L., Allison, D. B., Young, J. E., Bryant, M., Barnard, D., Ward, W. F., Qi, W., Ingram, D. K. and de Cabo, R. (2012). "Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study." *Nature* **489**(7415): 318-321.
- McCall, M. R. and Frei, B. (1999). "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?" *Free Radic Biol Med* **26**(7-8): 1034-1053.
- Medvedev, Z. (1990). "An attempt at a rational classification of theories of aging." *Biological REviews of the Cambridge Philosophical Society* **65**: 375-398.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallace, D. C., Malfroy, B., Doctrow, S. R. and Lithgow, G. J. (2000). "Extension of lifespan with superoxide dismutase/catalase mimetics." *Science* **289**(5484): 1567-1569.
- Mendelson, C. R., Evans, C. T. and Simpson, E. R. (1987). "Regulation of aromatase in estrogen-producing cells." *J Steroid Biochem* **27**(4-6): 753-757.
- Merz-Demlow, B. E., Duncan, A. M., Wangen, K. E., Xu, X., Carr, T. P., Phipps, W. R. and Kurzer, M. S. (2000). "Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women." *Am J Clin Nutr* **71**(6): 1462-1469.
- Messina, M. (2010). "Soybean isoflavone exposure does not have feminizing effects on men: a critical examination of the clinical evidence." *Fertil Steril* **93**(7): 2095-2104.
- Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D. and Barnes, S. (1994). "Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data." *Nutr Cancer* **21**(2): 113-131.
- Mezei, O., Banz, W. J., Steger, R. W., Peluso, M. R., Winters, T. A. and Shay, N. (2003). "Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells." *J Nutr* **133**(5): 1238-1243.
- Miksicek, R. J. (1995). "Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity." *Proc Soc Exp Biol Med* **208**(1): 44-50.

- Miksicek, R. J., Lee, C., Topp-Rapiejko, K. and Neff, S. (1995). "Inhibition of nuclear transport is not essential for inhibition of receptor function by the type II estrogen antagonist ICI-164,384." Ann N Y Acad Sci **761**: 361-364.
- Minelli, C., Abrams, K. R., Sutton, A. J. and Cooper, N. J. (2004). "Benefits and harms associated with hormone replacement therapy: clinical decision analysis." BMJ **328**(7436): 371.
- Miquel, J. and Blasco, M. (1978). "A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor." Exp Gerontol **13**(6): 389-396.
- Miquel, J. and Economos, A. C. (1979). "Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice." Exp Gerontol **14**(5): 279-285.
- Miquel, J., Economos, A. C., Fleming, J. and Johnson, J. E. J. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." Exp. Gerontol. **15**: 579-591.
- 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.
- Miwa, S., Riyahi, K., Partridge, L. and Brand, M. D. (2004). "Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*." Ann N Y Acad Sci **1019**: 388-391.
- Mockett, R. J., Sohal, B. H. and Sohal, R. S. (2010). "Expression of multiple copies of mitochondrially targeted catalase or genomic Mn superoxide dismutase transgenes does not extend the life span of *Drosophila melanogaster*." Free Radic Biol Med **49**(12): 2028-2031.
- Modi, H. R., Katyare, S. S. and Patel, M. A. (2008). "Ageing-induced alterations in lipid/phospholipid profiles of rat brain and liver mitochondria: implications for mitochondrial energy-linked functions." J Membr Biol **221**(1): 51-60.
- Monteiro, S. C., de Mattos, C. B., Ben, J., Netto, C. A. and Wyse, A. T. (2008). "Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet." Metab Brain Dis **23**(3): 243-253.
- Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R. and Squadrito, F. (2002). "Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study." J Bone Miner Res **17**(10): 1904-1912.
- Morton, M. S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L. D. and Evans, B. A. (2002). "Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age." J Nutr **132**(10): 3168-3171.
- Mosconi, L., De Santi, S., Li, J., Tsui, W. H., Li, Y., Boppana, M., Laska, E., Rusinek, H. and de Leon, M. J. (2008a). "Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging." Neurobiol Aging **29**(5): 676-692.
- Mosconi, L., Tsui, W. H., Herholz, K., Pupi, A., Drzezga, A., Lucignani, G., Reiman, E. M., Holthoff, V., Kalbe, E., Sorbi, S., Diehl-Schmid, J., Perneczky, R., Clerici, F., Caselli, R., Beuthien-Baumann, B., Kurz, A., Minoshima, S. and de Leon, M. J. (2008b). "Multicenter standardized 18F-FDG PET diagnosis of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and other dementias." J Nucl Med **49**(3): 390-398.

- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A. and Van Remmen, H. (2007). "Trends in oxidative aging theories." Free Radic Biol Med **43**(4): 477-503.
- Murkies, A. (1998). "Phytoestrogens--what is the current knowledge?" Aust Fam Physician **27 Suppl 1**: S47-51.
- Murkies, A. L., Wilcox, G. and Davis, S. R. (1998). "Clinical review 92: Phytoestrogens." J Clin Endocrinol Metab **83**(2): 297-303.
- Mutlu-Turkoglu, U., Ilhan, E., Oztezcan, S., Kuru, A., Aykac-Toker, G. and Uysal, M. (2003). "Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects." Clin Biochem **36**(5): 397-400.
- Nagai, M., Takahashi, R. and Goto, S. (2000). "Dietary restriction initiated late in life can reduce mitochondrial protein carbonyls in rat livers: western blot studies." BioGerontology **1**(4): 321-328.
- Nanri, A., Mizoue, T., Takahashi, Y., Kirii, K., Inoue, M., Noda, M. and Tsugane, S. (2010). "Soy product and isoflavone intakes are associated with a lower risk of type 2 diabetes in overweight Japanese women." J Nutr **140**(3): 580-586.
- Navarro, A. and Boveris, A. (2004a). "Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(5): R1244-1249.
- Navarro, A. and Boveris, A. (2007). "The mitochondrial energy transduction system and the aging process." Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): C670-686.
- Navarro, A., Gomez, C., Lopez-Cepero, J. M. and Boveris, A. (2004b). "Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(3): R505-511.
- Naylor, E. C., Watson, R. E. and Sherratt, M. J. (2011). "Molecular aspects of skin ageing." Maturitas **69**(3): 249-256.
- Naziroglu, M. and Butterworth, P. J. (2005). "Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes." Can J Appl Physiol **30**(2): 172-185.
- Nielsen, I. L. and Williamson, G. (2007). "Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans." Nutr Cancer **57**(1): 1-10.
- Nilsen, J., Chen, S., Irwin, R. W., Iwamoto, S. and Brinton, R. D. (2006). "Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function." BMC Neurosci **7**: 74.
- Nohl, H., Gille, L. and Staniek, K. (2005). "Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria." Biochem Pharmacol **69**(5): 719-723.
- Nohl, H. and Hegner, D. (1978). "Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?" Eur J Biochem **82**(2): 563-567.
- Okamoto, H. (1985). "Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans." Bioassays **2**: 15-21.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S. and Stadtman, E. R. (1987). "Age-related changes in oxidized proteins." J Biol Chem **262**(12): 5488-5491.
- Orr, W. C. and Sohal, R. S. (1993). "Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*." Arch Biochem Biophys **301**(1): 34-40.

- Orr, W. C. and Sohal, R. S. (1994). "Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*." Science **263**(5150): 1128-1130.
- Osborne, C. K., Schiff, R., Fuqua, S. A. and Shou, J. (2001). "Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation." Clin Cancer Res **7**(12 Suppl): 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
- Pacifi, R. E. and Davis, K. J. (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." Gerontology **37**: 166-180.
- Paganini-Hill, A. (1996). "Estrogen replacement therapy in the elderly." Zentralbl Gynakol **118**(5): 255-261.
- Page, M. M., Richardson, J., Wiens, B. E., Tiedtke, E., Peters, C. W., Faure, P. A., Burness, G. and Stuart, J. A. (2010). "Antioxidant enzyme activities are not broadly correlated with longevity in 14 vertebrate endotherm species." Age (Dordr) **32**(2): 255-270.
- Palmieri, C., Cheng, G. J., Saji, S., Zelada-Hedman, M., Warri, A., Weihua, Z., Van Noorden, S., Wahlstrom, T., Coombes, R. C., Warner, M. and Gustafsson, J. A. (2002). "Estrogen receptor beta in breast cancer." Endocr Relat Cancer **9**(1): 1-13.
- Pan, Y., Anthony, M. and Clarkson, T. B. (1999). "Evidence for up-regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA by soy phytoestrogens in the frontal cortex of retired breeder female rats." Neurosci Lett **261**(1-2): 17-20.
- Pansarasa, O., Bertorelli, L., Vecchiet, J., Felzani, G. and Marzatico, F. (1999). "Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle." Free Radic Biol Med **27**(5-6): 617-622.
- Pappas, P., Stephanou, P., Vasiliou, V. and Marselos, M. (1998). "Zoxazolamine-induced paralysis in two rat substrains: differences in hepatic drug metabolism." Eur J Drug Metab Pharmacokinet **23**(4): 461-467.
- Park, C. E., Yun, H., Lee, E. B., Min, B. I., Bae, H., Choe, W., Kang, I., Kim, S. S. and Ha, J. (2010). "The antioxidant effects of genistein are associated with AMP-activated protein kinase activation and PTEN induction in prostate cancer cells." J Med Food **13**(4): 815-820.
- Park, D., Huang, T. and Frishman, W. H. (2005). "Phytoestrogens as cardioprotective agents." Cardiol Rev **13**(1): 13-17.
- Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P. and Boulianne, G. L. (1998). "Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons." Nat Genet **19**(2): 171-174.
- Patel, R. P., Boersma, B. J., Crawford, J. H., Hogg, N., Kirk, M., Kalyanaraman, B., Parks, D. A., Barnes, S. and Darley-Usmar, V. (2001). "Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxyl radical scavenging." Free Radic Biol Med **31**(12): 1570-1581.
- Penza, M., Montani, C., Romani, A., Vignolini, P., Pampaloni, B., Tanini, A., Brandi, M. L., Alonso-Magdalena, P., Nadal, A., Ottobrini, L., Parolini, O., Bignotti, E., Calza, S., Maggi, A., Grigolato, P. G. and Di Lorenzo, D. (2006). "Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner." Endocrinology **147**(12): 5740-5751.

- Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C. and 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): 149-158.
- Perez, V. I., Bokov, A., Van Remmen, H., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y. and Richardson, A. (2009a). "Is the oxidative stress theory of aging dead?" *Biochim Biophys Acta* **1790**(10): 1005-1014.
- Perez, V. I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C. J., Vijg, J. and Richardson, A. (2009b). "The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice." *Aging Cell* **8**(1): 73-75.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." *Anal Biochem* **83**(2): 346-356.
- Phillips, J. P., Campbell, S. D., Michaud, D., Charbonneau, M. and Hilliker, A. J. (1989). "Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2761-2765.
- Poon, H. F., Calabrese, V., Scapagnini, G. and Butterfield, D. A. (2004). "Free radicals and brain aging." *Clin Geriatr Med* **20**(2): 329-359.
- Potter, S. M. (1995). "Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy." *J Nutr* **125**(3 Suppl): 606S-611S.
- Quick, K. L., Ali, S. S., Arch, R., Xiong, C., Wozniak, D. and Dugan, L. L. (2008). "A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice." *Neurobiol Aging* **29**(1): 117-128.
- Raines, E. W. and Ross, R. (1995). "Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy." *J Nutr* **125**(3 Suppl): 624S-630S.
- Rasgon, N. L., Silverman, D., Siddarth, P., Miller, K., Ercoli, L. M., Elman, S., Lavretsky, H., Huang, S. C., Phelps, M. E. and Small, G. W. (2005). "Estrogen use and brain metabolic change in postmenopausal women." *Neurobiol Aging* **26**(2): 229-235.
- 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): 307-319.
- Requena, J. R., Levine, R. L. and Stadtman, E. R. (2003). "Recent advances in the analysis of oxidized proteins." *Amino Acids* **25**(3-4): 221-226.
- Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J. (1996). "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food." *Biochem Soc Trans* **24**(3): 790-795.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. and Pridham, J. B. (1995). "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids." *Free Radic Res* **22**(4): 375-383.
- Rice, S. and Whitehead, S. A. (2008). "Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* **108**(3-5): 186-195.
- Rickwood, R., Wilson, M. T. and Darley-Usmar, V. M. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. *Mitochondria, a practical approach*. R. Rickwood, M. T. Wilson and V. M. Darley-Usmar, Ed. IRL Press, Ltd. Reino Unido.: 1-16.

- Richter, C., Park, J. W. and Ames, B. N. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc. Natl. Acad. Sci. **85**: 6465-6467.
- Robertson, D. G. (2005). "Metabonomics in toxicology: a review." Toxicol Sci **85**(2): 809-822.
- Robertson, D. G., Reily, M. D. and Baker, J. D. (2005). "Metabonomics in preclinical drug development." Expert Opin Drug Metab Toxicol **1**(3): 363-376.
- Robinson, D., Kawamura, T., Hinohara, S., Sakamoto, Y. and Takahashi, T. (1995). "Levels of cardiovascular risk factors in Japanese people living in the UK." J Cardiovasc Risk **2**(5): 449-458.
- Rohrdanz, E., Ohler, S., Tran-Thi, Q. H. and Kahl, R. (2002). "The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells." J Nutr **132**(3): 370-375.
- Rosenzweig, E. S. and Barnes, C. A. (2003). "Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition." Prog Neurobiol **69**(3): 143-179.
- Ross, R. K., Bernstein, L., Lobo, R. A., Shimizu, H., Stanczyk, F. Z., Pike, M. C. and Henderson, B. E. (1992). "5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males." Lancet **339**(8798): 887-889.
- Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., Kotchen, J. M. and Ockene, J. (2002). "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): 321-333.
- Roth, G. S., Mattison, J. A., Ottinger, M. A., Chachich, M. E., Lane, M. A. and Ingram, D. K. (2004). "Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions." Science **305**(5689): 1423-1426.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., Williamson, G. and Cassidy, A. (2003). "Bioavailability of phyto-oestrogens." Br J Nutr **89** Suppl 1: S45-58.
- Rowland, I., Wiseman, H., Sanders, T., Adlercreutz, H. and Bowey, E. (1999). "Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora." Biochem Soc Trans **27**(2): 304-308.
- Rowland, I. R., Wiseman, H., Sanders, T. A., Adlercreutz, H. and Bowey, E. A. (2000). "Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora." Nutr Cancer **36**(1): 27-32.
- Ruan, H., Tang, X. D., Chen, M. L., Joiner, M. L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H., Iverson, L., Wu, C. F. and Hoshi, T. (2002). "High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2748-2753.
- Ruiz-Larrea, M. B., Garrido, M. J. and Lacort, M. (1993). "Estradiol-induced effects on glutathione metabolism in rat hepatocytes." J Biochem (Tokyo) **113**(5): 563-567.
- Ruiz-Larrea, M. B., Leal, A. M., Martin, C., Martinez, R. and Lacort, M. (1997). "Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes." Rev Esp Fisiol **53**(2): 225-229.

- Sabaretnam, T., Kritharides, L., O'Reilly, J. N. and Le Couteur, D. G. (2010). "The effect of aging on the response of isolated hepatocytes to hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide." *Toxicol In Vitro* **24**(1): 123-128.
- Sacheck, J. M., Milbury, P. E., Cannon, J. G., Roubenoff, R. and Blumberg, J. B. (2003). "Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men." *Free Radic Biol Med* **34**(12): 1575-1588.
- Salmon, A. B., Richardson, A. and Perez, V. I. (2010). "Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?" *Free Radic Biol Med* **48**(5): 642-655.
- Sanz, A., Caro, P., Sanchez, J. G. and Barja, G. (2006a). "Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage." *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 200-209.
- Sanz, A., Gomez, J., Caro, P. and Barja, G. (2006b). "Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage." *J Bioenerg Biomembr* **38**(5-6): 327-333.
- Sanz, A., Hiona, A., Kujoth, G. C., Seo, A. Y., Hofer, T., Kouwenhoven, E., Kalani, R., Prolla, T. A., Barja, G. and Leeuwenburgh, C. (2007). "Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice." *Exp Gerontol* **42**(3): 173-182.
- Sastre, J., Asensi, M., Gascó, E., Pallardó, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T. and Viña, J. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." *Am. J. Physiol.* **263**: R992-R995.
- Sastre, J., Millan, A., Garcia de la Asuncion, J., Pla, R., Juan, G., Pallardo, O'Connor, E., Martin, J. A., Droy-Lefaix, M. T. and Vina, J. (1998). "A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **24**(2): 298-304.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., Garcia de la Asuncion, J. and Vina, J. (2000). "Mitochondria, oxidative stress and aging." *Free Radic Res* **32**(3): 189-198.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., Pla, R., Pellin, A., Juan, G., O'Connor, J. E., Estrela, J. M., Miquel, J. and Vina, J. (1996). "Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes." *Hepatology* **24**(5): 1199-1205.
- Sastre, J., Pallardo, F. V. and Vina, J. (2003). "The role of mitochondrial oxidative stress in aging." *Free Radic Biol Med* **35**(1): 1-8.
- 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, Ed. Plenum Press.: 11-20.
- Schiffer, W. K., Mirrione, M. M. and Dewey, S. L. (2007). "Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with ^{18}F -FDG in rodents." *J Nucl Med* **48**(2): 277-287.
- Schreck, R. and Baeuerle, P. A. (1994). "Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B." *Methods Enzymol* **234**: 151-163.
- Setchell, K. D. (2000). "Absorption and metabolism of soy isoflavones—from food to dietary supplements and adults to infants." *J Nutr* **130**(3): 654S-655S.

- Setchell, K. D. (2001). "Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs)." *J Am Coll Nutr* **20**(5 Suppl): 354S-362S; discussion 381S-383S.
- Setchell, K. D., Borriello, S. P., Hulme, P., Kirk, D. N. and Axelson, M. (1984). "Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease." *Am J Clin Nutr* **40**(3): 569-578.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A. and Heubi, J. E. (2001). "Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements." *J Nutr* **131**(4 Suppl): 1362S-1375S.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P. B., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B., Jakate, A. S., Creutzinger, V. and Heubi, J. E. (2003). "Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes." *J Nutr* **133**(4): 1027-1035.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zhao, X., Lindley, S. L., Heubi, J. E., King, E. C. and Messina, M. J. (2011). "Soy isoflavone phase II metabolism differs between rodents and humans: implications for the effect on breast cancer risk." *Am J Clin Nutr* **94**(5): 1284-1294.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S. and Heubi, J. E. (2002). "Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability." *Am J Clin Nutr* **76**(2): 447-453.
- Setchell, K. D. and Cassidy, A. (1999). "Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health." *J Nutr* **129**(3): 758S-767S.
- Setchell, K. D., Clerici, C., Lephart, E. D., Cole, S. J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B. E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N. M., Lund, T. D., Handa, R. J. and Heubi, J. E. (2005). "S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora." *Am J Clin Nutr* **81**(5): 1072-1079.
- Setchell, K. D. and Cole, S. J. (2006). "Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians." *J Nutr* **136**(8): 2188-2193.
- Setchell, K. D., Gosselin, S. J., Welsh, M. B., Johnston, J. O., Balistreri, W. F., Kramer, L. W., Dresser, B. L. and Tarr, M. J. (1987). "Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs." *Gastroenterology* **93**(2): 225-233.
- Sevanian, A., Davies, K. and Hochstein, P. (1985). "Conservation of vitamin C by uric acid in blood." *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**: 117-124.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M. and Barnes, S. (1997). "Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats." *J Nutr* **127**(7): 1260-1268.
- Shemesh, M., Lindner, H. R. and Ayalon, N. (1972). "Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phyto-oestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol." *J Reprod Fertil* **29**(1): 1-9.
- Shen, C. C., Wertelecki, W., Driggers, W. J., LeDoux, S. P. and Wilson, G. L. (1995). "Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells." *Mutat Res* **337**(1): 19-23.
- Shen, X., Liu, H., Hu, Z., Hu, H. and Shi, P. (2012). "The Relationship between Cerebral Glucose Metabolism and Age: Report of a Large Brain PET Data Set." *PLoS One* **7**(12): e51517.

- Shibamura, A., Ikeda, T. and Nishikawa, Y. (2009). "A method for oral administration of hydrophilic substances to *Caenorhabditis elegans*: Effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan." Mech Ageing Dev **130**(9): 652-655.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. and Ames, B. N. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 10771-10778.
- Shim, J. Y., Kim, K. O., Seo, B. H. and Lee, H. S. (2007). "Soybean isoflavone extract improves glucose tolerance and raises the survival rate in streptozotocin-induced diabetic rats." Nutr Res Pract **1**(4): 266-272.
- Shimoji, K., Ravasi, L., Schmidt, K., Soto-Montenegro, M. L., Esaki, T., Seidel, J., Jagoda, E., Sokoloff, L., Green, M. V. and Eckelman, W. C. (2004). "Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with 18F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling." J Nucl Med **45**(4): 665-672.
- Sho, H. (2001). "History and characteristics of Okinawan longevity food." Asia Pac J Clin Nutr **10**(2): 159-164.
- Shoff, S. M., Newcomb, P. A., Mares-Perlman, J. A., Klein, B. E., Haffner, S. M., Storer, B. E. and Klein, R. (1998). "Usual consumption of plant foods containing phytoestrogens and sex hormone levels in postmenopausal women in Wisconsin." Nutr Cancer **30**(3): 207-212.
- Shu, X. O., Zheng, Y., Cai, H., Gu, K., Chen, Z., Zheng, W. and Lu, W. (2009). "Soy food intake and breast cancer survival." JAMA **302**(22): 2437-2443.
- Sierens, J., Hartley, J. A., Campbell, M. J., Leatham, A. J. and Woodside, J. V. (2001). "Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay." Mutat Res **485**(2): 169-176.
- Sies, H. (1983). Biochemistry of oxidative stress. Glutathione: storage, transport and turnover in mammals. S. Y., T. Higashi and N. Tateishi, Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrecht.: 63-69.
- Sies, H. (1985). "Oxidative stress: introductory remarks." Oxidative Stress (H. Sies, ed.) Academic Press, London.
- Sies, H. and Stahl, W. (1995). "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants." Am J Clin Nutr **62**(6 Suppl): 1315S-1321S.
- Skulachev, V. P. (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants." Quat. Rev. Biophys **29**: 169-202.
- Slater, T. F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." Biochem. J. **222**: 1-15.
- Small, G. W. (2006). "Diagnostic issues in dementia: neuroimaging as a surrogate marker of disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **19**(3): 180-185.
- Small, G. W., Bookheimer, S. Y., Thompson, P. M., Cole, G. M., Huang, S. C., Kepe, V. and Barrio, J. R. (2008). "Current and future uses of neuroimaging for cognitively impaired patients." Lancet Neurol **7**(2): 161-172.
- Sohal, R. S. (1991). "Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging." Mech Ageing Dev **60**(2): 189-198.
- Sohal, R. S. (2002). "Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process." Free Radic Biol Med **33**(1): 37-44.
- Sohal, R. S., Arnold, L. and Orr, W. C. (1990a). "Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material,

- GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*." Mech Ageing Dev **56**(3): 223-235.
- Sohal, R. S. and Dubey, A. (1994a). "Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging." Free Radic Biol Med **16**(5): 621-626.
- Sohal, R. S., Ku, H. H. and Agarwal, S. (1993). "Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species." Biochem Biophys Res Commun **196**(1): 7-11.
- Sohal, R. S., Ku, H. H., Agarwal, S., Forster, M. J. and Lal, H. (1994b). "Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse." Mech Ageing Dev **74**(1-2): 121-133.
- 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., Sohal, B. H. and Orr, W. C. (1995). "Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies." Free Radic Biol Med **19**(4): 499-504.
- Sohal, R. S., Svensson, I. and Brunk, U. T. (1990b). "Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species." Mech Ageing Dev **53**(3): 209-215.
- Sohal, R. S. and Weindruch, R. (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." Science **273**(5271): 59-63.
- Solanky, K. S., Bailey, N. J., Beckwith-Hall, B. M., Bingham, S., Davis, A., Holmes, E., Nicholson, J. K. and Cassidy, A. (2005). "Biofluid 1H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans." J Nutr Biochem **16**(4): 236-244.
- Song, L. H., Yan, H. L. and Cai, D. L. (2006). "Protective effects of soybean isoflavone against gamma-irradiation induced damages in mice." J Radiat Res **47**(2): 157-165.
- Spiteller, G. (2002). "Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process?" Ann N Y Acad Sci **959**: 30-44.
- Stadtman, E. R. (1990). "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences." Free Rad. Biol. Med **9**(4): 315-325.
- Stadtman, E. R. (1992). "Protein oxidation and ageing." Science **257**: 1220-1224.
- Stadtman, E. R. (2006). "Protein oxidation and aging." Free Radic Res **40**(12): 1250-1258.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L. (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." Amino Acids **25**(3-4): 207-218.
- Strehler, B. L. (1985). "Aging: a challenge to science, society, and the individual." Clin Geriatr Med **1**(1): 5-13.
- Subbiah, M. T., Kessel, B., Agrawal, M., Rajan, R., Abplanalp, W. and Rymaszewski, Z. (1993). "Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation." J Clin Endocrinol Metab **77**(4): 1095-1097.
- Sugioka, K., Shimosegawa, Y. and Nakano, M. (1987). "Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation." FEBS Lett **210**(1): 37-39.
- Sun, J., Folk, D., Bradley, T. J. and Tower, J. (2002). "Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*." Genetics **161**(2): 661-672.

- Sun, J., Molitor, J. and Tower, J. (2004). "Effects of simultaneous over-expression of Cu/ZnSOD and MnSOD on *Drosophila melanogaster* life span." *Mech Ageing Dev* **125**(5): 341-349.
- Sunita, P. and Pattanayak, S. P. (2011). "Phytoestrogens in postmenopausal indications: A theoretical perspective." *Pharmacogn Rev* **5**(9): 41-47.
- Suter, M. and Richter, C. (1999). "Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases." *Biochemistry* **38**(1): 459-464.
- Suzuki, M., Wilcox, B. J. and Wilcox, C. D. (2001). "Implications from and for food cultures for cardiovascular disease: longevity." *Asia Pac J Clin Nutr* **10**(2): 165-171.
- Sverko, V., Balog, T., Sobocanec, S., Gavella, M. and Marotti, T. (2002). "Age-associated alteration of lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in CBA and AKR mice." *Exp Gerontol* **37**(8-9): 1031-1039.
- Sverko, V., Sobocanec, S., Balog, T. and Marotti, T. (2004). "Age and gender differences in antioxidant enzyme activity: potential relationship to liver carcinogenesis in male mice." *Biogerontology* **5**(4): 235-242.
- Swan, P. B. (1997). "To live longer, eat less! (McCay, 1934-1939)." *J Nutr* **127**(5 Suppl): 1039S-1041S.
- Takada, A., Neil, J. and Matsuda, Y. (1982). "Clinicopathological study of alcoholic fibrosis." *American Journal of Gastroenterology* **77**: 660-666.
- Tanase, K., Teng, Q., Krishnaney, A. A., Liu, J. K., Garrity-Moses, M. E. and Boulis, N. M. (2004). "Cervical spinal cord delivery of a rabies G protein pseudotyped lentiviral vector in the SOD-1 transgenic mouse. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2004." *J Neurosurg Spine* **1**(1): 128-136.
- Taylor, H. S. (2009). "Designing the ideal selective estrogen receptor modulator--an achievable goal?" *Menopause* **16**(3): 609-615.
- Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E. A. and Brunk, U. T. (2010). "Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging." *Antioxid Redox Signal* **12**(4): 503-535.
- Tew, B. Y., Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A. and Hendrich, S. (1996). "A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women." *J Nutr* **126**(4): 871-877.
- Thanos, J., Cotterchio, M., Boucher, B. A., Kreiger, N. and Thompson, L. U. (2006). "Adolescent dietary phytoestrogen intake and breast cancer risk (Canada)." *Cancer Causes Control* **17**(10): 1253-1261.
- Thorp, A. A., Sinn, N., Buckley, J. D., Coates, A. M. and Howe, P. R. (2009). "Soya isoflavone supplementation enhances spatial working memory in men." *Br J Nutr* **102**(9): 1348-1354.
- Tikkanen, M. J., Wahala, K., Ojala, S., Vihma, V. and Adlercreutz, H. (1998). "Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 3106-3110.
- Tikunov, A. P., Johnson, C. B., Lee, H., Stoskopf, M. K. and Macdonald, J. M. (2010). "Metabolomic investigations of American oysters using H-NMR spectroscopy." *Mar Drugs* **8**(10): 2578-2596.

- Toyomura, K. and Kono, S. (2002). "Soybeans, Soy Foods, Isoflavones and Risk of Colorectal Cancer: a Review of Experimental and Epidemiological Data." Asian Pac J Cancer Prev **3**(2): 125-132.
- Traganos, F.,Ardelt, B.,Halko, N.,Bruno, S. and Darzynkiewicz, Z. (1992). "Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells." Cancer Res **52**(22): 6200-6208.
- Travis, R. C.,Spencer, E. A.,Allen, N. E.,Appleby, P. N.,Roddam, A. W.,Overvad, K.,Johnsen, N. F.,Olsen, A.,Kaaks, R.,Linseisen, J.,Boeing, H.,Nothlings, U.,Bueno-de-Mesquita, H. B.,Ros, M. M.,Sacerdote, C.,Palli, D.,Tumino, R.,Berrino, F.,Trichopoulou, A.,Dilis, V.,Trichopoulos, D.,Chirlaque, M. D.,Ardanaz, E.,Larranaga, N.,Gonzalez, C.,Suarez, L. R.,Sanchez, M. J.,Bingham, S.,Khaw, K. T.,Hallmans, G.,Stattin, P.,Rinaldi, S.,Slimani, N.,Jenab, M.,Riboli, E. and Key, T. J. (2009). "Plasma phyto-oestrogens and prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." Br J Cancer **100**(11): 1817-1823.
- Uehar, M.,Arai, Y.,Watanabe, S. and Adlercreutz, H. (2000). "Comparison of plasma and urinary phytoestrogens in Japanese and Finnish women by time-resolved fluoroimmunoassay." Biofactors **12**(1-4): 217-225.
- Utian, W. H. (1973). "Comparative trial of P1496, a new non-steroidal oestrogen analogue." Br Med J **1**(5853): 579-581.
- Valko, M.,Rhodes, C. J.,Moncol, J.,Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- Vedavanam, K.,Srijayanta, S.,O'Reilly, J.,Raman, A. and Wiseman, H. (1999). "Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE)." Phytother Res **13**(7): 601-608.
- Velasquez, M. T. and Bhatena, S. J. (2007). "Role of dietary soy protein in obesity." Int J Med Sci **4**(2): 72-82.
- Verdeal, K.,Brown, R. R.,Richardson, T. and Ryan, D. S. (1980). "Affinity of phytoestrogens for estradiol-binding proteins and effect of coumestrol on growth of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors." J Natl Cancer Inst **64**(2): 285-290.
- Viguie, C. A.,Frei, B.,Shigenaga, M. K.,Ames, B. N.,Packer, L. and Brooks, G. A. (1993). "Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise." J Appl Physiol **75**(2): 566-572.
- Villegas, R.,Gao, Y. T.,Yang, G.,Li, H. L.,Elasy, T. A.,Zheng, W. and Shu, X. O. (2008). "Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai Women's Health Study." Am J Clin Nutr **87**(1): 162-167.
- Vina, J.,Borras, C.,Gambini, J.,Sastre, J. and Pallardo, F. V. (2005a). "Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones." Sci Aging Knowledge Environ **2005**(23): pe17.
- Vina, J.,Borras, C.,Gambini, J.,Sastre, J. and Pallardo, F. V. (2005b). "Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds." FEBS Lett **579**(12): 2541-2545.
- Vina, J.,Borras, C. and Miquel, J. (2007a). "Theories of ageing." IUBMB Life **59**(4-5): 249-254.

- Vina, J., Gambini, J., Lopez-Grueso, R., Abdelaziz, K. M., Jove, M. and Borras, C. (2011). "Females live longer than males: role of oxidative stress." *Curr Pharm Des* **17**(36): 3959-3965.
- Vina, J., Lloret, A., Valles, S. L., Borras, C., Badia, M. C., Pallardo, F. V., Sastre, J. and Alonso, M. D. (2007b). "Mitochondrial oxidant signalling in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **11**(2): 175-181.
- Vina, J., Sastre, J., Pallardo, F. V., Gambini, J. and Borras, C. (2008). "Modulation of longevity-associated genes by estrogens or phytoestrogens." *Biol Chem* **389**(3): 273-277.
- Viña, J., Sáez, G. T., Wiggins, D., Roberts, A. F. C., Hems, R. and Krebs, H. A. (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." *Biochem. J.* **212**: 39-44.
- Walford, R. L., Weber, L. and Panov, S. (1995). "Caloric restriction and aging as viewed from Biosphere 2." *Receptor* **5**(1): 29-33.
- Walz, E. (1931). "Isoflavon- und saponin-glucoside in Soja-hispida." *Justus Liebigs Ann. Chem.* **489**: 118-155.
- Wangen, K. E., Duncan, A. M., Xu, X. and Kurzer, M. S. (2001). "Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women." *Am J Clin Nutr* **73**(2): 225-231.
- Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K. and Adlercreutz, H. (1998). "Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako)." *J Nutr* **128**(10): 1710-1715.
- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. and Wang, Y. (1995). "Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein." *Proc Soc Exp Biol Med* **208**(1): 124-130.
- Weickert, M. O., Reimann, M., Otto, B., Hall, W. L., Vafeiadou, K., Hallund, J., Ferrari, M., Talbot, D., Branca, F., Bugel, S., Williams, C. M., Zunft, H. J. and Koebnick, C. (2006). "Soy isoflavones increase preprandial peptide YY (PYY), but have no effect on ghrelin and body weight in healthy postmenopausal women." *J Negat Results Biomed* **5**: 11.
- Weindruch, R. (1996a). "Caloric restriction and aging." *Sci Am* **274**(1): 46-52.
- Weindruch, R. (1996b). "The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates." *Toxicol Pathol* **24**(6): 742-745.
- Weindruch, R. and Walford, R. L. (1982). "Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence." *Science* **215**(4538): 1415-1418.
- Wiegand, H., Wagner, A. E., Boesch-Saadatmandi, C., Kruse, H. P., Kulling, S. and Rimbach, G. (2009). "Effect of dietary genistein on Phase II and antioxidant enzymes in rat liver." *Cancer Genomics Proteomics* **6**(2): 85-92.
- Wilcox, J. N. and Blumenthal, B. F. (1995). "Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins." *J Nutr* **125**(3 Suppl): 631S-638S.
- Wiseman, H., O'Reilly, J. D., Adlercreutz, H., Mallet, A. I., Bowey, E. A., Rowland, I. R. and Sanders, T. A. (2000). "Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans." *Am J Clin Nutr* **72**(2): 395-400.

- Wong, M. C., Portmann, B., Sherwood, R., Niemela, O., Koivisto, H., Parkkila, S., Trick, K., L'Abbe M, R., Wilson, J., Dash, P. R., Srirajaskanthan, R., Preedy, V. R. and Wiseman, H. (2007). "The cytoprotective effect of alpha-tocopherol and daidzein against d-galactosamine-induced oxidative damage in the rat liver." Metabolism **56**(7): 865-875.
- Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, C. N., Jr. and Sunderman, F. W., Jr. (1987). "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct." Clin Chem **33**(2 Pt 1): 214-220.
- Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C. and Pike, M. C. (2008). "Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk." Br J Cancer **98**(1): 9-14.
- Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S. and Tsugane, S. (2003). "Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan." J Natl Cancer Inst **95**(12): 906-913.
- Yang, G., Shu, X. O., Jin, F., Elasy, T., Li, H. L., Li, Q., Huang, F., Zhang, X. L., Gao, Y. T. and Zheng, W. (2004). "Soyfood consumption and risk of glycosuria: a cross-sectional study within the Shanghai Women's Health Study." Eur J Clin Nutr **58**(4): 615-620.
- Yang, H., Jin, G., Ren, D., Luo, S. and Zhou, T. (2011). "Mechanism of isoflavone aglycone's effect on cognitive performance of senescence-accelerated mice." Brain Cogn **76**(1): 206-210.
- Yen, G. C. and Lai, H. H. (2003). "Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts." J Agric Food Chem **51**(27): 7892-7900.
- Yi, M. J., Park, S. H., Cho, H. N., Yong Chung, H., Kim, J. I., Cho, C. K., Lee, S. J. and Lee, Y. S. (2002). "Heat-shock protein 25 (Hspb1) regulates manganese superoxide dismutase through activation of Nfkb (NF-kappaB)." Radiat Res **158**(5): 641-649.
- Zastawny, T. H., Dabrowska, M., Jaskolski, T., Klimarczyk, M., Kulinski, L., Koszela, A., Szczesniewicz, M., Sliwinska, M., Witkowski, P. and Olinski, R. (1998). "Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA." Free Radic Biol Med **24**(5): 722-725.
- Zhang, C. and Cuervo, A. M. (2008). "Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function." Nat Med **14**(9): 959-965.
- Zhong, X. and Zhang, C. (2012). "[Soy food intake and breast cancer risk: a meta-analysis]." Wei Sheng Yan Jiu **41**(4): 670-676.
- Zou, S., Sinclair, J., Wilson, M. A., Carey, J. R., Liedo, P., Oropeza, A., Kalra, A., de Cabo, R., Ingram, D. K., Longo, D. L. and Wolkow, C. A. (2007). "Comparative approaches to facilitate the discovery of longevity interventions: effects of tocopherols on lifespan of three invertebrate species." Mech Ageing Dev **128**(2): 222-226.

