



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.



Universitat d'Alacant
1286
Universidad de Alicante

UNIVERSIDAD DE ALICANTE

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOTECNOLOGIA Y BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**MODELOS DE ENVEJECIMIENTO IN VITRO E IN VIVO,
ESTRÉS OXIDATIVO Y PROTECCION ANTIOXIDANTE**

MEMORIA

**Que para optar al grado de doctora
en Biología**

presenta

MARIA DEL MAR CASTILLO PATERNA



Alicante, 2002



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Dña. Maria Mercedes Palmero Cabezas, profesora titular de E.U. de Farmacología, y D. Juan Lorenzo Bellot Bernabé, profesor titular de E.U. de Farmacología de la Universidad de Alicante.

CERTIFICAN:

Que el trabajo experimental correspondiente a la presente memoria titulada “Modelos de envejecimiento *in vitro* e *in vivo*, estrés oxidativo y protección antioxidante”, ha sido realizado por Maria del Mar Castillo Paterna bajo nuestra dirección y que, a nuestro juicio, reúne las condiciones adecuadas para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente para aspirara al grado de doctor en Biología.

Alicante a 5 Diciembre de 2002

Fdo. Dra. M.M. Palmero Cabezas

Fdo. Dr. J.L. Bellot Bernabé



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Este trabajo ha sido financiado con una ayuda del Fondo de
Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS 99/1264).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Dedicada a Alfredo Orts



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que han hecho posible que este trabajo haya llegado a su fin, que lo más probable sea que al intentar nombrarlas a todas seguro que me olvide de alguien, así que desde este párrafo y a todas esas personas les doy las gracias.

Me gustaría destacar:

Al grupo de investigación del Dr. Orts por acogerme y hacerme sentir como una más en tan breve tiempo, y a él por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio.

A Mercedes Palmero, por su labor como codirectora de este trabajo y transmitirme sus conocimientos sobre la materia, y los buenos ratos compartidos en el laboratorio y sobretodo por su “paciencia” con mi estilo de redacción.

A Juanlo Bellot, por su dedicación.

A Cristina García, por todos esos buenos ratos tanto dentro como fuera del laboratorio, como en Palma 2000.

A Miguel Ángel Company, por iniciarme y enseñarme todo todo sobre el mundo de los cultivos celulares.

A Miguel Sanz, por todos los ratos compartidos en el oxígrafo, midiendo ATP y LDH y trasmitirme sus conocimientos sobre informática.

A Anamaria Madariaga, por escucharme, por todos sus buenos consejos y los buenos ratos compartiendo bancada.

A Jaime Miquel, por su ayuda desinteresada y sus consejos sobre envejecimiento y antioxidantes.

A mis amigos que aunque no los nombre me acuerdo de todos ellos, gracias, y en especial a Asun, Inma y M^a Carmen por todo el apoyo ofrecido en los momentos más difíciles.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia por todo su apoyo y el haber estado ahí en todo momento.

Por todo ello, y a todos vosotros, gracias desde lo más profundo de mi corazón.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



INDICE

INTRODUCCION

1. Radicales libres de oxígeno y nitrógeno y estrés oxidativo.....	19
1.1. Principales hitos en el desarrollo de estos conceptos.....	19
1.2. Definición y clasificación de los radicales libres.....	21
1.3. Mecanismos de formación de los radicales libres.....	22
1.4. Oxígeno y radicales libres del oxígeno.....	25
1.5. Propiedades de los radicales libres de oxígeno.....	26
1.6. Nitrógeno y radicales libres de nitrógeno.....	28
1.7. Propiedades de los radicales libres de nitrógeno.....	29
2. Sistemas de defensa celular	31
2.1. Antioxidantes primarios.....	31
2.2. Antioxidantes secundarios.....	33
2.3. Vitamina C.....	34
2.4. N-acetil-cisteína.....	35
2.5. Ácido tiazolidín carboxílico o tioprolina.....	36
3. Daño celular por estrés oxidativo	37
3.1. Daño a proteínas.....	38
3.2. Daño a lípidos.....	39
3.3. Daño al ADN.....	40
3.4. Daño a carbohidratos.....	41
4. Apoptosis inducida por estrés oxidativo.....	41
4.1. Regulación de los mecanismos de muerte celular.....	42
5. Patologías relacionadas con el estrés oxidativo.....	45
6. El envejecimiento biológico.....	46
6.1. Factores que influyen en el envejecimiento.....	47
6.2. Teorías sobre las causas del envejecimiento normal.....	51
6.2.1. Teoría del “envenenamiento” por los radicales libres de oxígeno.	51
6.2.2. Teoría de los radicales libres.....	51

6.2.3. Teoría mitocondrial del envejecimiento.....	52
6.2.4. Teoría de la mutación genética.....	53
6.2.5. Relevancia gerontológica de los estudios sobre telómeros y telomerasa.....	54
6.3. Concepto integrador de teorías clásicas y modernas.....	56
7. Principales enfermedades oculares asociadas con el estrés oxidativo y el envejecimiento.....	57
7.1. Degeneración macular asociada a la edad.....	57
8. Modelos para el estudio del estrés oxidativo y envejecimiento....	58
8.1. Epitelio pigmentario de retina como modelo de envejecimiento celular <i>in vitro</i>	58
8.2. Ratón OF1 como modelo de envejecimiento <i>in vivo</i>	59
OBJETIVOS.....	65
MATERIAL Y METODOS	
1. Material.....	69
1.1. Material biológico.....	69
1.2. Reactivos.....	69
1.3. Aparataje.....	70
2. Métodos de los estudios in vitro.....	71
2.1. Cultivo de células del epitelio pigmentario de retina.....	71
2.1.1. Cultivos primarios.....	71
2.1.2. Subcultivos de EPRb.....	73
2.2. Inducción del daño celular por estrés oxidativo.....	74
2.2.1. Inducción de estrés oxidativo por agentes químicos.....	74
2.2.2. Inducción de células de EPRb en una atmósfera con baja concentración de oxígeno.....	75
2.2.3. Inducción de estrés oxidativo por peroxinitrito.....	76
2.3. Tratamiento con antioxidantes.....	76
2.4. Determinación del daño celular.....	76
2.4.1. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa.....	76

2.4.2. Determinación de la concentración intracelular de ATP.....	77
2.4.3. Detección de la apoptosis.....	78
a) Tinción con Hoechst 33258 (bis-benzamida).....	78
b) Electroforesis en gel de azarosa.....	79
3. Métodos del modelo de envejecimiento <i>in vivo</i>.....	83
3.1. Animales de experimentación.....	83
3.2. Estudio de parámetros no invasivos fisiológicos y conductuales.....	84
3.2.1. Consumo promedio de alimento.....	84
3.2.2. Determinación del peso corporal.....	84
3.2.3. Parámetros de conducta.....	84
a) Medida de parámetros de vigor y coordinación neuromuscular	85
b) Medida de la actividad exploratoria espontánea.....	86
3.3. Obtención de muestras de tejidos para estudios bioquímicos.....	88
3.4. Aislamiento de mitocondrias de hígado y de riñón y determinación de proteína mitocondrial.....	88
3.5. Determinación del consumo de oxígeno.....	91
3.6. Determinaciones enzimáticas.....	92
3.6.1. Actividad citocromo <i>c</i> oxidasa.....	92
3.6.2. Actividad citrato sintetasa.....	93
3.6.3. Determinación de malondialdehído.....	94
4. Métodos estadísticos.....	95

RESULTADOS

1. Modelo de envejecimiento celular <i>in vitro</i>.....	99
1.1. Inducción de daño celular por peroxinitrito.....	99
1.2. Inducción de estrés oxidativo por agentes químicos.....	104
1.3. Inducción de daño celular por hipoxia.....	108
1.4. Inducción de apoptosis por estrés oxidativo.....	110
1.4.1. Detección mediante tinción con Hoechst.....	110
1.4.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	116

2. Modelo de envejecimiento <i>in vivo</i>	119
2.1. Supervivencia y parámetros fisiológicos del ratón.....	119
2.1.1. Supervivencia de la población.....	119
2.1.2. Peso Corporal.....	120
2.1.3. Consumo promedio de pienso.....	129
2.2. Efectos sobre parámetros de conducta.....	130
2.2.1. Prueba de coordinación neuromuscular y vigor.....	130
2.2.2. Efectos sobre la actividad exploratoria.....	132
2.3. Determinaciones bioquímicas.....	135
2.3.1. Consumo de oxígeno mitocondrial.....	135
2.3.2. Actividad Citocromo c oxidasa.....	138
2.3.3. Actividad Citrato sintetasa.....	141
2.3.4. Determinación de Malondialdehído.....	143
DISCUSIÓN	
1. Modelo de envejecimiento celular <i>in vitro</i>	147
2. Modelo de envejecimiento <i>in vivo</i>	157
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFIA	172



ABREVIATURAS

- ATP: adenosina-5'-difosfato.
- BSA: albúmina sérica bovina
- CTE: cadena de transporte de electrones.
- DMAE: degeneración macular asociada a la edad.
- DMEM: medio de Dulbecco modificado por Eagle.
- e⁻: electrón.
- EPRb: epitelio pigmentario de retina bovina.
- ERN: especies reactivas del nitrógeno.
- ERO: especies reactivas del oxígeno.
- GSH: glutation.
- GSSG: glutation oxidado.
- H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
- LDH: lactato deshidrogenasa.
- MDA: malondialdehído.
- NAC: n-acetil-cisteína.
- NAD: nicotinamida adenina dinucleótido.
- NADPH oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa.
- NMDA: N-metil-D-aspartato.
- NO: óxido nítrico.
- NOS: óxido nítrico sintetasa.
- NS: no supervivientes.
- PBS: tampón fosfato salino de Dulbecco.
- PFA: paraformaldehído.
- PN: peroxinitrito.
- RL: ratones lentos
- RR: ratones rápidos.
- S: supervivientes.
- SFB: suero fetal bovino.
- TP: ácido tiazolidín carboxílico o tioprolina.
- VC: vitamina C.
- VE: vitamina E



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

INTRODUCCIÓN



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Radicales libres de oxígeno y nitrógeno. Estrés oxidativo

1.1. Principales hitos en el desarrollo de estos conceptos

Actualmente, el estudio de los radicales libres de oxígeno y asociado el estrés oxidativo es uno de los temas biomédicos de mayor interés teórico y práctico. Esto se debe a su relación con la fisiopatología de muchas enfermedades crónicas degenerativas y sobre todo con el proceso del envejecimiento, que debido al aumento de la longevidad (y de las enfermedades ligadas a la edad) es el problema sanitario más importante de los países industrializados.

Según la revisión de Miquel (1998), “Es sorprendente que los radicales libres derivados del oxígeno, que son la base de la vida aerobia, puedan llevar también a procesos degenerativos como el cáncer y el envejecimiento”. La explicación de esta paradoja se encuentra en el hecho de que el oxígeno puede causar una gran variedad de efectos tóxicos que son especialmente marcados en el sistema nervioso.

Por otra parte, la investigación sobre la toxicidad del oxígeno también estuvo ligada al uso clínico de este gas en cámaras de terapia hiperbárica y al descubrimiento de que concentraciones altas de oxígeno aumentan la sensibilidad de las células a la radiación ionizante (Gray y Scott, 1964), abriendo así el camino a numerosos estudios sobre el denominado “*efecto del oxígeno*”.

Estos estudios confirmaron hipótesis anteriores sobre la importancia de la activación del oxígeno, es decir apoyaron el concepto de que tanto los efectos beneficiosos como los efectos nocivos de este gas se deben a la formación de radicales libres de oxígeno a través de un cambio en su configuración electrónica que lleva a la formación de radicales libres (Mulliken, 1929). Y estos mecanismos se terminaron de aclarar gracias a la hipótesis de Michelis (1949) que la molécula de oxígeno se reduce gradualmente, es decir gana electrones de uno en uno, por lo cual se forman fragmentos moleculares con un electrón no apareado y con una muy alta reactividad, que dan lugar a reacciones no programadas.

Introducción

Esta particularidad de la química del oxígeno tiene gran importancia biomédica, como resume Gutteridge (1986): “La ventaja de este proceso para la vida aerobia es una considerable desaceleración de las reacciones del oxígeno con compuestos no-radicales. El inconveniente es que la reducción del O₂ de electrón en electrón produce especies de oxígeno reactivas (ERO)”.

Uno de los efectos patológicos de estas ERO que rápidamente despertó interés fue la peroxidación de lípidos, que ocurre en el tejido adiposo de animales deficientes en la vitamina antioxidante E (Dam y Granados, 1945), conjuntamente se observó una acumulación de peróxidos en el tejido adiposo alrededor de las aortas ateromatosas (Glavind et al., 1952). Por otra parte, la observación de peróxidos de lípidos que se forman en la piel expuesta a los rayos X o luz ultravioleta llevó a Dubouloz y Dumas (1954, 1955) a proponer que dichos peróxidos están ligados a un proceso de inflamación tisular.

Otro dato fundamental para el desarrollo de la biomedicina de las ERO es que las proteínas que transportan hierro (hemoglobina y otros pigmentos hemáticos), así como las mitocondrias, tienen un papel clave en el estrés oxidativo que lleva a la formación de lipoperóxidos (Tappel et al., 1961; Tappel, 1965). Según comentaremos más detalladamente en otras secciones de esta memoria de Tesis, las mitocondrias no sólo producen ERO sino que están muy expuestas al resultante estrés oxidativo, pues aproximadamente el 90% del oxígeno que usan los mamíferos se procesa en la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial interna.

A la vez que se investigaban los efectos biológicos y patológicos de las ERO se fue avanzando en la comprensión de los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo basados en la acción de los principales compuestos de acción antioxidante o barredora de radicales libres, como la vitamina E (Evans y Bishop, 1922), la vitamina C (Szent-Giorgyi, 1928) y el glutatión (Viña, 1990). Así también tuvieron una importancia fundamental el descubrimiento de los *peroxisomas*; orgánulos que contienen catalasa y detoxifican peróxidos (De Duve, 1969) junto con la identificación por McCord y Fridovich (1969) de las superóxido dismutasas, enzimas que eliminan el radical superóxido impidiendo así su acción patológica.

En base a una extensa revisión sobre estos temas, concluía Pryor (1982): “No hace mucho tiempo la biología de los radicales libres era un tema extraño, considerado con desinterés e incredulidad por la mayor parte de los biólogos.”

Afortunadamente ésta no es la situación actual, pues la biología de las ERO y la patología del estrés oxidativo, y su posible prevención, despiertan un intenso y creciente interés, sobre todo en lo que respecta a las causas del proceso de envejecimiento. Así, según el reciente comentario de Vijg y Muller (2000): “La teoría gerontológica propuesta por Denham Harman en 1956 aún ofrece la explicación más atractiva de un mecanismo general responsable del envejecimiento. La diferencia es que, mientras en 1969 sólo había cien trabajos publicados sobre radicales libres, envejecimiento y enfermedad, la cantidad aumentó a 2000 en 1990 y ahora será mucho mayor. El creciente número de publicaciones se acompaña de un impresionante aumento en la variedad de los enfoques metodológicos. Mientras que al principio la investigación en este campo se limitaba a los estudios descriptivos, ahora incluye métodos tan avanzados como el uso de animales transgénicos”.

1.2. Definición y clasificación de los radicales libres

Se define como radical libre a aquella especie química (átomo o molécula) capaz de existir independientemente, y que contiene uno o más electrones desapareados. Los radicales libres son especies dotadas de elevada capacidad de reacción, y por tanto, capaces de intervenir en numerosas reacciones químicas, alterando el funcionamiento de sistemas tanto biológicos como no biológicos (Pryor, 1976).

Los radicales libres pueden ser de distintos tipos, según los átomos integrantes, pero debemos destacar por su importancia en los sistemas biológicos a los *radicales libres derivados del oxígeno* y relacionadas *especies reactivas del oxígeno* (ERO), así como a los *radicales libres derivados del nitrógeno* y relacionadas *especies reactivas del nitrógeno* (ERN) (Saran y Bors, 1990; Halliwell, 1992; 1997).

Introducción

1.3. Mecanismos de formación de los radicales libres

Un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón (e^-). Así mismo, también pueden formarse radicales libres cuando un enlace covalente se rompe, y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (*fisión homolítica*). Por otra parte, en la *fisión heterolítica* uno de los átomos recibe los e^- , quedando cargado negativamente, mientras que el otro adquiere una carga positiva, generando iones y no radicales. Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son muy reactivas, poseen una vida media corta y se encuentran en muy baja concentración en el estado estacionario (Armstrong et al., 1984, Pryor, 1986, Webster y Nunn., 1988, Cadenas, 1989).

En los sistemas biológicos la fisión heterolítica es la más común, debido a que la ruptura homolítica requiere una energía elevada (temperatura, radiación ultra-violeta o radiación ionizante), así generalmente se produce la donación de e^- de una molécula a otra como en reacciones redox, reacciones no enzimáticas de transferencia de e^- , reacciones catalizadas por metales o procesos catalizados por enzimas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los radicales libres pueden tener un origen endógeno o exógeno al medio biológico, y además su formación puede estar ligada a mecanismos físicos (como radiación ultravioleta e ionizante) o bien a mecanismos biológicos como la producción celular de radicales libres que puede ocurrir por reacciones enzimáticas o no enzimáticas (Pryor y Stone, 1993). A continuación describimos algunas de estas reacciones:

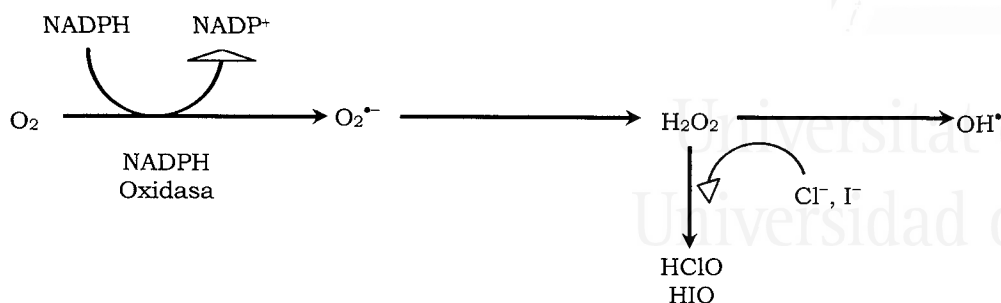
Reacciones de oxido-reducción. Como la transformación de hidroquinona a semiquinona, en la que interviene el O_2 que se transforma en superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Weiss et al., 1987).

Reacciones de autooxidación de pequeñas moléculas del citoplasma celular como catecolaminas, flavinas, quinonas y tioles, que producen oxiradicales debido a una reducción concomitante del oxígeno (Fisher y Kaufman, 1973; Baccanari, 1978; Fridovich, 1983; Proctor y Reynolds, 1984).

Reacciones de la cadena de transporte de electrones (CTE). Como ya hemos comentado, una de las mayores fuentes productoras de radicales libres es la mitocondria, debido a que más del 95% del O_2 es utilizado por ella para realizar la fosforilación oxidativa, que se encuentra acoplada a la cadena de transporte de electrones (CTE). La CTE es una vía única ya que en ella los átomos de hidrógeno (H) son escindidos en protones (H^+) y e^- . Los e^- pasan a través de una serie de transportadores de e^- de la membrana mitocondrial interna, y en algunos de estos pasos a lo largo de la cadena los protones y los e^- se recombinan entre ellos. Existe una tendencia a que estos e^- reaccionen directamente con el O_2 formando así el radical $O_2^{\bullet-}$ en vez de pasar al siguiente transportador. De ahí que la liberación de $O_2^{\bullet-}$ represente la mayor fuente de producción de radicales libres en condiciones fisiológicas (Harman, 1972; Nohl y Hegner, 1978; Chance et al., 1979).

Además de la producción de $O_2^{\bullet-}$ por la CTE en la membrana mitocondrial interna, también se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la membrana mitocondrial externa a causa de la desaminación oxidativa de las catecolaminas por el enzima monoamino oxidasa (Fnan y Cohen., 1992).

Otra fuente importante de producción del radical $O_2^{\bullet-}$ es el denominado “estallido respiratorio”, que tiene lugar en las células fagocíticas cuando éstas son activadas por cualquier estímulo. Este proceso es llevado a cabo por nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), que se encuentra en la superficie externa de la membrana plasmática. El proceso es el siguiente: los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos son activados debido al contacto con una sustancia extraña, con lo que aumentan su consumo de oxígeno y lo transforman en radical $O_2^{\bullet-}$, que es convertido en H_2O_2 y éste a su vez en radical OH^{\bullet} , radical al que es expuesta la partícula fagocitada (McCord, 1974; Blake et al., 1987) (Figura 1).

Introducción**Figura 1. Producción de radicales libres durante el estallido respiratorio**

(Martinez-Cayuela, 1995)

Síntesis de prostaglandinas. Tiene lugar a partir del metabolismo del ácido araquidónico por mediación de las ciclooxygenasas (Porter, 1980). La síntesis de prostaglandinas ocurre en tres pasos: liberación del ácido araquidónico de sus precursores los fosfolípidos de la membrana, oxigenación del ácido araquidónico libre por prostaglandina endoperóxido G/H sintetasa (PGG/H sintetasa) y metabolismo de endoperóxidos intermedios (síntesis de prostanoides)(Smith, 1986).

Xenobióticos. La formación de radicales libres está implicada en la toxicidad de un amplio rango de xenobióticos, pues muchos compuestos químicos requieren, para ejercer su acción tóxica una activación metabólica a intermediarios reactivos que pueden ser dichos radicales libres (Mason, 1982; Proctor y Reynolds, 1984; Halliwell y Gutteridge, 1989). La formación de estos radicales libres intermediarios está catalizada por la NADPH-citocromo P450 reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como dador electrónico (Kappus y Sies, 1981; Trush et al., 1982). En estos casos, se establece un ciclo redox en el que hay un gran consumo de NADPH y oxígeno y generación de radicales superóxido y otras especies reactivas del oxígeno (Figura 2). Este ciclo redox conduce a una situación de estrés oxidativo y, en casos extremos, a la muerte celular (Sies, 1985).

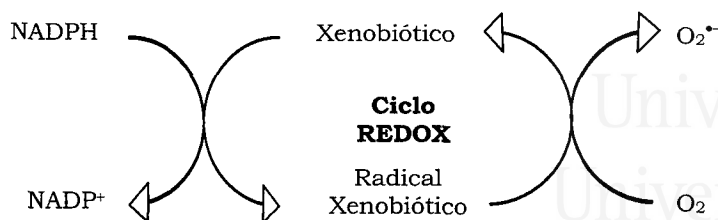


Figura 2. Ciclo redox de xenobióticos (Martínez-Cayuela, 1998)

1.4. Oxígeno y radicales libres del oxígeno

En los organismos vivos, el O_2 es el principal responsable de la formación de radicales libres (Tabla 1). La molécula de oxígeno puede ser calificada de birradical puesto que tiene dos electrones desapareados, cada uno de ellos localizado en un orbital antienlazante π^* . Sin embargo, la reactividad de esta molécula es más baja de la que cabría esperar debido a que los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas (Malmström, 1982; Webster y Nunn, 1988; Cadenas, 1989; Jamieson, 1989). Según el principio de exclusión de Pauli, los electrones de un orbital atómico o molecular nunca tienen direcciones paralelas. Por lo tanto, para que el oxígeno molecular aumente su reactividad tiene que invertirse el espín de uno de los electrones de sus orbitales externos, o bien, sufrir una reducción secuencial y univalente produciendo radicales libres de oxígeno.

Nombre	símbolo	naturaleza
oxígeno singlete	1O_2	no radical
ozono	O_3	no radical
óxido nítrico	NO	radical
dióxido de nitrógeno	NO_2	radical
peróxido de hidrógeno	H_2O_2	no radical
hidroxilo	OH^\bullet	radical
superóxido	$O_2^{\bullet-}$	radical
hidroperóxido	HOO^\bullet	radical
alcoxilo	RO^\bullet	radical
peroxilo	ROO^\bullet	radical
acicloxilo	$R-COO^\bullet$	radical
acilperoxilo	$R-CO-COO^\bullet$	radical
ariloxilo	ArO^\bullet	radical
arilperoxilo	$ArOO^\bullet$	radical
ácido hipocloroso	HClO	no radical

Tabla 1. Radicales libres del oxígeno más importantes.

Introducción

El oxígeno se puede reducir por dos vías para transformarse tras varios pasos, en una molécula de agua (H_2O). La vía tetravalente es el principal mecanismo de reducción del O_2 (Naqui et al., 1986), y por la vía univalente (Figura 3) se produce una pequeña pero continua reducción del oxígeno, que es llevada a cabo en la cadena respiratoria mitocondrial mediante la NADH oxidasa y la ubiquinona (Halliwell et al., 1992).

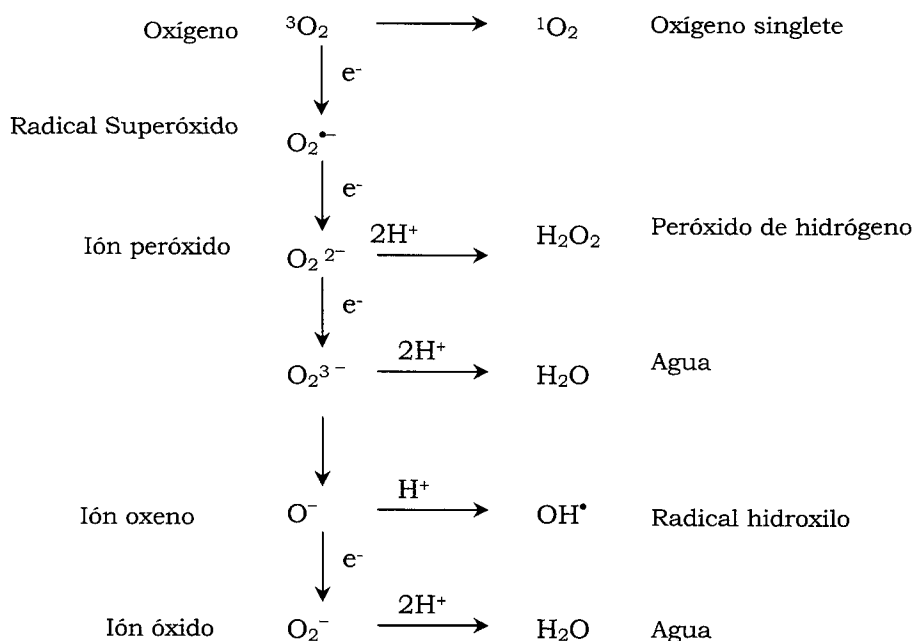


Figura 3. Vía univalente de reducción del oxígeno (Martínez-Cayuela, 1995).

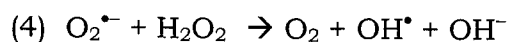
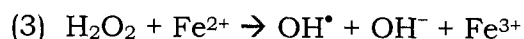
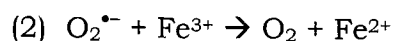
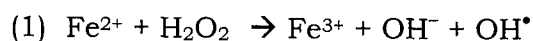
1.5. Propiedades de los radicales libres del oxígeno

Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Es el estado excitado inferior del oxígeno molecular que se puede generar en reacciones enzimáticas y fotólisis del oxígeno a altas presiones, a partir de peróxido de hidrógeno (Cadenas, 1989). Este oxígeno singlete puede interaccionar con otras moléculas, bien combinándose químicamente con ellas o transfiriendo su energía, y volviendo a su estado basal. La formación de este radical en los sistemas biológicos, puede estar mediada por diferentes reacciones enzimáticas o por quimioexcitación durante la peroxidación lipídica (Cadet et al., 1994).

Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). En las reacciones de este radical predominan los procesos de transferencia electrónica, como su participación en la reducción del ión férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), que es convertido a peróxido de hidrógeno por el enzima superóxido dismutasa (SOD). Por otro lado, carece de la reactividad suficiente para atacar a macromoléculas aunque existen numerosos blancos biológicos sensibles al $O_2^{\bullet-}$ (McCord y Fridovich, 1969).

El $O_2^{\bullet-}$ se origina en muchas reacciones enzimáticas pero su principal fuente de producción son las mitocondrias, transformándose en dicho radical el 1% del O_2 consumido por las mismas (Richter, 1988).

Radical hidroxilo (OH^{\bullet}). Es el radical más reactivo en los sistemas biológicos. Se origina en procesos de radiólisis, fotólisis del agua y del peróxido de hidrógeno. En los seres vivos, una de las principales fuentes de radical hidroxilo es la reacción de “Fenton” (reacción 1):

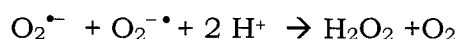


La reacción de Fenton tiene lugar en condiciones fisiológicas, dependiendo de la presencia de superóxido o de otros agentes capaces de reducir al hierro. La reacción se produce de la siguiente manera: en la primera etapa (reacción 2) el superóxido reacciona con trazas de metal, como por ejemplo Fe^{3+} o Cu^{2+} presente en las células, originando las especies reactivas de dichos iones así como peróxido de hidrógeno. A continuación, la molécula de peróxido de hidrógeno es reducida por dichos cationes produciendo el radical hidroxilo (reacción 3). Esta última especie, al ser deficiente en e^- , se convierte en un poderoso oxidante y por tanto iniciador de reacciones en cadena mediadas por radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1984).

El OH^{\bullet} es considerado uno de los radicales más dañinos para la célula, ya que difunde rápidamente del lugar donde se formó a las células de alrededor, se une a moléculas insaturadas, interviene en procesos de transferencia de e^- , y se encuentra implicado en procesos biológicos de gran importancia como la fagocitosis (Zigler et al., 1985).

Introducción

Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂). No es un verdadero radical libre, ya que posee dos e⁻ apareados, pero el enlace entre los átomos del oxígeno es simple por lo que resulta bastante inestable y fácil de romper. Esta molécula se descompone espontánea y rápidamente bajo la acción de la luz visible. El radical superóxido actúa como precursor cuando es dismutado por el enzima superóxido dismutasa que cataliza la siguiente reacción:



El H₂O₂ entra a formar parte de la reacción de Fenton, y es utilizado como agente bactericida por los peroxisomas, en reacciones de fagocitosis (Boveris et al., 1972).

1.6. Nitrógeno y radicales libres del nitrógeno

El nitrógeno constituye aproximadamente el 78,03% del volumen del aire. Al igual que ocurre con el oxígeno, desempeña un importante papel en los sistemas biológicos al formar parte de casi todas las biomoléculas.

Las intensas investigaciones sobre el óxido nítrico y relacionados radicales libres han llevado a crear los nuevos términos de especies reactivas de nitrógeno” (ERN) y “radicales libres del nitrógeno” (Tabla 2) (Moncada et al., 1991; Rubbo et al., 1996; McAndrew et al., 1997).

<i>Nombre</i>	<i>símbolo</i>	<i>naturaleza</i>
óxido nítrico	NO [•]	radical
dióxido de nitrógeno	NO ₂ [•]	radical
ácido nitroso	HNO ₂	no radical
trióxido de dinitrógeno	N ₂ O ₂	no radical
tetraóxido de dinitrógeno	N ₂ O ₄	no radical
peroxinitrito	ONOO ⁻	radical
alquil-peroxinitritos	LOONO	no radical

Tabla 2. Radicales libres del Nitrógeno más importantes

1.7. Propiedades de los radicales libres de nitrógeno

Oxido nítrico (NO). Es considerado como uno de los radicales más importantes del N_2 ; se forma mediante la transformación de L-arginina en L-citrulina por el enzima oxido nítrico sintetasa (NOS), de la que se conocen dos isoformas funcionales: la constitutiva y la inducible (Palmer et al., 1988).

El NO es un pequeña molécula lipofílica que difunde a las células adyacentes, penetra en el citosol y desempeña un importante papel en la señalización celular y en la inducción de diferentes procesos patológicos (Moncada et al., 1991). Según las condiciones que rodean la producción de NO, éste puede ser transformado en otras especies reactivas intermedias del N_2 como son el catión nitroso (NO^+), el anión nitroxilo (NO^-) o el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Stamler et al., 1992).

La citotoxicidad del NO se atribuye a la inhibición de la respiración mitocondrial por unión al complejo IV mitocondrial (Bolaños et al., 1994) y al complejo I provocando así la inhibición de la fosforilación oxidativa y un descenso en la síntesis del ATP (Clementi et al., 1998). Otro proceso citotóxico es el efecto inhibitor que ejerce sobre el enzima glutation peroxidasa (Asahi et al., 1995).

Anión nitroxilo (NO^-). Tiene efectos directos sobre diversas moléculas o sistemas biológicos (Lipton et al., 1993). Se forma por reducción del NO para dar el anión nitroxilo en una reacción catalizada por el enzima superóxido dismutasa (Murphy y Sies, 1991), o también por la unión del NO al Fe^{2+} perteneciente a un grupo hemo del citocromo c (Sharpe y Cooper, 1998) o de la hemoglobina (Gow y Stamler., 1998).

Catión nitroso (NO^+). Es la forma oxidada del NO, relacionada con el ácido nitroso, y especie clave en el proceso de “nitrosación”, en el cual el NO^+ es transferido a un centro nucleofílico, normalmente de azufre o nitrógeno (Williams, 1988).

Introducción

Peroxinitrito (ONOO^-). La principal vía de formación de peroxinitrito es la reacción del NO con el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Beckman et al., 1990). El peroxinitrito es capaz de reaccionar con la mayoría de las biomoléculas, mostrando citotoxicidad aunque no estén presentes en el medio el NO o el superóxido. Esta citotoxicidad se debe a su rápida degradación a radical OH^{\bullet} . Posee una vida media muy corta de aproximadamente un segundo en condiciones fisiológicas (Beckman et al., 1990).

En la Figura 4, se muestran las principales vías de producción de radicales libres.

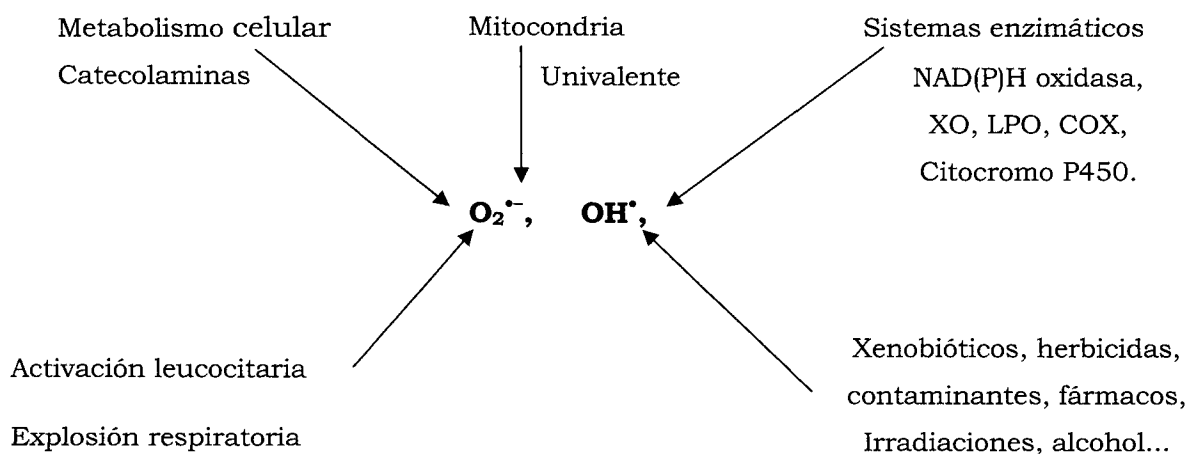


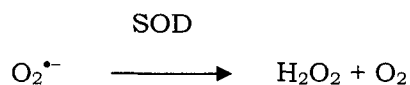
Figura 4. Origen de los radicales libres

2. Sistemas de defensa celular

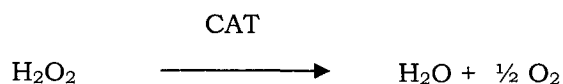
Los organismos superiores han desarrollado, con el transcurso de la evolución, un eficaz sistema de defensa antioxidante (Freeman y Grapo, 1982). Hay sistemas enzimáticos detoxificadores y mecanismos “captadores”, denominados “defensas primarias o preventivas”, que son capaces de disminuir la concentración de radicales libres, mientras que las defensas “secundarias”, también llamadas “rompe-cadenas”, actúan atrapando o captando a los radicales libres ya formados, deteniendo así los efectos perjudiciales en las primares fases de las reacciones (Armstrong et al., 1984; Cotgreave et al., 1988; Cadenas, 1989; Halliwell et al., 1992; Tosaki et al., 1993).

2.1. Antioxidantes primarios

Superóxido dismutasa (SOD). Forma parte de una familia de metaloenzimas con diferentes grupos prostéticos, de localización intracelular variable y gran heterogeneidad tisular. El isoenzima predominante es la superóxido dismutasa dependiente de zinc y cobre (CuZnSOD), que se encuentra en la mayoría de células eucariotas (Fisher y Kaufman, 1973, Fridovich, 1975; McCord y Fridovich, 1977; Fridovich, 1983). También se ha encontrado una SOD de alto peso molecular extracelular (Marklund et al., 1982; Marklund, 1984). Estas enzimas catalizan la transformación de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno.

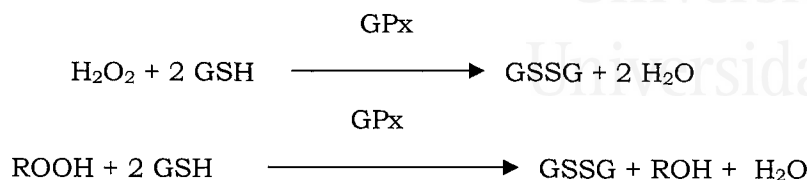


Catalasa (CAT). Este enzima transforma el peróxido de hidrógeno de las células en H₂O y O₂ cuando la concentración es elevada. Se localiza en los peroxisomas. Al igual que SOD, CAT se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos. (Proctor y Reynolds, 1984; Turrens et al., 1984; Blake et al., 1987).



Introducción

Glutation peroxidasa (GPx). Cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de los peróxidos orgánicos libres. Requiere glutatión reducido (GSH) como sustrato.



A diferencia de la catalasa, la GPx posee una alta afinidad por el sustrato, ya que posee 4 átomos de selenio, que son los responsables de la actividad catalítica. Se encuentra mayoritariamente en el citoplasma de las células eucariotas, particularmente en las mitocondrias (Wendel, 1980; Proctor y Reynolds, 1984; Cotgreave et al., 1988; Spallholz y Boylan., 1991; Harris, 1992).

Glutation reductasa. Es un enzima citosólico que reduce el glutatión oxidado utilizando NADPH generado por otros sistemas (Proctor y Reynolds, 1984; Cotgreave et al., 1988).

Otras proteínas. Los metales de transición también están implicados en la generación de radicales libres por medio de la reacción de Fenton. Sin embargo, cuando estos metales se encuentran unidos a proteínas no pueden catalizar la reacción.

La concentración de hierro libre en el organismo está controlada en condiciones fisiológicas, al encontrarse el hierro unido a glucoproteínas como transferrina o lactoferrina, que lo transportan en la circulación o bien a la ferritina, que lo almacena. Por lo tanto, estas proteínas regulan indirectamente las reacciones de oxido-reducción (Halliwell y Gutteridge., 1984, 1985; Thurnham, 1990).

La albúmina y la ceruloplasmina son las encargadas de transportar el cobre en el plasma, aunque no impiden la interacción entre el cobre y los radicales libres (Blake et al., 1987; Thurnham, 1990).

Pequeñas moléculas. Existen diferentes moléculas de pequeño tamaño como glutatión, ácido ascórbico, ácido úrico y taurina, distribuidas ampliamente en todos los sistemas biológicos, que son capaces de eliminar los radicales libres mediante reacciones no enzimáticas (Freeman y Grapo., 1982; Bast et al., 1984; Cadenas, 1989).

2.2. Antioxidantes secundarios

Existen diferentes glutatión transferasas con actividad peroxidasa, dependientes del glutatión, que actúan como antioxidantes frente a la peroxidación lipídica. Estos enzimas metabolizan los hidroperóxidos de bajo peso molecular pero nunca el H_2O_2 , y además necesitan la actividad de la fosfolipasa A_2 para ser funcionales (Ketterer, 1986; Ketterer y Meyer., 1989; Davies et al., 1990).

Existen otros enzimas como las que reparan el ADN, es decir ADN polimerasa I y ADN ligasa, también consideradas mecanismos de defensa frente al daño causado por el estrés oxidativo, ya que cuando se forma un sitio apurínico o apirimidínico por lesión oxidativa se detiene la replicación del ADN y actúan estos enzimas reparando la rotura. También las endonucleasas tienen un importante papel protector del ADN celular y del flujo de información genética (Cotgreave et al., 1988; Davies et al., 1990). Igual que sucede con la alteración de las proteínas, cuando el daño al ADN es irreparable, las células son eliminadas.

Además de estos enzimas, existen otras moléculas que actúan como antioxidantes secundarios. El α -tocoferol o vitamina E (VE) es el principal antioxidante liposoluble, presente en todas las membranas celulares, que actúa protegiendo frente a la peroxidación lipídica. Para ello reacciona con los radicales libres donando un ión hidrógeno y convirtiéndolos en formas menos reactivas. El radical tocoferilo también puede ser reducido directamente por el tándem glutatión-ácido ascórbico, descrito a continuación (Burton et al., 1982; Cadenas, 1989).

Introducción

Otro antioxidante secundario es el β -caroteno (el antioxidante más eficaz para eliminar el oxígeno singlete), que posee una acción sinérgica con la VE (Burton e Ingold, 1984; Machlin y Bendich., 1987; Bendich y Olson, 1989).

2.3. Ácido ascórbico o Vitamina C

La vitamina C (VC) actúa como un eficaz antioxidante hidrosoluble en los fluidos biológicos (Frei et al., 1989, 1990) eliminando fisiológicamente radicales libres tanto del oxígeno como del nitrógeno (Halliwell, 1996). Entre estos se incluyen hidroxilos, peroxilos, anión superóxido, y dióxido de nitrógeno, así como especies no radicales como ácido hipocloroso, ozono, oxígeno singlete, nitróxido y peroxinitrito.

Además de eliminar radicales libres, la VC puede regenerar otras moléculas antioxidantes como α -tocoferol, glutation, uratos y β -caroteno, a partir de sus respectivas formas radicales (Halliwell, 1996).

La hipótesis de que la VC es un eficaz antioxidante se apoya en numerosos datos, entre los cuales destaca que tanto el ascorbato como su radical libre (formado por la pérdida de 1 e⁻ de la molécula del ascorbato) tienen bajos potenciales de reacción (Buettner, 1993), por lo que pueden reaccionar con otros radicales y oxidantes presentes en los sistemas biológicos (Buettner y Jurkiewick., 1996). Además, el ascorbato puede ser regenerado a partir de radical libre ascorbato y ácido dehidroascórbico tanto por vías enzimáticas como no enzimáticas. El radical libre ascorbato es reducido por la semidehidroascorbato reductasa dependiente de NADH (Wells y Jung, 1997) y por la tioredoxin reductasa dependiente de NADPH (May et al., 1998) (Figura 5).

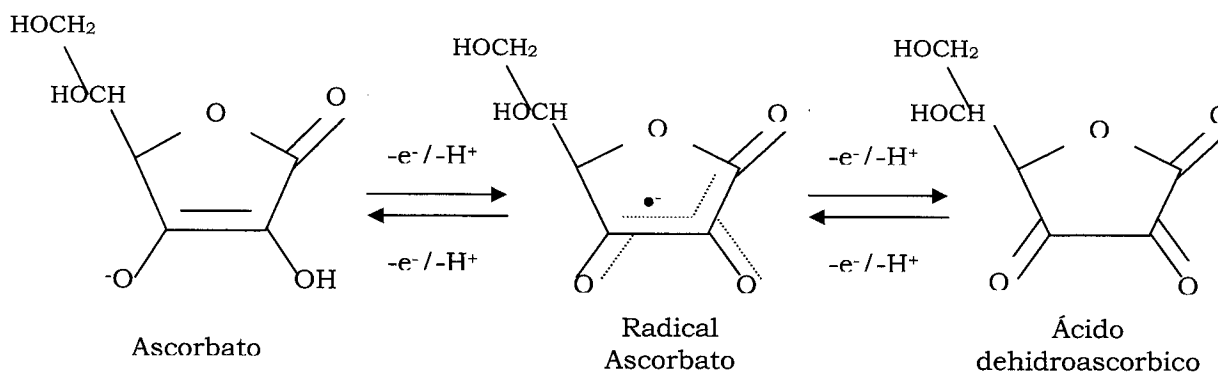


Figura 5. Metabolismo redox del ácido ascórbico.

2.4. N-acetil-cisteína

El antioxidante tiólico N-acetil-cisteína (NAC) puede actuar a través de diversos mecanismos, ya sea como precursor del glutatión, que es un antioxidante primario (De Vries y De Flora, 1993), o bien estimulando la actividad de algunas enzimas citosólicas implicados en el ciclo del glutatión (De Flora et al., 1991), como por ejemplo la glutatión reductasa, que aumenta la tasa de regeneración del glutatión. Así, NAC puede aumentar los niveles de glutatión reducido en la célula proporcionando una fuente de cisteína para su biosíntesis, con el consiguiente aumento de la actividad glutatión reductasa (Colton et al., 1995).

Un segundo mecanismo de acción es por reacción directa del grupo tiol reducido de NAC con radicales libres (Auroma et al., 1989).

También es probable un efecto estimulante de NAC sobre el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial (Miquel et al., 1995), al proteger a las proteínas que intervienen en dicho proceso frente a posibles daños producidos por el estrés oxidativo. De este modo, se mantienen en estado reducido los grupos sulfhidrilos de esas proteínas, que son esenciales para la actividad enzimática (Haugaard et al., 1969; Yagi y Hatefi., 1984).

Otro mecanismo de acción de NAC es su acción protectora frente a la peroxidación lipídica en las membranas mitocondriales, con la resultante preservación de la actividad de los complejos respiratorios (Zhang et al., 1990).

Además de estos efectos protectores de NAC, un número creciente de observaciones apoyan su papel en la inhibición de apoptosis en células fijas postmitóticas y oligodendrocitos (Mayer y Noble, 1994; Ferrari et al., 1995; Yan y Greene, 1998). Así, la administración de NAC posee efectos beneficiosos frente a apoptosis en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento (Ratan et al., 1994 a,b), además de inhibir la expresión de los genes *c-fos* y *c-jun* implicados en la apoptosis. En la Figura 6, se resumen los efectos de NAC.

Introducción

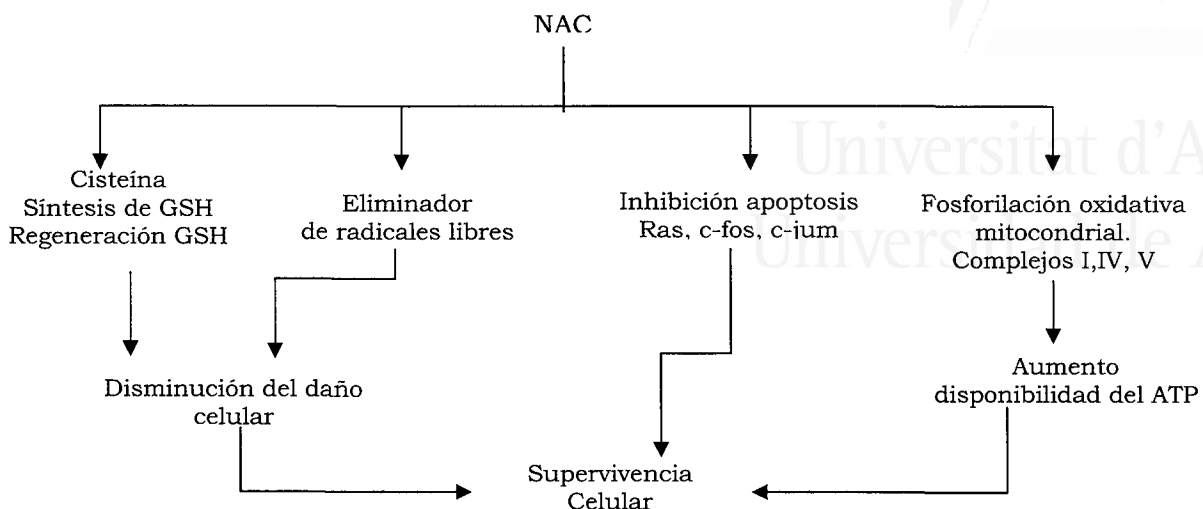


Figura 6. Efectos de N-acetil-cisteína (Banaclocha, 2001)

2.5. Ácido tiazolidín carboxílico o tioprolina

El ácido tiazolidín carboxílico o tioprolina (TP) es un aminoácido sulfhidrílico cíclico, que es utilizado clínicamente como hepatoprotector. Actúa como donador de grupos sulfhidrilo intracelulares y como captador de radicales libres (Dansette et al., 1990) y ha mostrado efectos beneficiosos sobre la longevidad y funciones fisiológicas del ratón y del insecto *Drosophila melanogaster* (Miquel y Economos, 1979).

También se ha observado que la administración de antioxidantes tiólicos, como glutatión o TP, previene la pérdida de coordinación neuromuscular de los ratones, según se demuestra mediante el test de la cuerda tirante (Miquel y Blasco., 1978; Pallardó et al., 1998).

Otro efecto de la administración de estos antioxidantes, observado en mitocondrias de hígado y cerebro de ratón, es un aumento del cociente GSSG/GSH y una disminución en el daño, producido por el estrés oxidativo ligado al envejecimiento, en el ADN mitocondrial (García de la Asunción et al, 1996; Sastre et al., 2000a). Otros estudios realizados con ratones envejecidos cuya dieta estaba suplementada con TP, demostraron un efecto de TP estimulante sobre las células del sistema inmunológico (De la Fuente et al., 1998a).

3. Daño celular por estrés oxidativo

El estrés causado por los radicales libres, ó estrés oxidativo, aparece cuando la producción de estos radicales supera la capacidad de las defensas antioxidantes, bien por un descenso en los niveles de estas defensas o por un aumento en la producción de los radicales (Figura 7). El estrés oxidativo puede lesionar varios tipos de células diana, y la lesión de éstas puede a su vez originar la lesión de otras (Halliwell, 1991).



Figura 7. Equilibrio y desequilibrio estrés oxidativo/defensas antioxidantes

La presencia de radicales libres es necesaria para las células. De hecho, estos radicales son producidos continuamente en los organismos y son esenciales en procesos fisiológicos tan importantes como la fagocitosis y la comunicación intercelular. Sin embargo, cuando aumenta excesivamente la producción de radicales libres o se han deteriorado los mecanismos antioxidantes, aparece el daño celular (Fridovich, 1983; Armstrong et al., 1984; Pryor, 1986; Halliwell y Gutteridge, 1989; Valenzuela y Videla, 1989).

La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser muy reactivos, inestables y de vida media muy corta, que se puede medir incluso en fracciones de microsegundo por lo cual suelen causar lesiones cerca del lugar de su producción. No obstante, cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que es posible que se creen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical. Un importante ejemplo de este mecanismo desorganizador es la peroxidación lipídica (Pryor, 1986; Blake et al., 1987; Southorn y Powis, 1988; Webster y Nunn 1988; Harman, 1992).

Introducción

3.1. Daño a proteínas

Las proteínas son alteradas por los radicales libres de oxígeno a través de varios mecanismos. Por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas, y así se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina (Freeman y Grapo, 1982). Por otra parte, la hemoproteína citoplasmática catalasa es inhibida por el $O_2^{\bullet-}$, que la convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo (Kono et al., 1982).

Debido a la reacción de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones a causa de dichos radicales. Así se ha observado que enzimas tales como la papaína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e incluso la superóxido dismutasa, que dependen de estos aminoácidos para ser activas, son inhibidas en presencia de radicales libres. Las reacciones de los radicales con los aminoácidos mencionados, dan lugar a cambios estructurales en las proteínas, con formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares que desencadenan procesos de agregación molecular (Freeman y Grapo, 1982; Wolpp et al., 1986; Webster y Nunn, 1988; Stadtman 1992; Gebicki y Gebicki, 1993).

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido (Wolff y Dean, 1986).

Finalmente, la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que aumentan el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación del triptófano hasta H_2O_2 y N-formil kinurenina, un compuesto que, al reaccionar con grupos amino, provoca entrecruzamientos entre proteínas y lípidos (Nielsen, 1981; Freeman y Grapo, 1982; Stadtman, 1992).

3.2. Daño a lípidos

Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo y el oxígeno singlete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Halliwell y Gutteridge, 1984; Horton y Fairhurst, 1987; Gutteridge y Halliwell 1990; Aikens et al., 1991; Niki et al., 1991; Schaich, 1992; Choe et al. 1995; Choi y Yu, 1996).

Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena carbonada para formar un radical libre lipídico (L^{*}). Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando se origina el radical lipídico, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el O₂ y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido (Figura 8). El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y, por tanto, se afecta su capacidad funcional (Riceevans y Burdan, 1993).

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis (Blake et al., 1987; Southorn y Powis, 1988; Pryor y Church, 1991).

Introducción

Estos productos pueden alterar la actividad de la fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsecuente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos (Sevanian et al., 1981).

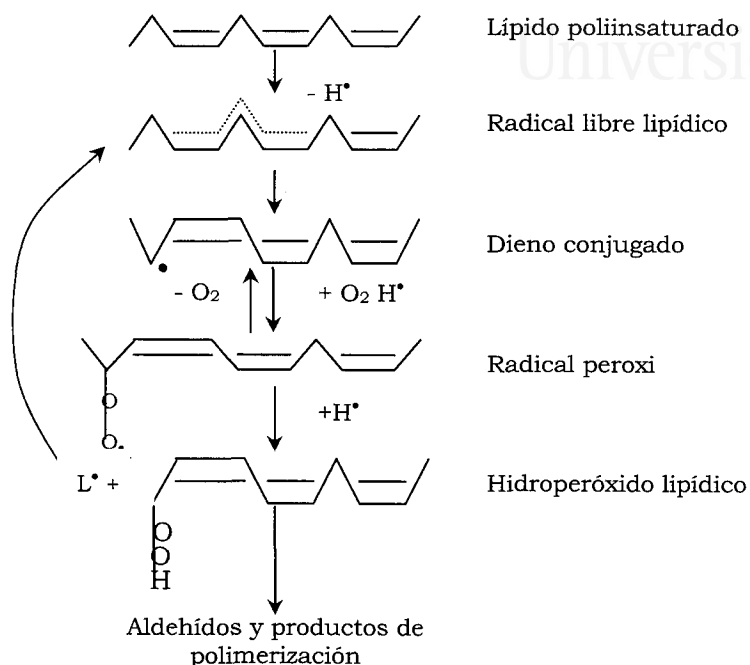


Figura 8. Esquema de la peroxidación lipídica (Martínez-Cayuela, 1998)

El malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana (Nielsen, 1981; Valenzuela, 1991). Así pues, las propiedades de las membranas aún resultan más alteradas.

3.3. Daño al ADN

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por radicales libres, cuya citotoxicidad se debe en gran parte a las aberraciones cromosómicas que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con dichos radicales, especialmente con el OH^{\bullet} (Demple y Linn, 1982; Webster y Nunn., 1988; Harman, 1992; Randerath et al., 1992; Higuchi y Linn, 1994).

Dichas modificaciones químicas de los nucleótidos provocan en muchos casos la ruptura de las cadenas de ADN. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien la célula muere (Hoffman et al., 1984; Cerutti, 1985; Imlay y Linn, 1988; Davies et al., 1990, Demple 1990). Así, por ejemplo, se ha comprobado que la ruptura del ADN que ocurre durante el estallido respiratorio, producido por los neutrófilos en respuesta a determinados estímulos, puede causar la muerte de estas células e inducir procesos autoinmunes (Birnboim y Kanabus-Kaminska, 1985; Martínez-Cayuela, 1995).

3.4. Daño a carbohidratos

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical OH^\bullet para producir sustancias reactivas (Sies, 1985; Blake et al., 1987). De igual forma, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, fragmentándose en unidades más pequeñas. Así, se ha demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones (Greenwald y Moy, 1980).

4. Apoptosis inducida por estrés oxidativo

La característica más sobresaliente de la apoptosis es que se trata de un mecanismo fisiológico de muerte celular que es necesario para mantener la plasticidad de los tejidos y eliminar las poblaciones celulares excesivas o que se tornan peligrosas. La apoptosis no causa daño secundario ni inflamación, pues la célula apoptótica se separa de las células vecinas y acaba fragmentándose en *cuerpos apoptóticos* que son eliminados por fagocitos del entorno. La necrosis, por el contrario, es un mecanismo patológico ligado a un daño celular extremo, que afecta a las células colindantes y provoca inflamación (Duke, 1992; Song y Steller, 1999).

Introducción

La apoptosis es un mecanismo fundamental para mantener la integridad de los organismos pluricelulares y su ejecución evita procesos patológicos como el cáncer, o las enfermedades autoinmunes (Cohen, 1997; Campisi, 2000). Por el contrario, en ciertas situaciones patológicas se ha demostrado que la apoptosis supone una pérdida irreparable de células necesarias para mantener una función óptima. Así se ha demostrado que muchas de las neuronas que desaparecen en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Nagy y Esiri, 1997; Wullner et al., 1999) y en los accidentes cerebrovasculares (Bennett et al., 1998) lo hacen por apoptosis. Las consecuencias patológicas de la apoptosis tienen lugar, aunque existen mecanismos de protección que confieren a las células fijas postmitóticas (como las neuronas y las células del miocardio) su mayor resistencia a sufrir apoptosis. Esta resistencia está modulada por proteínas implicadas en sistemas de transducción de señales como Bcl-2, y otras como Bax y Bad (Tamatani et al., 1998; Liu y Zhu, 1999).

4.1. Regulación de los mecanismos de muerte celular

Dado el papel fundamental que desempeñan los procesos de apoptosis y necrosis en la muerte neuronal que tiene lugar en las enfermedades neurodegenerativas y en el envejecimiento fisiológico (Nagy y Esiri, 1997; Bennett et al., 1998; Wullner et al., 1999), parece oportuno considerar algunos de los mecanismos que regulan ambos procesos y que se encuentran, en gran medida, ligados a la capacidad de autoduplicación de las células (Meikrantz y Schlegel, 1995). De acuerdo con este concepto, Campisi (1997) y Ly et al. (2000), investigaron la función de un elevado número de genes llegando a las siguientes conclusiones: primera, que al menos un 1% de todos los genes examinados sufren alteraciones dependientes de la edad, y segunda, que muchos de los genes alterados tienen relación con la proliferación celular.

No todas las células de un organismo tienen la capacidad de proliferar indefinidamente.

Además, la proliferación celular es un proceso cíclico que incluye diferentes etapas y que requiere la expresión coordinada de una serie de genes que codifican, por una parte ciclinas y quinasas dependientes de las ciclinas (cdk reguladas por diversos factores de crecimiento), y por otro, determinados productos génicos que actúan directa o indirectamente sobre los factores antes mencionados bien para desencadenar la proliferación (protooncogenes), o para inhibirla (genes supresores de tumores) (Schafer, 1998).

Entre los protooncogenes destaca el responsable de la proteína *ras*, relacionado con los mecanismos de transducción de señales, así como los genes *myc*, *fos* y *jun*, que codifican factores de transcripción, relacionados con la activación del ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento y con el desencadenamiento de cambios en el patrón de expresión génica responsable del control de los complejos ciclinas-cdk (Reddel, 1998). Entre los genes supresores de tumores destacan el gen *Rb*, responsable de la proteína del retinoblastoma, que actúa bloqueando determinados factores de crecimiento e impide que la célula pase de la etapa G1 a la etapa S (Kobayashi, 1996) y la fosfoproteína p53, que actúa como factor de transcripción sobre el gen responsable de la proteína p21, la cual, a su vez, inactiva la formación del complejo ciclina G1-cdk. Además, la proteína p53 tiene una probada capacidad apoptótica (Choisy-Rossi et al., 1998; Merino y Cordero-Campana, 1998). De hecho, tanto los protooncogenes como los genes supresores de tumores, junto a otros responsables de la puesta en marcha del propio proceso de destrucción celular, son los encargados de regular los mecanismos apoptóticos.

De forma muy general, y en relación con lo anterior, parece que existen dos grupos de genes responsables de la activación o represión del programa de apoptosis: los genes promueve y los genes provida. Los primeros codifican productos que activan la apoptosis a través de la inducción de un conjunto de genes como *bax*, *bad*, *bak*, *bik*, *nucl1*, *mec* y el sistema *fas/fasL* (Merino y Cordero-Campana, 1998; Jacotot et al., 1999; Nagata, 1999).

Introducción

Concretamente, se tiene evidencia de la actuación de *fas* en los mecanismos de desencadenamiento de muerte celular presentes en diferentes situaciones, como en los procesos neuro-degenerativos (Nagata, 1999). Entre los genes promuerte también se encuentran los responsables de las endonucleasas (que rompen el ADN) o los de las caspasas, cisteinproteinasas calciodependientes encargadas de la ejecución directa del programa de destrucción celular (Marks y Berg, 1999). También se incluye dentro del grupo de los genes promuerte, a los genes supresores de tumores, que inhiben la proliferación celular.

Los genes provida son responsables de inactivar los sistemas de destrucción celular, bien a través de la inhibición de caspasas y endonucleasas, o bien activando sistemas de protección celular (por ejemplo los enzimas antioxidantes). También a los protooncogenes *myc*, *fos* y *jun*, inductores de proliferación celular, se les considera genes provida. Además, genes como *survivin*, *naip* (Marks y Berg, 1999), y otros como *ced-9*, *bcl-2* y *bcl-x_L* son directamente responsables de inhibir el programa de muerte celular (Jacotot et al., 1999).

Desde el punto de vista del presente trabajo, lo esencial es que la apoptosis es inducida por una gran variedad de estímulos de entre los que destaca el estrés oxidativo (Clutton, 1997). Cuando aumentan las concentraciones de radicales libres, la célula sufre diferentes cambios bioquímicos y fisiológicos como la liberación de coenzimas y un agotamiento o inactivación de los sistemas de defensa y reparación celular. Si no se restablece el adecuado equilibrio estrés oxidativo/antioxidantes, se desencadenan diferentes procesos patológicos como peroxidación lipídica, pérdida de la homeostasis del calcio y una alteración de las rutas metabólicas que llevan a la eliminación de la célula por apoptosis (Slater, 1987).

5. Patologías relacionadas con el estrés oxidativo

Durante los últimos 40 años se ha implicado el estrés oxidativo en un gran número de enfermedades, que, como se indica en la Tabla 3, incluyen patologías que afectan al sistema nervioso central, aterosclerosis, y una variedad de procesos inflamatorios y enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento o factores nocivos del estilo de vida, como el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol (Martínez-Cayuela, 1995).

Síndromes degenerativos que afectan al S.N.C.

- * Alzheimer.
- * Parkinson

Procesos inflamatorios.

- * Artritis reumatoide
- * Asma
- * Colitis ulcerosa
- * Glomerulonefritis
- * Gota
- * Pancreatitis
- * Uveítis

Alteraciones causadas por tensiones anormales de oxígeno

- * Congelación
- * Estrés por ejercicio físico
- * Fibroplasia retrolental
- * Hipoxia
- * Isquemia-reperfusión
- * Úlcera duodenal

Alteraciones cromosómicas y cáncer.

- * Deficiencias enzimáticas
- * Enfermedad de Batten
- * Melanoma
- * Xeroderma pigmentosa

Otros síndromes

- * Aterosclerosis
- * Inmunodeficiencia
- * Enfermedades autoinmunes
- * Cataratas
- * Esclerosis múltiple
- * Hipertensión
- * Síndrome hemolítico del prematuro
- * Traumatismo cerebral

Reacciones tóxicas

- * Toxicidad de antibióticos
 - * Toxicidad del tabaco y el alcohol
 - * Toxicidad de xenobióticos
-

Tabla 3. Patologías relacionadas con el estrés oxidativo.

6. El envejecimiento biológico

Probablemente, el fenómeno biológico más importante ligado al estrés oxidativo es el envejecimiento, un proceso que siempre ha provocado gran interés y dado lugar a especulaciones sobre sus causas y sobre los factores que fijan un límite a la duración de la vida de los animales y de los humanos. Con el progreso de las ciencias experimentales en el siglo XIX empiezan a surgir teorías gerontológicas, con explicaciones parciales de los mecanismos del envejecimiento, centrándose en cada época en los aspectos de este proceso relacionados con los avances contemporáneos de la biología y de la medicina. Así, la investigación se ha ido desplazando desde el análisis estadístico de la longevidad de las poblaciones y la pérdida de rendimiento de los sistemas fisiológicos al presente auge de la gerontología celular y molecular (Miquel et al., 1984, Miquel y Fleming 1986, Miquel, 1990).

Puesto que el envejecimiento tiene lugar a todos los niveles de organización biológica, no puede sorprender que se hayan propuesto numerosas teorías gerontológicas para explicar las alteraciones que ocurren a los diversos niveles estudiados. Según Medvedev (1990), se han publicado cerca de 300 teorías del envejecimiento, aunque la mayoría ya sólo tienen un valor histórico, e incluso conceptos tan populares hace unos años, como la teoría del “*error catastrófico*” en la síntesis de proteínas, de Orgel (1963), y la del “*reloj mitótico*”, de Hayflick (1965), pierden apoyo. Por el contrario, las ideas sobre el papel que juegan en el envejecimiento los radicales libres (Harman, 1956) y la “toxicidad residual” del oxígeno (Gerschman, 1962) ganan un grado creciente de aceptación, aunque por sí solas son incapaces de explicar todos los efectos del envejecimiento y no ofrecen una explicación razonable de por qué aparecieron en la biosfera los organismos que envejecen, en contraste con la aparente inmortalidad de formas de vida más simple, como las bacterias y las amebas.

Por ello, la opinión más prevalente entre los gerontólogos es que aún no se dispone de todas las piezas del puzzle del envejecimiento y que éste no se resolverá hasta que aparezca una teoría general que integre todos los cambios que ocurren al envejecer en los diversos tipos celulares que forman los tejidos. A este fin puede contribuir una mejor comprensión de los factores que contribuyen a desencadenar el proceso de envejecimiento, como *etapa final no directamente programada pero inevitable del desarrollo*. A continuación resumiremos algunos de estos factores y luego revisaremos brevemente las teorías gerontológicas que ahora encuentran una mayor aceptación.

6.1. Factores que influyen en el envejecimiento.

Factores de crecimiento. La falta o escasez de determinados factores de crecimiento puede desencadenar la apoptosis ligada a la senescencia. Además, en el caso de las neuronas se ha comprobado que aquellas que no llegan a alcanzar sus dianas o no realizan los contactos adecuados durante el desarrollo se “suicidan” por apoptosis (Clarke et al., 1998). Posiblemente la falta de adecuada modulación por parte de determinados factores de crecimiento (complejos ciclinas) es uno de los motivos que conducen a la apoptosis. Además la falta de inducción de los genes responsables de la síntesis de determinados enzimas antiestrés (Taglialatela et al., 1998) así como de proteínas secuestradoras de calcio (como la calbindina) pueden también contribuir al desarrollo de la apoptosis (Lipton y Kalil, 1995). Y también, la falta de represión de la maquinaria de muerte celular por parte de determinados factores tróficos puede ser otro de los mecanismos implicados, dado que los principales enzimas que desencadenan la apoptosis (caspasas y endonucleasas), susceptibles de activación, están presentes en todas las células (Boonman y Isacson, 1999).

Introducción

Deficiencias en el suministro energético. Se sabe que el requerimiento de energía de las neuronas está muy por encima del de las otras células del organismo. Esto se debe a la necesidad de suministrar ATP continuamente a la bomba de Na^+/K^+ de su membrana celular, de cuyo funcionamiento dependen tanto la homeostasis iónica como el mantenimiento del potencial de membrana, de suma importancia en la fisiología neuronal.

De hecho, más del 40% del ATP producido por las mitocondrias neuronales se destina a este fin (Ames et al., 1992) y por ello los sustratos del proceso de fosforilación oxidativa (sobre todo la glucosa y el oxígeno) deben estar disponibles en abundancia en la neurona. Por otra parte, la hipoglucemia e hipoxia asociadas a los procesos de isquemia causan una inhibición de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto de la producción de ATP, con la consiguiente pérdida de función que a menudo acompaña al envejecimiento cerebral (Davis et al., 1997).

Excitotoxicidad. Son múltiples los factores que desencadenan la excitotoxicidad. Así, se ha observado que la pérdida de homeostasis iónica, la depleción de reservas energéticas, la isquemia, las lesiones traumáticas, las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento provocan despolarización excitatoria y, por consiguiente, liberación de neurotransmisores excitadores (Olney, 1994).

Se ha implicado fundamentalmente al receptor NMDA como responsable de la puesta en marcha del proceso de toxicidad que puede tener lugar mediante dos vías diferentes (Auer, 1991). La primera de ellas, denominada de “excitotoxicidad aguda”, es provocada por agonistas glutaminérgicos y se asocia con la entrada masiva de Na^+ , Cl^- y H_2O en la célula, con aumento del volumen celular y consiguiente edema excitotóxico que puede llevar a la lisis osmótica de la célula y, por consiguiente, a su muerte necrótica.

Por otra parte, en la “excitotoxicidad retardada” interviene una elevación del calcio citosólico, que a su vez activa una serie de enzimas calcio-dependientes como la fosfolipasa A2, proteinasas, endonucleasas y óxido nítrico sintasa (Strolin-Benedetti et al., 1993). Todos estos enzimas desencadenan cascadas metabólicas que en última instancia pueden provocar daño y muerte celular por apoptosis. Además, se ha observado que el proceso da lugar a una inhibición de la síntesis de proteínas y que también tiene un importante papel patogenético el aumento en la producción de radicales libres (Schoneich, 1999).

Pérdida de la homeostasis del calcio. El aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico activa determinados enzimas Ca^{2+} -dependientes como son las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y la propia NOS, todas ellas implicadas en la ejecución del programa de muerte celular (Chakraborti et al., 1999). Estos aumentos de la concentración de Ca^{2+} -citosólico son causados por el influjo de Ca^{2+} -extracitosólico que penetra por canales acoplados a receptores regulados por voltaje o agonistas, como es el caso de los receptores de glutamato o NMDA (Mills, 1996). Cuando el Ca^{2+} penetra en la célula, ésta tiende a estabilizar el aumento de su concentración mediante captura y almacenamiento del catión en depósitos intracelulares tales como el retículo endoplasmático y los calciosomas, utilizando para ello bombas metabólicas dependientes de ATP. La mitocondria también almacena calcio mediante un transportador de tipo uniportador dependiente de voltaje, de su membrana. No obstante, la captura de calcio por los orgánulos citados puede ser ineficaz si persisten los mecanismos que causan su entrada en la célula.

Por ejemplo, la unión de glutamato a NMDA no sólo provoca la apertura de canales de calcio sino que también activa la fosfolipasa C de la membrana, que transforma el inositol bifosfato en inositol trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato abre canales de calcio en el retículo endoplasmático, y el mismo aumento de los niveles de calcio causa la apertura de canales en los calciosomas, lo que lleva a un flujo masivo del catión desde sus depósitos intracelulares hacia el citosol (Paschen y Doutheil, 1999).

Introducción

Sin embargo, no son éstas las únicas causas de los altos niveles de Ca^{2+} citosólico, pues la mitocondria también desempeña un importante papel (Rustin et al., 2000). Así, como ya se ha mencionado, este orgánulo también actúa como reservorio de Ca^{2+} , el cual penetra en su interior gracias a un transportador que funciona ininterrumpidamente mientras se mantenga el potencial de membrana mitocondrial. El Ca^{2+} citosólico que entra en la mitocondria es utilizado para la activación de determinadas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, y su salida de la mitocondria (por un mecanismo de cotransporte) permite la introducción simultánea de Na^+ desde el citoplasma al interior del orgánulo. A su vez, el Na^+ mitocondrial es cotransportado de nuevo al hialoplasma permitiendo la entrada de H^+ al interior mitocondrial. Se crea, de esta forma, un gradiente de H^+ que resulta imprescindible para que puedan darse las condiciones que permiten el desarrollo del proceso de fosforilación oxidativa, es decir, de generación de energía en forma de ATP. Así, es sabido que una ATPsintasa presente en la membrana mitocondrial utiliza la energía almacenada en el gradiente de protones para generar ATP. Sin embargo, todo este sistema puede desequilibrarse como consecuencia de la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial (Sugrue et al., 1999). La pérdida de potencial se debe fundamentalmente a que en la mitocondria puede abrirse, de forma más o menos transitoria, un poro que de forma inespecífica deja salir hacia el hialoplasma iones y moléculas inferiores a 1,5 kDa, entre ellos Ca^{2+} . De esta forma se disipa el potencial de membrana y la ATPsintetasa puede también funcionar a la inversa consumiendo ATP en lugar de generarlo. Aunque se especula con las causas que provocan la apertura del poro mitocondrial, se conocen ya algunos aspectos indicativos del posible mecanismo regulador. Así, se ha comprobado que el inmunosupresor ciclosporina A impide la apertura del poro, mientras que, por el contrario, elevadas concentraciones de Ca^{2+} citosólico así como el estrés oxidativo activan su apertura (Cassarino y Bennett, 1999).

La pérdida del potencial de membrana mitocondrial no sólo implica un descenso en la producción de energía, sino que también lleva a la pérdida de la homeostasis celular, aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico y resultante autoalimentación de un proceso que acaba provocando la muerte celular necrótica o apoptótica.

6.2. Teorías sobre las causas del envejecimiento normal.

6.2.1. Teoría del “envenenamiento” por los radicales libres de oxígeno

Esta teoría fue propuesta por Rebeca Gerschman, a partir de sus estudios sobre el aumento de los efectos lesivos de la radiación ionizante en presencia de oxígeno y el efecto protector de la falta de este gas (Gerschman et al., 1954). Según esta autora, el efecto sinérgico de la radiación y el oxígeno (*oxygen effect*) se debe al aumento que causa este gas en la concentración intracelular de radicales de oxígeno, que se suman a los radicales que derivan de la irradiación. Esto la llevó a deducir que el oxígeno que se usa en el metabolismo desencadena el envejecimiento (a través de la formación de radicales libres) debido a que las defensas antioxidantes del organismo no contrarrestan totalmente el ataque oxidativo.

6.2.2. Teoría de los radicales libres

Según esta teoría, muy similar a la de Gerschman, los radicales libres no sólo pueden causar el envejecimiento sino también otros procesos degenerativos, como el cáncer, la arteriosclerosis, la amiloidosis y la inmunodeficiencia. Según Harman (1956), tanto la senescencia como estos síndromes son el resultado de las reacciones nocivas de los radicales libres que tienen lugar continuamente a través de las células y de los tejidos.

Introducción

Además, Harman implica en su teoría de los radicales libres a la evolución afirmando que “según parece, la vida surgió como resultado de reacciones de radicales libres, seleccionó reacciones de radicales libres para jugar un papel en el metabolismo y aseguró la evolución empleando estas reacciones para causar mutaciones y la muerte” (Harman, 1981).

6.2.3. Teoría mitocondrial del envejecimiento

Esta teoría propuesta por Miquel et al. en 1980 liga el envejecimiento celular a un daño producido por el estrés oxidativo a nivel mitocondrial. Se trata de un concepto de daño genético/bioenergético, pues los autores afirman que “el envejecimiento celular está ligado a lesiones del genoma mitocondrial por radicales libres que se forman en la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial interna”. A causa del entorno mutagénico y relativa falta de protección del genoma mitocondrial (que carece de histonas y de mecanismos de reparación por escisión y recombinación), las mitocondrias pierden con el paso del tiempo su información, lo que impide la renovación de estas organelas y lleva a su desorganización y consiguiente pérdida de síntesis de ATP y de función fisiológica (Miquel, 1992).

Esta teoría es compatible con los más importantes conceptos gerontológicos como el del “desgaste de las células somáticas como efecto secundario de su trabajo fisiológico” (Weissman, 1891), la teoría del envejecimiento como “efecto secundario” de la diferenciación celular (Minot, 1907), así como el concepto antes resumido de la “toxicidad residual del oxígeno” (Gerschman, 1954) y la teoría de Harman (1956), que define al envejecimiento como la “suma de las lesiones resultantes del ataque de los radicales libres que se producen constantemente en el organismo”.

Según Miquel (1992), al centrarse en el *genoma mitocondrial de las células diferenciadas* como la diana más probable de los oxi-radicales derivados del metabolismo aerobio, la teoría mitocondrial puede integrar todos

los conceptos gerontológicos mencionados anteriormente, para ofrecer una explicación razonable de las alteraciones que ocurren al envejecer *a todos los niveles de organización biológica*.

6.2.4. Teoría de la mutación genética

La clave para entender el proceso de envejecimiento desde el punto de vista de la evolución biológica es encontrar un mecanismo que explique cómo y por qué se desencadenan los cambios funcionales, estructurales y moleculares que ocurren con el paso del tiempo.

De acuerdo con la teoría del “reloj mitótico” (Hayflick, 1965), el límite de la capacidad de división celular podría depender de la pérdida de genes que inducen, como *fos*, la proliferación de las células (protooncogenes). Según trabajos más recientes, se considera que la senescencia deriva de un programa genético que empieza a ejecutarse con el desarrollo (etapa prenatal y postnatal), continúa en el adulto y culmina, tras la etapa reproductora, en la vejez (Finch, 1990; Johnson, 1997; Kirkwood, 1998). De hecho, empiezan a conocerse toda una serie de genes, denominados *gerontogenes*, que guardan una estrecha relación con la esperanza de vida de los animales de distintas especies (Rose, 1994; Longo, 1999; Gems, 1999). La actividad de estos genes está modulada por numerosos estímulos, tanto externos como internos, que actúan desencadenando cascadas de señales que inducen o reprimen su expresión y que, por consiguiente, aceleran o retrasan el desarrollo del programa genético que conduce a la senescencia. Se tiene conocimiento de que algunos de estos genes están mutados en los miembros de familias que padecen enfermedades degenerativas como la progeria y la enfermedad de Alzheimer (Welsh, 1975; Mills y Weills, 1990; Pérez-Tur, 2000). Sin embargo, aunque es evidente que los genes están implicados en patologías neurodegenerativas, aún se desconocen sus mecanismos específicos de actuación con respecto al envejecimiento.

Introducción

Por otra parte, existe una serie de genes con una implicación más directa en los fenómenos de senescencia normal y muerte celular, cuya función y la de los productos que codifican se conocen mejor gracias a los estudios realizados en modelos de envejecimiento más sencillos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Jazwinski, 1999), el pequeño nematodo del suelo *Caenorhabditis elegans* (Johnson, 1997; Vanfleteren y Braeckman, 1999) y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Rose, 1999). Son especialmente interesantes los trabajos del grupo de Horvitz (1999) en *Caenorhabditis elegans*. Esta investigación demostró que durante el desarrollo de este organismo “se suicidan” 132 células de las 1090 que tiene la larva, y que el mecanismo de muerte apoptótica también opera en procesos fisiológicos de recambio celular en los tejidos del organismo adulto. Como ya hemos indicado, esta muerte celular apoptótica está genéticamente programada, a diferencia de la muerte celular necrótica, no programada o patológica (Horvitz, 1999).

6.2.5. Relevancia gerontológica de los estudios sobre telómeros y telomerasa

Desde los años 30 se sabe que los cromosomas no se fusionan con otros cromosomas rotos gracias a la presencia de una estructura protectora al final del cromosoma, denominada telómero (Müller, 1938). Más recientemente se demostró que los telómeros son repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG y proteínas asociadas (Blackburn, 1991), así como el sitio de unión de las proteínas que reparan roturas de la doble hélice del ADN (Bianchi y De Lange, 1999; Hsu et al., 1999).

Aunque la relevancia gerontológica de los datos sobre telómeros y telomerasa es objeto de controversia, lo más relevante desde el punto de vista de la senescencia es que cada vez que la célula se divide, los telómeros se acortan con la consiguiente pérdida de información genética que reside en las secuencias repetidas TTAGGG (Gems, 1999).

Este acortamiento no ocurre en células como las germinales o las cancerosas gracias a la presencia en las mismas de la telomerasa, un enzima que repone las zonas de ADN perdidas y confiere a las células que la poseen un fenotipo inmortal (Campisi, 1997). El envejecimiento tampoco tiene lugar en especies en las que todas las células de sus sujetos adultos (incluidas las neuronas) están sometidas a un continuo recambio, como ocurre por ejemplo en las hidras de agua dulce (Martinez, 1998).

La pérdida de función telomérica que ocurre en las células de los humanos, al envejecer, puede deberse a una disminución progresiva de las secuencias repetidas TTAGGG con el creciente número de mitosis que tienen lugar con el paso del tiempo, o a una pérdida o mutación de las proteínas teloméricas (Van Steensel et al., 1998; Samper et al., 2000; Goytisolo et al., 2001). En todo caso la pérdida de función telomérica da lugar a fusiones cromosómicas (Blasco et al., 1997; Hande et al., 1999), dificultades en la separación de los puentes de anafase e inestabilidad cromosómica general, que causa la pérdida de viabilidad celular y puede tener un importante papel no sólo en el envejecimiento sino también en el cáncer y reparación de lesiones del ADN (Autexier y Greider., 1996; Goytisolo et al., 2000; Wong et al., 2000).

A pesar del indudable interés de los mecanismos relacionados con los telómeros y la telomerasa en los procesos de mitosis y diferenciación celular, Carlson y Riley (1998) afirman que no está demostrado que estos mecanismos (investigados en células mantenidas en cultivos celulares) se relacionen con el envejecimiento del organismo, ya que incluso en tejidos con alto reaprovechamiento, los mamíferos no mueren como resultado del agotamiento de su potencial mitótico. De forma similar, opinan Goyns y Lavery (2000): “Muchas células del cuerpo no proliferan regularmente y por tanto no se acortan sus telómeros... No hay correlación entre la longitud de los telómeros y la longevidad máxima de las distintas especies... Para valorar la importancia de la telomerasa en el proceso del envejecimiento es esencial considerar la situación *in vivo*, que es más relevante que cultivar fibroblastos en placas de Petri”.

Introducción

De acuerdo con estas opiniones, los estudios sobre los telómeros y la telomerasa no restan relevancia a las opiniones de Minot (1907) sobre la estrecha relación entre diferenciación y envejecimiento. Por ello actualmente se presta gran atención al estudio de los mecanismos del envejecimiento *in vivo*, especialmente el de las neuronas y otras células diferenciadas (Miquel, 2002).

6.3. Concepto integrador de teorías clásicas y modernas

Según hemos resumido, se han propuesto diversas teorías dirigidas fundamentalmente a explicar los cambios que ocurren al envejecer a los distintos niveles de organización (de la población a las macromoléculas). Puesto que ninguna teoría proporciona una explicación satisfactoria de todos los aspectos del envejecimiento, la tendencia actual es la de unificar los conceptos clave en una teoría integradora. Como ya hemos comentado, numerosos datos apoyan el concepto de que el agente patogénico es el ataque por los radicales de oxígeno y la principal diana de dicho ataque es el genoma mitocondrial de las células diferenciadas. Según Miquel (1998), este concepto ayuda a integrar las teorías clásicas (que destacaban el papel desorganizador del metabolismo aerobio y la pérdida de capacidad regenerativa ligada a la diferenciación celular) con el presente interés en el estrés oxidativo y sus efectos sobre la información genética nuclear y mitocondrial.

En resumen, desde el punto de vista de la evolución biológica el envejecimiento es el resultado de la aparición de células, como la neurona, que por su alto consumo de oxígeno y nula o escasa capacidad de regeneración integral (a través de la mitosis) acumulan lesiones peroxidativas que disminuyen su capacidad bioenergética y funcional y son por ello el “talón de Aquiles” de los organismos multicelulares (...) Las células que forman los tejidos somáticos primero siguen un programa genético de diferenciación y luego se desorganizan como resultado del desgaste por estrés oxidativo mitocondrial y de su pérdida de mecanismos de regeneración subcelular integral” (Miquel, 1998).

7. Principales enfermedades oculares asociadas con el estrés oxidativo y el envejecimiento

El envejecimiento ocular se acompaña de numerosos cambios a nivel funcional, bioquímico y estructural. Entre los más relevantes se encuentran la pérdida de transparencia del cristalino, con el consiguiente descenso de la capacidad de acomodación y de la agudeza visual, proceso denominado cataratas (Falt, 1992). Durante varias décadas se han estudiado las alteraciones bioquímicas relacionadas con la formación de cataratas llegando a la conclusión de que la cataratogénesis es un proceso complicado y multifactorial, íntimamente ligado al envejecimiento y probablemente iniciado por el estrés oxidativo (Berman, 1991). También parece jugar un papel muy importante el estrés oxidativo en la patogénesis de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). En el presente estudio nos hemos centrado en un modelo relevante para aclarar mecanismos patogénicos ligados a la DMAE, un proceso de gran importancia por la amenaza que supone a la calidad de vida de las personas mayores, del que trataremos brevemente a continuación.

7.1. Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)

Puesto que el área macular de la retina es responsable de la visión de alta resolución y de la visión en color, las alteraciones de este área llevan a importantes pérdidas de visión e incluso a la ceguera permanente.

Las lesiones degenerativas de la mácula que ocurren al envejecer pueden ser secundarias a cambios vasculares. El proceso básico probablemente está relacionado con alteraciones en la permeabilidad de los capilares retinianos o de los coriocapilares (debido a una exudación subretiniana e intraretiniana), o con una estenosis de los pequeños vasos adyacentes a la mácula, con resultante atrofia del EPR (Klein et al., 1989).

Por otra parte, la degeneración progresiva del EPR es el factor más decisivo en el desarrollo de la enfermedad, debido a su estrecha relación con los fotorreceptores, tanto en el aspecto nutricional como metabólico, por lo que

Introducción

la alteración progresiva del EPR trae consigo la degeneración progresiva de conos y bastones, esenciales para la función visual (Zarbin, 1998; Adler et al., 1999).

8. Modelos para el estudio del estrés oxidativo y envejecimiento.

8.1. Epitelio pigmentario de retina como modelo de envejecimiento celular *in vitro*

Los estudios *in vivo* sobre la DMAE son difíciles y costosos, porque los únicos animales de experimentación que poseen una mácula bien desarrollada son los primates. Por ello, los cultivos *in vitro* de EPR son considerados idóneos para la realización de investigaciones para la inducción de daño por estrés oxidativo y envejecimiento celular (Matsunaga et al., 1999; Cai et al., 2000). Para la mejor comprensión de este modelo *in vitro*, que es el que hemos utilizado en el presente estudio, resumimos a continuación sus principales características histológicas y fisiológicas.

El EPR es una monocapa de células epiteliales con forma hexagonal de origen neuroectodérmico que se encuentra situado entre la red coriocapilar y la capa de fotorreceptores de la retina. La presencia de esta capa celular en el ojo juega un papel crucial en la preservación del sistema visual (Berman, 1991), ya que constituye junto con los capilares de la retina neural, la barrera hemato-retiniana (Wislocki y Ladman, 1955), desempeñando un importante papel en el control del intercambio de material entre los capilares y la retina neural.

Entre las principales funciones del EPR, además del mantenimiento de la barrera hemato-retiniana y del espacio subretinal (Shakib y Cunha-Vaz, 1966), se puede destacar la necesidad de su presencia durante la embriogénesis para el eficaz desarrollo de los fotorreceptores (Mund y Rodrigues, 1979), el reconocimiento y fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores que han sido desechados (Bok y Young., 1979) y el trans-

porte activo de metabolitos desde y hacia la retina (Steinberg y Miller. 1979). Otra función importante del EPR es la recepción, transporte, almacenamiento y metabolismo de la vitamina A (Rapp y Anderson, 1983).

Se trata de un tejido que constantemente sufre estrés oxidativo ya que en él los radicales libres son generados por diferentes causas, entre ellas una elevada concentración de O₂ en la zona de la mácula (Alder et al., 1985) así como el estar sometido a una intensa iluminación (Dorey et al., 1989), que desencadena el proceso de peroxidación lipídica (Tate et al., 1995). Por otra parte, está expuesto a un adicional estrés oxidativo debido a su función de fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (Kennedy et al., 1994). Por todo ello, el EPR puede considerarse como un excelente modelo para el estudio del papel de los radicales libres de oxígeno en el envejecimiento celular.

Un indicio de que la DMAE ligada al estrés oxidativo efectivamente ocurre en el EPR es la acumulación del pigmento del envejecimiento *lipofuscina*, como resultado de la degradación de los componentes de los segmentos externos de los fotorreceptores que han sido fagocitados. La lipofuscina puede estar relacionada con una disminución de la actividad lisosomal del epitelio, así como con la degradación de las membranas mitocondriales que han sufrido las consecuencias crónicas del estrés oxidativo (Holz et al., 1999).

8.2. Ratones OF1 como modelo de envejecimiento *in vivo*

La mayoría de los estudios de gerontología experimental *in vivo* se han realizado en ratas y ratones de laboratorio. Estos estudios son útiles para poner a prueba las hipótesis sobre los mecanismos fisiológicos, genéticos y bioquímicos asociados al envejecimiento normal y patológico, así como la eficacia de las intervenciones experimentales que se realizan para aumentar la longevidad.

Introducción

Un importante resultado de estos estudios en roedores es que existen diferencias significativas entre la “edad biológica” y la “cronológica” de animales de la misma cohorte y que, según Collier y Coleman (1991), “estas diferencias aportan datos útiles para estudiar los mecanismos del *envejecimiento normal, envejecimiento óptimo, envejecimiento anormal y enfermedad*”. Estos autores también comentan que algunos roedores viejos muestran valores de ciertos parámetros prácticamente idénticos a los de los animales jóvenes y, por ello concluyen que “la edad cronológica, como único parámetro, es una medida insuficiente y a menudo equívoca”.

Lo anterior justifica los estudios en ratones para investigar las relaciones entre radicales libres, edad cronológica y edad biológica, así como la utilidad de los tratamientos para conseguir que un mayor número de animales muestren un “envejecimiento óptimo”.

De acuerdo con estos conceptos, en las décadas de los setenta y los ochenta el laboratorio de Miquel estandarizó métodos de valoración de los tratamientos antioxidantes en ratones macho de la cepa C57BL/6J. Estos métodos de determinación de “edad biológica” se basan en el análisis de las curvas de longevidad, de los valores de la coordinación muscular y vigor (determinados mediante la prueba de la cuerda tirante; Miquel y Blasco, 1978), de la distribución de los valores del peso corporal (Miquel y Economos, 1979) y del consumo diario de pienso (Miquel, 1983). Métodos similares, adecuados para investigar la reacción de ratones de varias cepas a la ingesta de suplementos antioxidantes, han sido utilizados por De Juan (1994), De la Fuente et al. (1998b), Pallardó et al. (1998), Ingram y Jucker. (1999) y Correa et al. (1999).

Una técnica complementaria de valoración conductual (estandarizada en ratones hembra OF1) permite clasificar a los ratones en “rápidos” o “lentos” según su actividad exploratoria espontánea cuando se les coloca en un laberinto en forma de T (De Juan, 1994).

Como sucede con otros parámetros de rendimiento fisiológico, la actividad exploratoria espontánea (valorada por el test del laberinto en T) disminuye con la edad. Así, mientras que la mayoría de los ratones jóvenes (de 3-4 meses de edad) son capaces de completar la exploración del primer brazo del laberinto en forma de T en menos de 20 segundos, con el envejecimiento un número creciente de ratones exploran el laberinto muy lentamente o incluso permanecen inmóviles, mostrando la denominada “*freezing behavior*” por Gilad y Gilad (1995). Esta conducta refleja una función deficiente de las áreas del sistema nervioso central (SNC) que determinan la respuesta a factores ambientales estresantes.

La respuesta inadecuada a estos factores (asociada con un alto grado de ansiedad) es una de las características más típicas del envejecimiento (Stein-Behrens y Spolsky, 1992), por lo cual se puede concluir que los ratones que no pasan la prueba del laberinto en 20 segundos (“ratones lentos”; *RL*) están prematuramente envejecidos en lo que respecta a ciertas funciones de su SNC en comparación con los animales de la misma edad que pasan la prueba con éxito (“ratones rápidos”; *RR*). De acuerdo con este concepto, el porcentaje de supervivencia a edades avanzadas es mayor para los *RR* (que completan la prueba en un tiempo menor de 20 segundos) que para los *RL*.

Según De la Fuente et al. (1998b), los *RL* tienen un sistema inmunológico menos competente (en cuanto a la función de linfocitos y macrófagos) que los *RR*. Por otra parte, según Correa et al. (1999), este efecto del envejecimiento sobre los *RL* puede ser contrarrestado por la administración del antioxidante TP, que no sólo estimula la actividad fagocítica sino que neutraliza el estrés oxidativo, a juzgar por el descenso en el nivel de radical superóxido extracelular en las suspensiones de macrófagos.

Otro estudio sobre la relación entre envejecimiento y conducta en ratones *BALB/c* y *OF1* muestra que tanto los machos como las hembras rápidos de estas dos cepas tienen una mayor longevidad que los *RL* (Guayerbas et al., 2002).

Introducción

Además, los *RR* en la prueba del laberinto (de las dos cepas y sexos) también muestran un mejor rendimiento que los *RL* en la otra prueba psicomotora, es decir la que valora la coordinación neuromuscular y el vigor en la cuerda tirante según el método de Miquel y Blasco (1978).

Más recientemente, la utilidad de la prueba del laberinto en forma de T para estudios gerontológicos ha sido confirmada por Guayerbas et al. (2002), pues según los datos obtenidos en un estudio longitudinal del envejecimiento de ratones hembra *OF1* el bajo rendimiento en el laberinto de los *RL* no sólo predice una menor longevidad (en comparación con la de los *RR*) sino que se acompaña de una menor competencia de sus sistemas inmunitario y neuromuscular y de alteraciones neuroquímicas en ciertas áreas del SNC.

Los estudios de Ferrandiz et al. (1994) y de Miquel et al. (1995) confirman que los ratones hembra *OF1* son también muy adecuados para investigar los efectos del envejecimiento y de la ingesta de antioxidantes tiólicos sobre la bioquímica mitocondrial.

De acuerdo con todas las investigaciones resumidas aquí, hemos escogido el ratón hembra *OF1* como el modelo más adecuado para profundizar en los estudios sobre el efecto protector de los antioxidantes tiólicos NAC y TP contra el estrés oxidativo *in vivo* así como contra el deterioro de la conducta y de otros parámetros fisiológicos y bioquímicos que tiene lugar al envejecer.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

OBJETIVOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

El objetivo principal de este trabajo es estudiar los efectos antioxidantes de NAC y TP sobre células de EPRb y ratones OF1. A partir de este estudio se podría plantear la posibilidad de utilizarlos como suplemento antioxidante apropiado para futuros ensayos clínicos en humanos con síntomas de envejecimiento prematuro ligados a altos niveles de estrés oxidativo, para lo cual se proponen dos modelos de estudio sobre el envejecimiento, uno *in vitro* y otro *in vivo* con los siguientes objetivos concretos:

Modelo de envejecimiento celular *in vitro*

1. Investigar el daño celular producido por la exposición del EPRb al peroxinitrito y a otros agentes químicos inductores de estrés oxidativo, así como por incubación del EPRb en atmósferas con bajo contenido de oxígeno.
2. Estudiar si la suplementación del medio con vitamina C, NAC o TP protege contra los mencionados procesos patológicos.

Modelo de envejecimiento *in vivo*

1. Estudio de diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos indicadores de envejecimiento.
2. Investigar si la administración de antioxidantes, NAC y TP a partir de una edad avanzada protege contra el descenso ligado a la senescencia.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

MATERIAL Y MÉTODOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Material

1.1. Material biológico

Para los estudios in vitro se utilizaron cultivos primarios en monocapa de las células del epitelio pigmentario de retina bovina (EPRb), para el aislamiento de las células del EPRb se utilizaron de 6 a 8 ojos de reses bovinas recién sacrificadas en el matadero municipal de Alicante, que fueron transportados al laboratorio en un frasco de vidrio estéril sumergido en hielo.

Para los estudios in vivo se utilizaron ratones hembras vírgenes de la cepa OF1 (albino tipo Swiss). Fueron mantenidos en el estabulario de la Universidad de Murcia en jaulas para ratones, 7 por jaula, en condiciones ambientales estables de ciclo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Los animales fueron alimentados con pienso de mantenimiento para rata/ratón de B&K y agua *ad libitum*.

1.2. Reactivos

PBS, DMEM, Suero Fetal Bovino, Tripsina fueron suministrados por Gibco BRL (Life Technologies, Paisley, Scotland).

Vitamina C, N-acetil-cisteína, Ácido tiazolidín carboxílico o tioprolina, Hoechst 33258, Oligomicina, Ácido iodoacético, Cianuro sódico fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO. EE.UU.).

El Peroxinitrito fue suministrado por Alexis Biochemicals (San Diego, EE.UU.).

Todo el material de cultivos fue suministrado por Costar (Cambridge, Inglaterra).

El Kit de ATP "ATP bioluminiscence Assay kit HS II" fue suministrado por Boehringer Mannheim.

El resto de material y reactivos cuyo origen no se ha especificado fueron de grado analítico suministrados por Sigma, Merck o Panreac.

Material y Métodos

1.3. Aparataje

- Balanza (Salter electroscale KE-120).
- Balanza de precisión Salter-ADN modelo ER-60.
- Centrífuga de sobremesa (Eppendorf modelo 5403).
- Centrífuga refrigerada (Beckman J-21 con un rotor JA-20).
- Electrodo de oxígeno de Clark (SYS203, INSTECH).
- Espectrofotómetro Hitachi, modelo U-2.000.
- Homogenizador "Potter S" de Teflon-vidrio (Braun, Biotech International).
- Incubador BB16 (Heraeus, Alemania).
- Luminómetro LKB Wallac, modelo 1250 Luminometer.
- Microscopio invertido de fluorescencia (Leica DM IRB/E).
- Sistema de electroforesis en gel de agarosa, Minicell EC370M, EC 135 (E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida).
- Video-cámara Sony modelo DCR-PC-1.

2. Métodos de los estudios *in vitro*

2.1. Cultivo de células del epitelio pigmentario de retina

2.1.1. Cultivos primarios

El periodo desde la obtención de los ojos de reses bovinas del matadero municipal de Alicante, hasta el comienzo del procedimiento de aislamiento en la unidad de cultivos fue inferior a dos horas.

Las células se aislaron siguiendo el método propuesto por Luo et al. (1996) con algunas modificaciones. En primer lugar se lavaron los ojos con tampón fosfato salino de Dulbeco (PBS) estéril que contenía 50 µg/mL de gentamicina y 2,5 µg/mL de amfotericina B. Se diseccionó el ojo y la porción anterior fue desechada, permaneciendo intacta la copa óptica. Se eliminaron el cristalino, el humor vítreo y la retina. El EPRb se recogió con pinzas, cortando por donde no se desprendía y se colocó en una placa Petri estéril. Se incubó durante 20 min a 37 °C con 5 mL de una solución estéril de tripsina-EDTA (tripsina 1:250 0,05% y EDTA 0,54 mM) para así poder disociar las células. Transcurrido el período de incubación, se detuvo la acción de la tripsina con 10 mL de medio de cultivo consistente en una mezcla de medio Dulbeco modificado por Eagle (DMEM), suplementado con 3,2 g/L de bicarbonato sódico, 50 µg/mL de gentamicina, 2,5 µg/mL de amfotericina B, a pH 7,2, completado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (desactivado previamente a 56°C durante 45 minutos). A continuación se trasvasaron las muestras a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 1000xg durante 10 min en una centrifuga de sobremesa eliminando los sobrenadantes. Las células se resuspendieron en medio de cultivo y la suspensión celular resultante se sembró en botellas T-125 de la marca "Costar" (Figura 9).

Los cultivos de EPRb se mantuvieron en un incubador a 37°C, en una atmósfera húmeda que contenía un 5% de CO₂, hasta que alcanzaron la confluencia (7-10 días). Durante este tiempo se cambió el medio cada dos días.

La confluencia se define como el momento a partir del cuál las células cubren toda la superficie de la botella, cambiando su morfología.

Material y Métodos

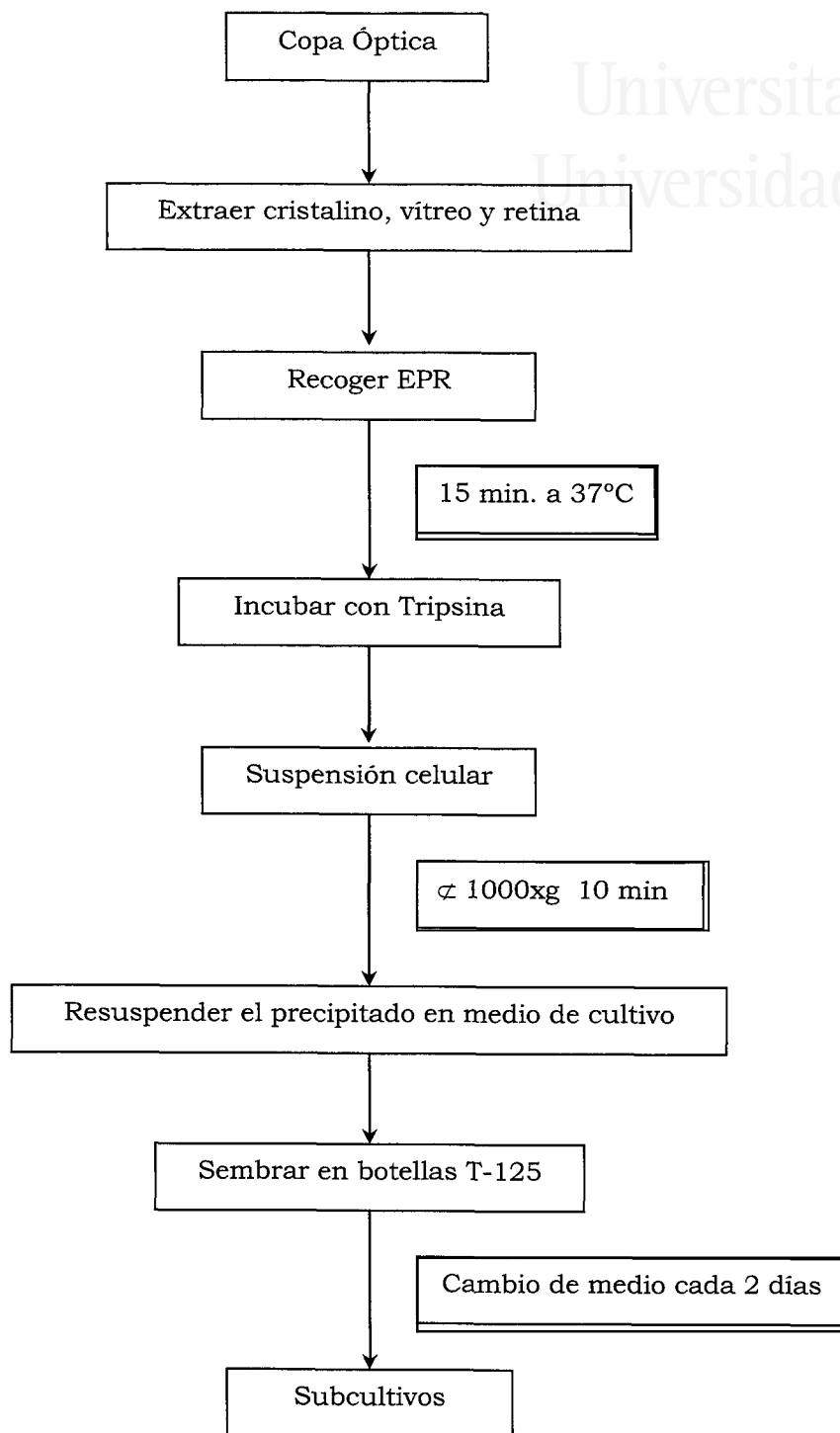


Figura 9. PROTOCOLO DE CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE EPITELIO PIGMENTARIO DE RETINA BOVINA.

2.1.2. Subcultivos

Una vez que las células de EPRb alcanzaron la confluencia, se realizaron subcultivos. Para ello, primero se lavaron dos veces las botellas de los cultivos con 10 mL de PBS estéril y posteriormente se incubaron con 10 mL de una solución de tripsina-EDTA a 37°C y 5% de CO₂ durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se detuvo la acción de la tripsina añadiendo 10 mL de medio de cultivo.

Las células fueron despegadas de las botellas con la ayuda de un raspador estéril de plástico, se recogieron en un tubo cónico de centrifuga y se centrifugaron a 1.000xg durante 10 minutos en una centrifuga de sobremesa. El precipitado celular resultante se resuspendió en 15 mL de medio de cultivo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones con el fin de eliminar restos de tripsina. El precipitado celular obtenido de cada botella en esta segunda centrifugación se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo y se sembró en dos botellas T-125. Estas células fueron mantenidas en las mismas condiciones de incubación y cambio de medio que las células del cultivo primario hasta que alcanzaron la confluencia (entre 7 y 10 días).

De cada cultivo primario se realizaron tres subcultivos consecutivos, con la suspensión celular final obtenida tras el tercer subcultivo, se realizaron las diluciones adecuadas para sembrar en placas de 6 pocillos (150.000-200.000 células/pocillo) o en botellas de 75 cm² (1,5-2 millones de células/botella).

El recuento del número de células y el porcentaje de viabilidad de las mismas se determinó tomando una alícuota de la suspensión final y mezclándola a igual volumen con una solución al 0,04% de azul tripán. El rendimiento medio de las preparaciones celulares obtenidas a partir de 6-8 ojos de reses bovinas fue de 4 a 5 millones de células.

En todos los experimentos se utilizaron cultivos celulares confluentes tras un cuarto pase de tripsina.

2.2. Inducción del daño celular por estrés oxidativo

Se utilizaron diferentes condiciones experimentales con el fin de exponer las células de EPRb a un estrés oxidativo. Se utilizaron las células de EPRb que habían sido sembradas en placas de 6 pocillos.

2.2.1. Inducción de estrés oxidativo por agentes químicos

En primer lugar se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se lavaron las células dos veces con tampón salino (NaCl 145mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1,5mM, MgCl₂ 1mM, NaH₂PO₄ 1mM, glucosa 5,6mM, Hepes 20mM, ajustado a pH 7,4).

Se preincubaron las células durante 10 minutos en tampón salino a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar. A continuación, se añadieron a los pocillos correspondientes los diferentes agentes químicos causantes del daño oxidativo y se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda que contenía un 5% de CO₂, durante 15 minutos.

Para la inducción del daño celular se utilizaron los siguientes agentes químicos (Rego et al., 1997):

-Ascorbato 5 mM e ión ferroso 100 µM a un pH ligeramente ácido (pH 6,5), provocando así una peroxidación lipídica.

-Oligomicina (OL) 5µg/mL, inhibidor del enzima ATP sintetasa, y Cianuro sódico (CN) 2 mM, inhibidor del enzima citocromo c oxidasa, provocando así una *hipoxia química*.

-Ácido iodoacético (IAA) 0,5 mM, inhibidor de la enzima glucolítico gliceraldehido sintetasa, o bien 2-desoxiglucosa (DG) 2mM, que puede sustituir a la glucosa en la glucólisis, cuando se utilizó DG, se utilizó tampón salino sin glucosa, dando lugar a condiciones de *hipogluemia*.

-La combinación de los inductores de *hipoxia química* con uno de los inductores de *hipogluemia*, se utilizó para inducir una *isquemia* celular.

Transcurrido el tiempo de incubación propuesto, 15 min, las placas se colocaron en un baño de hielo (10 min) para interrumpir los diferentes estímulos.

A continuación se colectaron los medios de incubación, con el fin de medir posteriormente la actividad LDH secretada por las células al medio de cultivo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.1. Tras la recolección de los medios, las células de cada pocillo fueron despegadas mediante tripsinización, añadiendo a cada pocillo 0,5 mL de una solución de tripsina-EDTA e incubando durante 15 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se detuvo la acción de la tripsina añadiendo 1 mL de medio de cultivo, las células fueron recogidas de los pocillos con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico estéril, y se traspasaron a un tubo cónico de centrifuga. Se centrifugaron a 1.000xg durante 10 minutos en una centrifuga de sobremesa, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado celular en 0,5 mL de PBS. Se contó el número de células en una cámara Neubauer, manteniéndolas a 4°C para realizar posteriormente las determinaciones de actividad LDH celular y ATP descritas en los apartados 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente.

En las placas destinadas a la detección de apoptosis mediante tinción con bis-benzamida, la acción de los estímulos fue detenida mediante la adición de 1 mL de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M (PFA), fijando así las células y manteniéndolas a 4°C hasta el momento de realizar la tinción.

2.2.2. Incubación de células de EPRb en una atmósfera con baja concentración de oxígeno

Se utilizaron células sembradas en las placas de 6 pocillos y en las botellas de 75 cm².

En primer lugar se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, a continuación, se les añadió 2 mL de medio de cultivo sin SFB y se incubaron durante 72 horas a 37 °C, en una atmósfera húmeda que contenía un 5% de CO₂ y un 3% de oxígeno en un incubador BB16:Heraeus. Paralelamente, como control se incubaron células con y sin SFB al 21% de oxígeno.

Material y Métodos

Una vez transcurrido el periodo de incubación las células de las placas de 6 pocillos se colocaron en un baño de hielo durante 10 min, y se procedió como en el apartado 2.2.1.

Las células que se habían sembrado en las botellas de 75 cm² se utilizaron para la cuantificación de ADN siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.3.b.

2.2.3. Inducción de estrés oxidativo por peroxinitrito

En primer lugar se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se añadió el agente oxidante (PN 50 o 100 µM) preparado en medio de cultivo sin SFB. Las células se incubaron durante una hora a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía un 5% de CO₂. Las condiciones control consistían en la incubación de células en medio de cultivo sin SFB. La acción del PN se interrumpió colocando las placas en baño de hielo (10 min) y a continuación se siguió el protocolo descrito anteriormente.

2.3. Tratamiento con antioxidantes

Se estudió, por separado, el efecto de la VC 300 µM, NAC 10 mM y TP 3 mM. Para investigar este efecto, las células se incubaron con el antioxidante seleccionado durante 2 horas antes de inducir el daño celular. Transcurrido este periodo de incubación, se añadieron los estímulos correspondientes para producir el estrés oxidativo a cada pocillo manteniendo la concentración de antioxidante durante el periodo de incubación con el estímulo.

2.4. Determinación del daño celular

2.4.1. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa

Se determinó tanto la actividad LDH secretada al medio extracelular (medio de incubación de las células) como la actividad LDH intracelular.

Las medidas de la actividad enzimática de LDH se realizaron espectrofotométricamente siguiendo la conversión de NADH a NAD⁺ a 340 nm según el método descrito por Bergmeyer y Brent (1974).

La actividad de la LDH secretada al medio extracelular se valoró en las muestras de medio que habían sido recogidas directamente de los pocillos.

La absorbancia se determinó tras añadir a una cubeta: 100 μ L de muestra, 0,5 mL de piruvato 9,72 mM, iniciando la reacción con 2,5 mL de NADH 0,24 mM. Todas las medidas se realizaron frente a un blanco que contenía tampón LDH (Tris 81,3 mM, NaCl 0,2 M pH 7,2) en vez de piruvato.

La disminución de absorbancia (debido a la oxidación del NADH) fue seguida a intervalos de 30 s durante 3 min, a 30 °C en un espectrofotómetro modelo U-2.000 Hitachi.

Para determinar los niveles de LDH intracelular, las células fueron lisadas con Tritón X-100 0,1% preparado en Tampón LDH, y centrifugadas a 7.000xg durante 15 min a 4°C, utilizando el sobrenadante para medir la actividad de LDH, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para determinar la actividad LDH extracelular.

La concentración de la actividad catalítica ([AC]) del enzima LDH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[AC] = \Delta A / \Delta t \times V / 1.000 \times \varepsilon \times d \times v \text{ (mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{l}^{-1}\text{)}$$

donde $\Delta A / \Delta t$ se refiere al cambio de absorbancia, ε es el coeficiente de absorción lineal del NADH (0,63 L \times mmol⁻¹ \times mm⁻¹), d es el paso de luz de cubeta (10mm), V es volumen final del ensayo (3,1 mL) y v es volumen de muestra añadido (0,1 mL).

Los resultados se expresaron como % de LDH secretado al medio respecto a la actividad LDH total, siendo el LDH total la suma de LDH intracelular y de LDH presente en el medio de cultivo.

2.4.2. Determinación de la concentración intracelular de ATP

El ATP intracelular se determinó por bioluminiscencia utilizando un kit comercial: "ATP bioluminescence Assay kit HS II" de Boehringer Mannheim.

El protocolo experimental fue el siguiente: una vez finalizado el experimento, las células se recogieron mediante tripsinización, y se contó el número de células.

Material y Métodos

Se tomó una alícuota correspondiente a 25.000 células que se lisaron, con tampón de lisis suministrado con el kit, durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para realizar las determinaciones de ATP se pipetearon 100 μ L de lisado celular y 100 μ L de luciferasa, e inmediatamente se realizó la lectura en un luminómetro (LKB Wallac modelo 1250 Luminometer) durante 10 s.

La concentración de ATP intracelular se calculó extrapolarando las lecturas obtenidas a una recta de concentración desde 1mM hasta 1 nM de ATP. Los resultados se expresaron como [ATP] (μ M)/25.000 células.

2.4.3. Detección de la apoptosis

Existen diferentes parámetros que indican que se ha producido un daño celular e incluso indicadores de muerte celular como son la tinción con azul tripán, con naranja de acridina-bromuro de etidio o con Hoechst 33258. La visualización con un solo método no es suficiente por lo que hay que realizar otros métodos complementarios como electroforesis en gel de agarosa, TUNEL, etc. (Sastry et al.,2000). En este estudio se ha utilizado la Tinción con Hoechst 33258 complementada por la electroforesis en gel de agarosa.

a) Tinción con Hoechst 33258 (bis-benzamida)

Esta técnica permite visualizar de una manera sencilla y rápida si las células han sufrido apoptosis. La técnica se basa en la utilización de bis-benzamida (Hoechst 33258), compuesto que se une específicamente al surco menor del ADN, no es intercalante y compite con la proteína histónica H1. Esta molécula cuando se excita con luz ultra violeta (360 nm) emite una fluorescencia que se recibe con una longitud de onda que se corresponde con el color azul (emisión de 490-500 nm). Con esta técnica se produce un marcaje específico del núcleo celular en el caso de células apoptóticas visualizándose la “fragmentación” del núcleo.

Una vez finalizado el periodo de incubación, se realizó la tinción con Hoechst 33258 (bis-benzamida) para determinar si se había inducido apoptosis, se siguió el método descrito por Boix et al. (1997).

En primer lugar las células se fijaron añadiendo a cada pocillo de la placa y sobre el mismo medio de incubación, 1 mL de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M (PFA), incubando luego durante 10 minutos. A continuación se retiró el medio y se volvió a añadir 1 mL de PFA, incubando durante 15 min. Posteriormente, se lavaron las células tres veces con PBS, se añadió 1 mL de Hoechst 33258 (0,05 µg/mL) y se incubó en oscuridad durante 25 min a temperatura ambiente. Una vez terminado el periodo de incubación, se retiró el Hoechst, y las células se lavaron tres veces con PBS. A continuación, a cada pocillo se le añadieron 25 µL de medio PBS-glicerol en la proporción 2:1 y se le colocó un cubre para así poder proceder a su observación con luz ultra-violeta en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DM IRB/E).

b) Electroforesis en gel de agarosa

Para la realización de la electroforesis en gel de agarosa se utilizaron las células de EPRb que fueron sembradas en botellas de 75 cm² (1,5-2x10⁶ células/botella). Antes de la electroforesis se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo descrito por Ramachandra et al. (1995) con algunas modificaciones.

Tras tripsinizar las células, se contaron en una cámara Neubauer y se centrifugaron a 7.000xg durante 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga de sobremesa. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió con 250 µL de tampón de digestión (ClNa 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,2%, proteinasa K 0,2 mg/mL, ajustado a pH 8). Se incubaron las células del precipitado en un baño a 50°C durante 12 horas. Transcurrido este periodo de incubación, se añadió a cada muestra 250 µL de una solución de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1) y se centrifugó a 7.000xg durante 5 min a 4°C.

Material y Métodos

La fase acuosa (fase superior) se pipeteó y se colocó en otro vial. Esta operación se repitió dos veces. Al último sobrenadante recogido se le añadió un volumen de acetato amónico 7,5 M igual a la mitad del volumen recogido. Se agitó el tubo durante unos segundos y se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto, incubando durante dos horas a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 7.000xg durante 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió con el mismo volumen final (Vol final= vol fase acuosa + ½ vol acetato amónico 7,5 M + 2 vol etanol) de etanol al 70%, centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones.

Tras la última centrifugación, se aspiró el sobrenadante cuidando de no tocar el precipitado y se dejó secar en la campana de flujo laminar durante 1 hora. El precipitado se diluyó en tampón Tris 10 mM, EDTA 5 mM, ajustado a pH 8 (Tampón TE) y se tomó una alícuota para determinar la concentración de ADN espectrofotométricamente a 260/280 nm (Figura 10).

Una vez determinada la concentración de ADN, se pasó a realizar la electroforesis en gel de agarosa, para lo cual se realizaron diferentes pruebas de concentración de agarosa, 0,8%, 1%, 1,2%, 2%. La concentración idónea de agarosa fue del 1% y se preparó en tampón TBE 0,5x (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,002 M pH 8). Se realizó una dilución del ADN para obtener una concentración final de ADN de 10 µg, que se incubó con 0,1U de ARNasa durante 1 hora a 37°C, con el fin de digerir posibles restos de ARN. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 2 µL de bromofenol-xilenol a cada muestra y se depositaron en los pocillos del gel de agarosa realizando la electroforesis en TBE 0,5x a 64V y 45mA. Una vez que el ADN hubo terminado su recorrido en el gel (aproximadamente 4 horas), se realizó una fotografía del gel con una video-cámara Sony modelo DCR-PC-1.

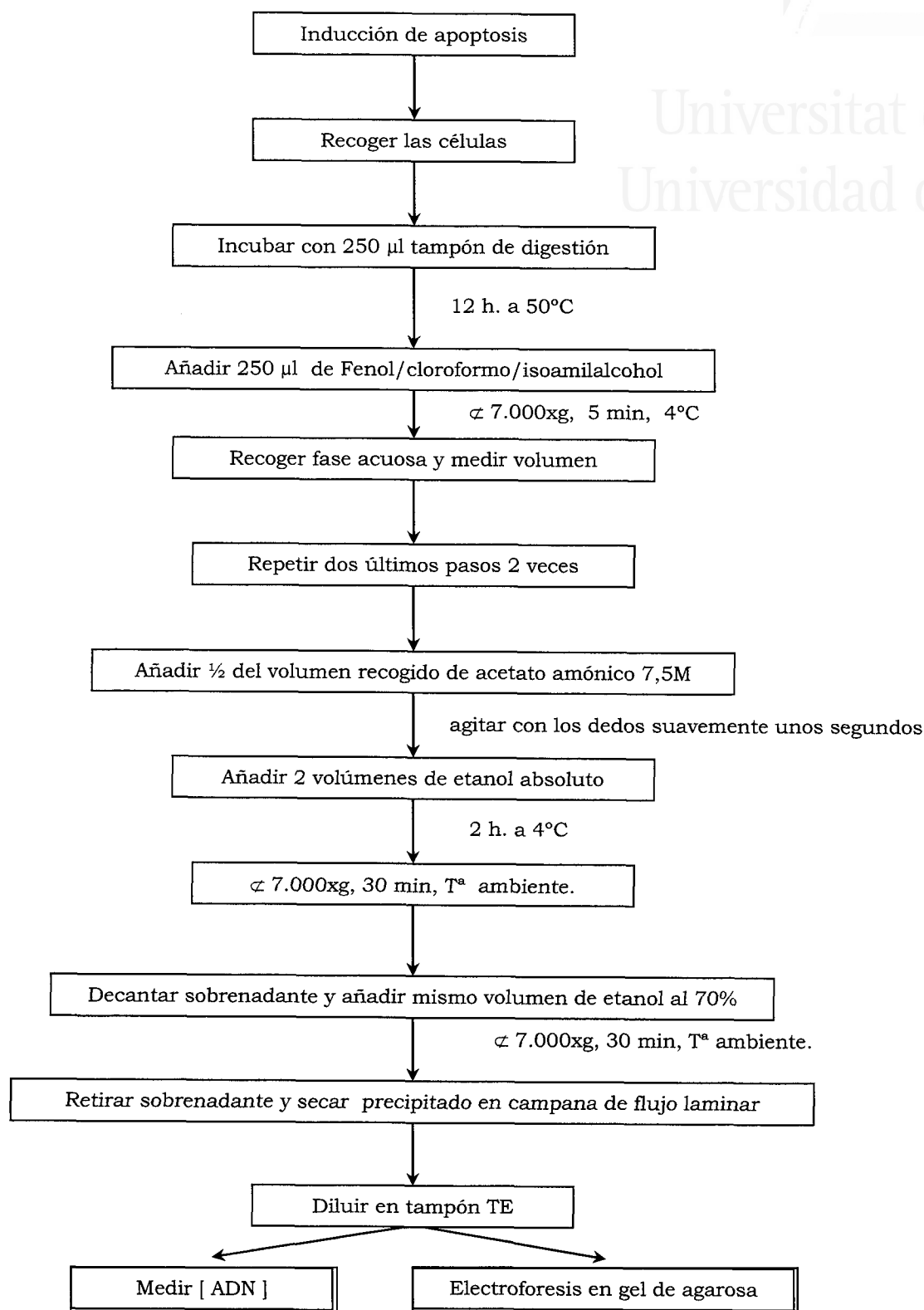


Figura 10. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3. Métodos del modelo de envejecimiento *in vivo*

3.1. Animales de experimentación

Como ya hemos indicado, los ratones hembra *OF1* fueron estabulados en el animalario en jaulas para roedores en un número de 7 por jaula. Durante el estudio fueron mantenidos en condiciones ambientales estables de ciclo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y temperatura ambiente de 23 ± 1 °C. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con pienso de mantenimiento para rata-ratón de B&K.

El estudio se inició con una población de 96 animales de 32 semanas de edad, exentos de patologías macroscópicas, y a la edad de 40 semanas, fue dividida al azar en tres grupos: un grupo control y dos grupos cuya dieta fue suplementada con antioxidantes. Los grupos que recibieron los antioxidantes en la dieta fueron alimentados *ad libitum* con el mismo pienso de mantenimiento para rata-ratón B&K suplementado con uno de los siguientes fármacos antioxidantes: TP al 0,2% o NAC al 0,2% (peso/peso) en el pienso seco, mientras que el grupo control se siguió alimentando con el pienso de mantenimiento para rata-ratón de B&K. El pienso suplementado con los fármacos antioxidantes (preparado por el *Centro de Instrumentación Científica* de la Universidad de Granada) fue consumido dentro del plazo marcado para evitar su alteración. En todos los casos el suministro de agua siempre fue *ad libitum*.

Desde el momento en el que se inició el tratamiento con los fármacos antioxidantes (a la edad de 40 semanas) hasta que terminó el estudio se realizaron dos sacrificios de animales (para obtener muestras de hígado y riñones para los estudios bioquímicos) a las edades de 48 y 62 semanas.

Este estudio fue realizado de acuerdo con las directrices del Consejo de Europa y el R.D. 223/88 sobre la utilización y cuidado de animales de laboratorio y fue aprobado por la Universidad de Alicante.

La diferencia de edad entre los ratones de la población inicial era de ± 1 semana.

Material y Métodos

3.2. Estudio de parámetros no invasivos fisiológicos y conductuales

Para los estudios longitudinales, fisiológicos y de conducta, se identificó cada animal perteneciente a cada jaula de 7 animales, marcando los ratones en el pelo mediante ácido pícrico diluido. La cabeza, la porción superior de las patas delanteras o traseras, el extremo caudal del lomo y su combinación fueron los lugares marcados. Este procedimiento de identificación, por su inocuidad para el animal, su sencillez y por su permanencia sobre el pelo del animal, es adecuado para estudios de media y larga duración en roedores albinos.

3.2.1. Consumo promedio de alimento

Partiendo de 600 g de pienso seco inicial por jaula, la ingesta media se determinó para cada grupo de estudio mediante la determinación quincenal, por jaula, del peso del alimento que quedaba en el compartimento. Los datos se expresan como gramos de pienso consumido por ratón y por día.

3.2.2. Determinación del peso corporal

El peso corporal es uno de los parámetros fisiológicos más fáciles de determinar, y además proporciona gran información acerca del estado de salud del animal. En este estudio el peso corporal se midió quincenalmente para cada ratón, perteneciente a los distintos grupos: control, NAC y TP, durante todo el periodo de estudio. Para ello se utilizó una balanza (Salter electroscale KE-120) con una precisión de 0,1g.

3.2.3. Parámetros de conducta

Todas las evaluaciones de las pruebas de vitalidad y conducta se llevaron a cabo en el mismo recinto donde estaban estabulados los ratones, con el fin de evitar posibles interferencias en las respuestas de los animales debido al transporte a otro lugar de ensayo. Los ensayos se realizaron entre las 10 y 14 horas para minimizar posibles variaciones en ritmos circadianos.

a) Medida de parámetros de vigor y coordinación neuromuscular

La evaluación de la vitalidad de los animales se realizó utilizando la técnica de la cuerda tirante descrita por Miquel y Blasco (1978). La correcta resolución del test requiere que los ratones superen en un minuto o menos la prueba de llegar a uno de los dos extremos de una cuerda tensada y fina, tras sufrir una situación de estrés como es, al comienzo de cada prueba, sujetarlos del rabo con los dedos, colgando cabeza abajo y dejándoles coger, a intervalos, la cuerda con las patas anteriores.

Cuando se colocan animales jóvenes en la cuerda, son capaces de agarrarse a ella con las cuatro patas e incluso el rabo y desplazarse en menos de un minuto hasta alcanzar uno de los dos extremos. Los ratones viejos suelen permanecer inmóviles colgados con las patas delanteras o bien, al ser incapaces de sujetarse con las cuatro patas, caen al lecho de virutas.

Se empleó una cuerda de cáñamo de 1 mm de diámetro atada a dos soportes firmemente anclados y distantes entre sí 60 cm, quedando a una altura de 40 cm sobre un lecho de virutas. La cuerda se tensó al máximo (Figura 11).

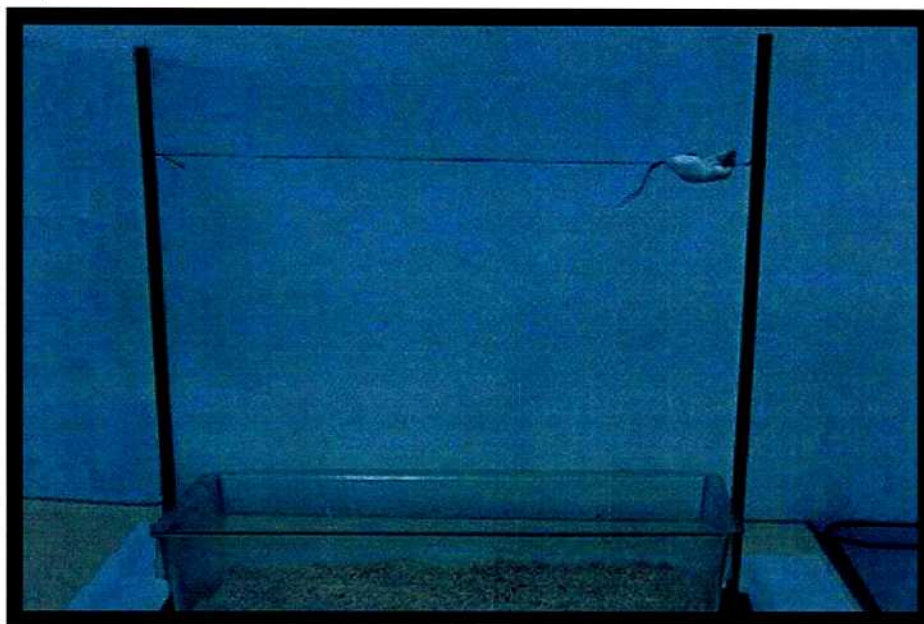


Figura 11. Procedimiento de evaluación de vigor y coordinación neuromuscular mediante la técnica de la cuerda tirante. Ratón capaz de alcanzar un extremo de la cuerda en menos de 1 minuto

Material y Métodos

El procedimiento fue el siguiente: se retiró al ratón de su jaula de procedencia cogiéndolo cuidadosamente de la cola, y se mantuvo suspendido de la cola durante 10 s a una distancia aproximada de 1 cm de la cuerda en su parte central. Se le permitió durante estos 10 s llegar a tocar y agarrarse con sus patas delanteras a la cuerda en tres ocasiones. Finalmente, se dejó al animal agarrado de ella solamente con las patas anteriores y se comenzó a cronometrar el tiempo que tardaba el ratón en alcanzar uno de los extremos de la cuerda. Si el animal caía al lecho de virutas o no llegaba a uno de los dos extremos de la cuerda, inmediatamente se repetía por segunda vez la manipulación anterior pero manteniéndolo en esta ocasión suspendido de la cola tan solo 5 s.

La correcta resolución del test requiere que los ratones lleguen en un minuto como máximo a cualquiera de los dos extremos de la cuerda tensada, bien en el primero, bien en el segundo intento. Una vez finalizada esta prueba, se retira al animal y a continuación se le somete al siguiente test, en el laberinto en forma de T.

b) Medida de la actividad exploratoria espontánea.

Se utilizó un laberinto en T en base a diseños empleados para estudios de memoria espacial por Dean y Key (1981). El laberinto consta de tres brazos en forma de T, con paredes de conglomerado de madera cuyas caras internas están recubiertas con chapa plástica negra. La medida de cada brazo de la T es 25 cm de largo, 10 cm de ancho y 20 cm de alto (todas las medidas referidas son internas). El suelo del laberinto consiste en varillas cilíndricas de aluminio de 3 mm de grosor, colocadas a una distancia de 5 mm una de otra y situadas transversalmente a las paredes laterales de cada brazo (Figura 12).

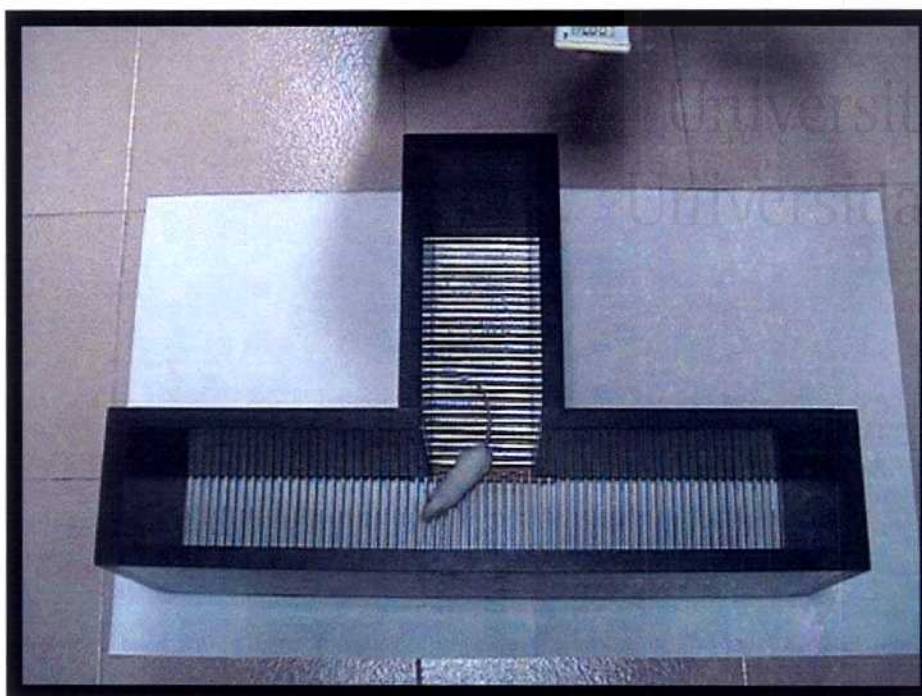


Figura 12. Laberinto en T para la evaluación de la actividad exploratoria espontánea. Ratón saliendo del primer brazo.

El laberinto se colocó en el suelo del recinto del estabulario sobre papel blanco de filtro. En todos los ensayos fue situado en la misma posición bajo iluminación directa de dos tubos fluorescentes de 25w, en el techo, a una distancia de 2,5 m. La iluminación sobre los tres brazos del laberinto era la misma.

El método para medir la actividad exploratoria espontánea se basó en el tiempo empleado por un ratón en recorrer el brazo de salida del laberinto en forma de T sin suministro de cualquier tipo de refuerzo positivo o aversivo. Se tomó al ratón por la cola cuidadosamente y se colocó junto a la pared del brazo de salida de la T, en la zona distal de la convergencia de los brazos. Se comenzó a registrar el tiempo (en segundos) con un cronómetro hasta que el animal salió completamente (con las cuatro patas) del brazo inicial. Se le concedió una segunda oportunidad al ratón que no consiguió salir del brazo del laberinto en menos de un minuto (De Juan, 1994).

3.3. Obtención de muestras de tejidos para estudios bioquímicos

El sacrificio de los animales se realizó por decapitación previa ligera anestesia en atmósfera de éter. Inmediatamente se pasó a la extracción de los órganos (hígado y riñones) de cada animal. Todo el procedimiento de aislamiento se realizó a 4°C. Cada órgano de cada animal fue procesado individualmente para el aislamiento de mitocondrias.

3.4. Aislamiento de mitocondrias de hígado y de riñón y determinación de proteína mitocondrial

El aislamiento de mitocondrias de hígado y riñón se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Rickwood et al. (1987) con algunas modificaciones.

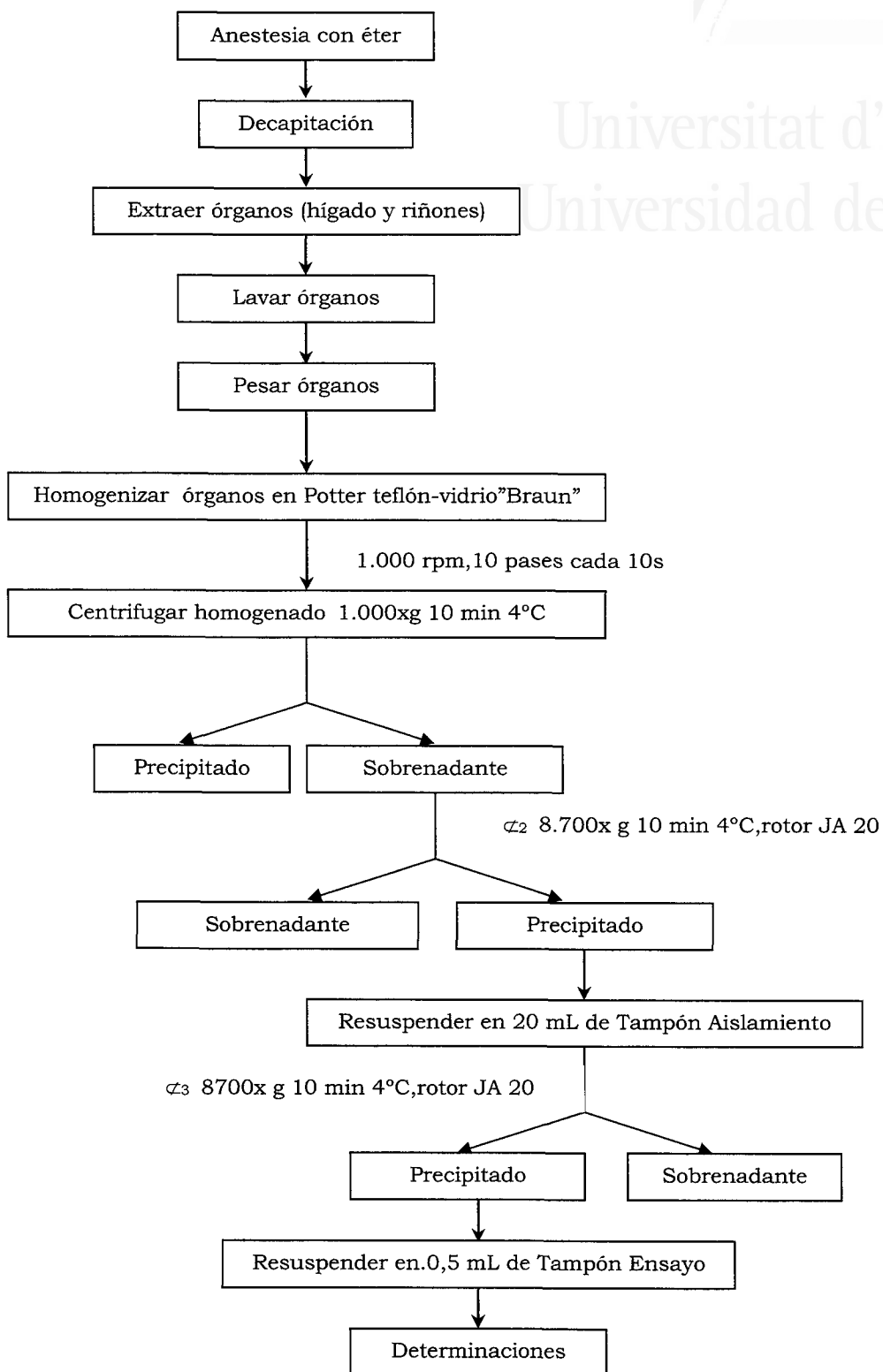
Tanto el hígado como los riñones se lavaron 3 veces con tampón compuesto por sacarosa 250 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 0,5 mg/mL, Tris/ClH 10 mM, EDTA-K 1 mM a pH 7,2 ajustado con KOH (tampón de aislamiento) con la finalidad de eliminar restos de sangre. Se colocaron las muestras de tejido en un papel de filtro para absorber el exceso de tampón, y se pesaron en una balanza Salter-ADN modelo ER-60 con una precisión de 0,1 mg. Se trocearon y homogenizaron en tampón de aislamiento a la concentración de 30% para hígado y 10% para riñón (p/v). Se realizó una homogenización en un homogenizador tipo "potter" de Teflon-vidrio (Braun) mediante 10 pases de émbolo (0,1 mm de holgura) a 1000 rpm en intervalos de 10 s.

Una vez obtenido el homogenizado, fue llevado a un volumen final de 15 ml, se centrifugó a 1000xg durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga de sobremesa, se desechó el precipitado formado de núcleos celulares y material celular pesado. El sobrenadante recogido se centrifugó a 8700xg durante 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Beckman J-21 con un rotor JA-20).

Una vez finalizada la centrifugación, el sobrenadante se desechó, y el precipitado, es decir la fracción mitocondrial, se resuspendió en 20 mL de tampón de aislamiento y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores para lavar y eliminar restos celulares. Se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en el mínimo volumen posible (1-1,5 mL) de tampón de ensayo, tampón constituido por manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA FFA) 0,5 mg/mL, Tris/ClH 50 mM, ClK 30 mM a pH 7,4 ajustado con KOH, mantenido a 4 °C hasta su utilización (Figura 13). Se tomó una alícuota para la determinación del consumo de oxígeno por las mitocondrias de hígado y riñón.

El homogenizado mitocondrial restante fue alícuotado y congelado a -80°C hasta el día en que se realizaron las determinaciones enzimáticas que se describen a continuación.

La determinación de proteínas se realizó utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951). El rendimiento obtenido durante este proceso fue del orden de $10,63 \pm 3,5$ y $3,78 \pm 1,18$ mg de proteína por gramo de hígado y riñón respectivamente.

Material y Métodos**FIGURA 13. Protocolo de aislamiento de mitocondrias de hígado y riñón.**

3.5. Determinación del consumo de oxígeno

La actividad respiratoria de las mitocondrias fue determinada con un electrodo de oxígeno de Clark (SYS203, INSTECH), siguiendo el método descrito por Palmero (1992).

La calibración del electrodo se realizó midiendo el porcentaje de saturación de oxígeno en 600 μ L de tampón de respiración (tampón de ensayo suplementado con rotenona 4 μ M, acetato 10mM, fosfato 0,2mM, Cl₂Mg 3mM, EDTA-K 0,5mM) en la cámara bien sellada. La lectura del 0% de oxígeno se obtuvo mediante la adición al medio de ditionito sódico.

Tanto la calibración del electrodo de oxígeno como el estudio de la respiración mitocondrial se llevó a cabo a 25°C, manteniendo siempre la solución en agitación suave y constante.

La determinación del consumo de oxígeno se inició una vez estabilizada la lectura del electrodo de oxígeno con tampón de respiración. En ese momento se añadió la suspensión de mitocondrias (40 μ L de mitocondrias de hígado y riñón), y se dejó que se estabilizara el registro (alrededor de 30 s).

La respiración mitocondrial se inició con la adición al medio de succinato 5 mM, sustrato de la cadena de transporte electrónico, (estado 4 o de reposo de la respiración), registrando lecturas cada 30 s. Una vez estabilizado el consumo de oxígeno, se añadió al medio ADP 0,4mM, pasando al estado 3 o estado activo de la respiración mitocondrial, registrando lecturas cada 30 s.

El índice de respiración mitocondrial se obtuvo a partir de la relación de los estados 3 y 4 de la respiración, constituyendo ésta una medida del acoplamiento entre fosforilación oxidativa y respiración mitocondrial. Los resultados se expresan como μ moles de O₂ consumido/mg proteína \times min.

Para comprobar la integridad de la membrana mitocondrial, tras la adición de ADP se añadió al medio un inhibidor del transporte de nucleótidos, atractilósido 60 μ M, se dejó estabilizar al sistema y se volvió a añadir ADP.

Tanto mitocondrias como sustratos se añadieron utilizando microjeringas, evitando la formación de burbujas en la cámara.

Material y Métodos

3.6. Determinaciones enzimáticas

Se realizó la determinación de la actividad de dos enzimas mitocondriales, citrato sintetasa y citocromo c oxidasa.

3.6.1. Actividad citocromo c oxidasa

Se escogió este enzima para el presente estudio porque es el complejo respiratorio mitocondrial más alterado por el envejecimiento (Ferrandiz et al., 1994).

La actividad citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1), se determinó espectrofotométricamente, según el método descrito por Wharton y Tzagaloff (1967). Se midió la tasa de oxidación del citocromo c reducido a oxidado por el enzima citocromo c oxidasa, utilizando como blanco ferricianida potásica.

En primer lugar, se redujo el citocromo c al 1%: Para ello, se pesó el citocromo c y se disolvió en el 60 % del volumen final con tampón fosfato potásico (KP) 10 mM, al que se le añadió una puntita de espátula de borohidruro de sodio (NaBH₄) para reducirlo y se incubó durante 30 min a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación, y para eliminar el exceso de NaBH₄, se ajustó el pH de la disolución a 7,1 con ácido clorhídrico 1N y se llevó al volumen final.

La absorbancia se determinó añadiendo a una cubeta 0,1 mL de tampón KP 10 mM, 0,07 mL de citocromo c reducido y 0,81 mL de agua destilada. Para iniciar la reacción se añadió simultáneamente 20µL de la muestra a la cubeta de la muestra y 20 µL de ferricianida potásica 0,1M a la cubeta del blanco.

La disminución de absorbancia a 550 nm (debida a la oxidación del citocromo c reducido), se determinó a intervalos de 10 s durante 1 min a 37°C en un espectrofotómetro Hitachi U-2.000.

La actividad específica del enzima (S.A.) se calculó utilizando la siguiente reacción:

$$S.A. = (k \times [\text{cit. C}]) / [\text{enz}]$$

donde $k = 2,3 \times \log (A_0/A_{1\text{min}})$, expresada en min^{-1} , [cit. C] es la concentración de citocromo c que se añadió (0,08M), y [enz] es la cantidad de enzima que se añadió expresada en mg de proteína.

Los resultados se expresaron como actividad específica (S.A.) por mg de proteína.

3.6.2. Actividad citrato sintetasa

El enzima citrato sintetasa se encuentra en la matriz mitocondrial, pertenece al ciclo de Krebs y es codificado por el ADN nuclear. Se utiliza como marcador de la capacidad metabólica de las mitocondrias y también es utilizado como indicador de la cantidad de mitocondrias presentes en la preparación (Morel et al., 1995).

Se determinó midiendo la formación de citrato a partir de acetil-CoA y oxalacetato (OAA), según el método descrito por Williams et al. (1998).

La absorbancia se midió añadiendo a una cubeta: 0,1 mL de Tris 0,75mM, 0,1mL de DTNB 1mM, 0,1 mL de Tritón X-100 1%, 0,05 mL de Acetil CoA 8,6mM, 0,58 mL de agua destilada y 0,02 mL de muestra. La reacción se inició con la adición de 0,05 mL de OAA 10mM a la cubeta de la muestra, frente a un blanco que no llevaba OAA.

El aumento de absorbancia a 412 nm se siguió a intervalos de 30s durante 3 minutos y a 30°C, en un espectrofotómetro Hitachi U-2.000.

La concentración de actividad catalítica ([A.C.]) del enzima citrato sintetasa se calculó según la siguiente reacción:

$$[A.C.] = \text{Abs} \times V \times \text{cem} \times d \times t \times v$$

donde Abs es la absorbancia a tiempo 3 min menos la absorbancia a tiempo 0, V es el volumen final del ensayo (1 mL), cem es el coeficiente de extinción molar de citrato sintetasa, d es el paso de luz de cubeta (10mm), t es el tiempo en minutos y v es el volumen de muestra añadido.

Los resultados se expresaron como concentración de actividad catalítica por mg de proteína.

3.6.3. Determinación de malondialdehído

El método del ácido tiobarbitúrico (TBA) se utiliza para analizar la peroxidación lipídica. En este proceso, uno de los productos finales es el malondialdehído (MDA), un compuesto que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar a la formación de un compuesto coloreado rosa y que tiene un máximo de absorción a 535 nm. Se siguió el protocolo descrito por Fraga et al. (1988).

A 50 μ L de homegenizado (de hígado o riñón) se le añadió 75 μ L de ácido fosfórico y 25 μ L de TBA y 5 μ L de hidroxitolueno butilado (BHT), se agitó en vórtex, se incubó durante 60 minutos a 95 °C, transcurrido ese periodo de tiempo se añadió 150 μ L de solución neutralizante (compuesta por 500 μ L de NaOH 1N y 4,5 mL de acetonitrilo), se centrifugó enseguida a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C y se inyectaron 20 μ L del sobrenadante en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) (el flujo fue de 0,4 mL/min y el detector U.V a 535 nm).

La concentración de MDA de las muestras se calculó por extrapolación a una curva patrón de concentraciones conocidas de MDA (desde 10 mM, hasta 0,1 mM). La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/agua (70/30%)

En la fase de incubación durante 60 minutos a 95 °C se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos, con la consiguiente liberación de MDA. Este se conjuga con 2 moléculas de TBA, por lo que se determina el aducto MDA-(TBA)₂ como índice de peroxidación lipídica. Sin embargo, este aducto es muy inestable, por lo que hay que centrifugar y pinchar en el HPLC rápidamente tras añadir la solución neutralizante. Por otra parte, la adición del antioxidante BHT previene la autooxidación de la muestra durante la fase de calentamiento, evitando obtener valores de MDA artificialmente altos.

4. Métodos estadísticos

Se ha realizado una estadística descriptiva de cada una de las variables calculando los parámetros característicos: media, desviación típica. La comparación de las medias normales entre dos grupos experimentales se efectuó por el test de la t de Student (de doble cola).

Para los resultados expresados como porcentajes se realizó el estudio estadístico mediante la comparación de dos proporciones, aplicando la Corrección de Yates.

Se consideró que no había significación cuando el valor de la probabilidad de significación (p) fue mayor de 0,05. Se dio el valor de “significativo” para $p < 0,05$.

Todos los datos fueron tratados con los programas informáticos SPSS, Excel 2000. Todos los gráficos fueron obtenidos gracias a los programas informáticos SigmaPlot 3.0 y Excel 2000.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

RESULTADOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Modelo de envejecimiento celular *in vitro*

El principal objetivo de esta investigación fue demostrar el efecto protector de diferentes compuestos antioxidantes (vitamina C, N-acetil-cisteína y tioprolina) sobre células del EPRb expuestas a estrés oxidativo. Para ello, se valoró el grado de daño celular determinando la concentración intracelular de ATP y los niveles de LDH liberados al medio por estas células.

1.1. Inducción de daño celular por peroxinitrito

Se observó una disminución dosis-dependiente de la concentración de ATP cuando se incubaron las células con PN como se observa en la Figura 14. Así, cuando la concentración de peroxinitrito utilizada fue 50 μM el contenido en ATP celular disminuyó a la mitad mientras que cuando la concentración fue 100 μM la concentración disminuyó un 94% y a partir de 250 μM no varió la concentración de ATP.

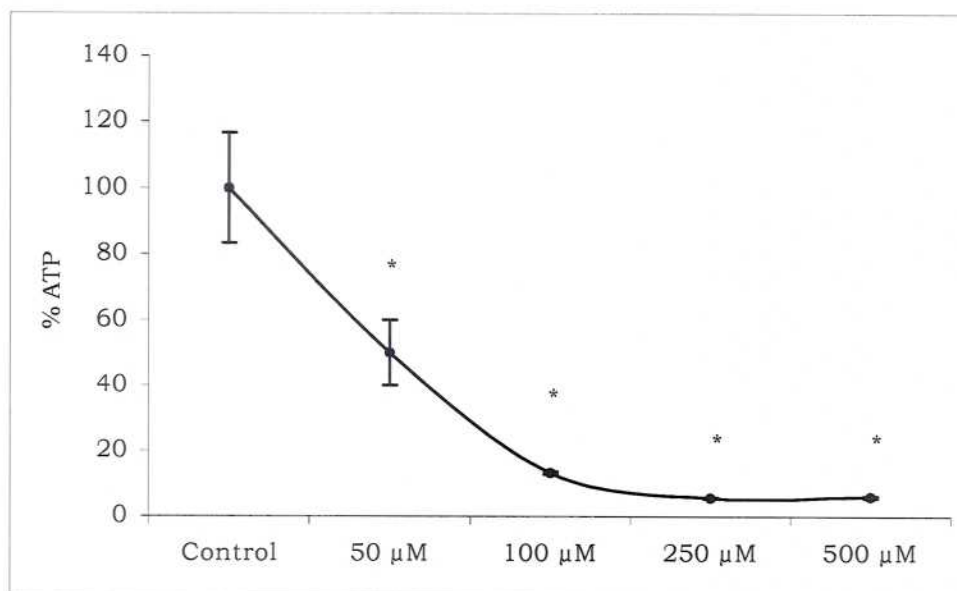


Figura 14. EFECTO DEL PEROXINITRITO SOBRE LOS NIVELES DE ATP.

Efecto del PN sobre la concentración intracelular de ATP en células de EPRb tras 1 h de incubación con distintas concentraciones de PN. Las células se recogieron mediante tripsinización, y se determinó la concentración intracelular de ATP mediante bioluminiscencia, como se indica en la sección Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado ((*) = $p < 0,05$ al comparar con el grupo control, sin PN).

Resultados

Se comparó el efecto de NAC (antioxidante) con dos inhibidores de PARP (3-aminobenzamida (3-AB) y nicotinamida (NM)) utilizando PN (50 y 100 μ M) como inductor del daño celular.

Como se observa en la Figura 15, al utilizar **PN 50 μ M**, ni NAC ni 3-AB y NM 0,1 mM mostraron efecto protector sobre la concentración de ATP intracelulares mientras que sí se observó una protección significativa en presencia de concentraciones superiores (1 y 10 mM), observándose el máximo efecto con NAC 10 mM.

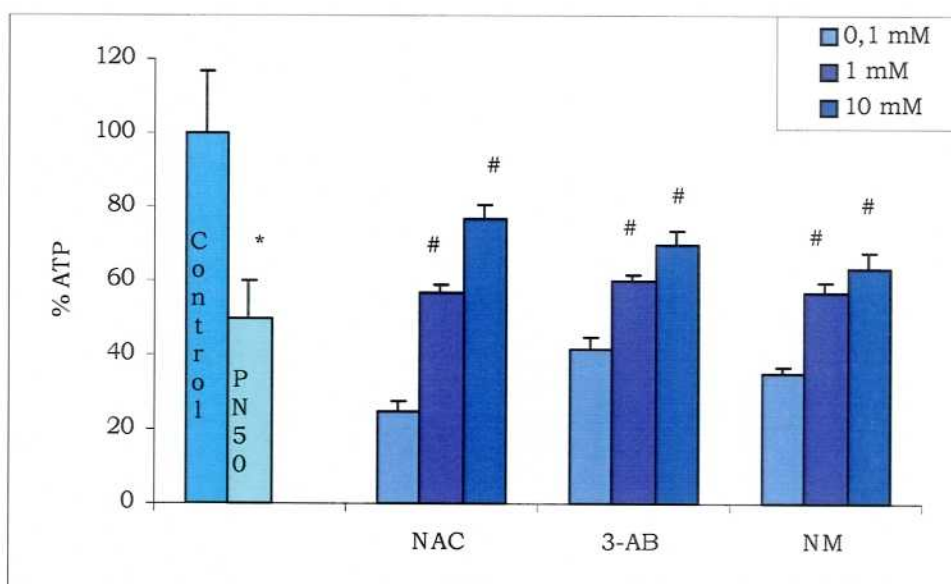


Figura 15. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PARP Y NAC SOBRE EL ATP.

Se determinó el efecto protector de los inhibidores de la PARP y NAC sobre la concentración intracelular de ATP en células de EPRb. Las células se preincubaron con diferentes concentraciones de fármacos y fueron expuestas a PN 50 μ M durante 1 hora, de acuerdo al protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. ((*) = $p < 0,05$ frente al grupo control sin PN; (#) = $p < 0,05$ frente a PN 50 μ M).

Sin embargo, en presencia de **PN 100 μ M**, NAC 1 mM fue ineficaz mientras que NAC 10 mM sí mostró un efecto protector frente a PN 100 μ M (Figura 16). Al preincubar las células con 3-AB se observó una acción protectora a ambas concentraciones 1 y 10 mM mientras que NM al igual que

NAC sólo mostró efecto protector a la concentración más alta, o sea 10 mM. Como se observa en la Figura 16, los fármacos a la dosis más alta preservaron el contenido de ATP intracelular pero nunca alcanzaron los valores del control.

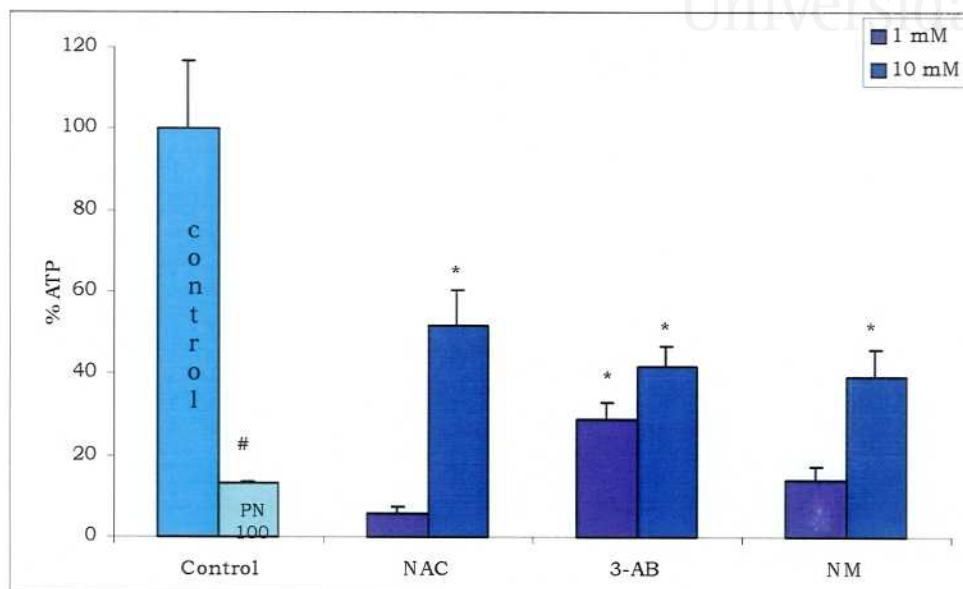


Figura 16. EFECTO PROTECTOR DE LOS INHIBIDORES DE PARP Y NAC SOBRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ATP Y PN 100 μ M.

Efecto protector de los inhibidores de PARP y NAC sobre la concentración intracelular de ATP en células de EPRb. Células preincubadas con diferentes concentraciones de fármacos e incubadas durante 1 hora con PN 100 μ M. Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado. ((#) = $p < 0,05$ al comparar con el grupo control sin PN; (*) = $p < 0,05$ frente a PN 100 μ M).

Al igual que en las anteriores condiciones de estrés oxidativo, también se estudió la viabilidad celular determinando la secreción de LDH al medio de cultivo. El peroxinitrito también redujo la viabilidad celular de forma dosis-dependiente incrementando significativamente los niveles de LDH secretado al medio conforme aumenta la dosis de PN llegando a alcanzar niveles del 100% de actividad LDH en el medio de cultivo con la dosis más alta de PN (500 μ M) como se observa en la Figura 17.

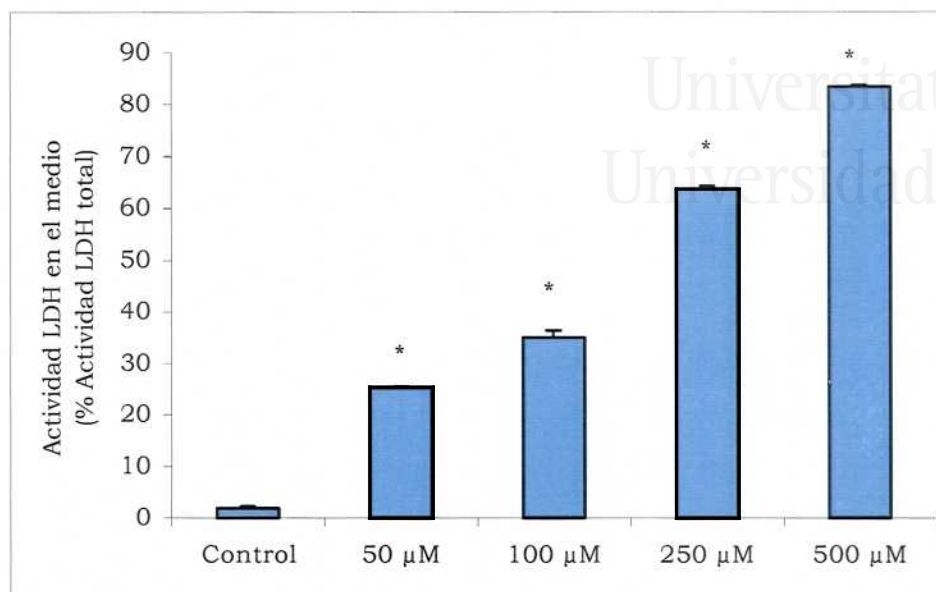
Resultados

Figura 17. EFECTO DE PN SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DEL EPRb.

La viabilidad celular se determinó midiendo la actividad LDH secretada al medio de cultivo por células de EPRb incubadas durante una hora con concentraciones crecientes de PN, según el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado, (*) = $p < 0,05$ vs control.

Se estudió el efecto de los inhibidores de PARP y NAC sobre la viabilidad celular. Para ello se preincubaron las células con la dosis más alta de estudiada anteriormente (10 mM), que mejor efecto presentó en la preservación de los niveles de ATP, y posteriormente se incubaron con PN 50 μ M. Se observó una disminución significativa de la actividad LDH en el medio de cultivo con los tres fármacos siendo NAC el que más se aproximó a los niveles control (Figura 18).

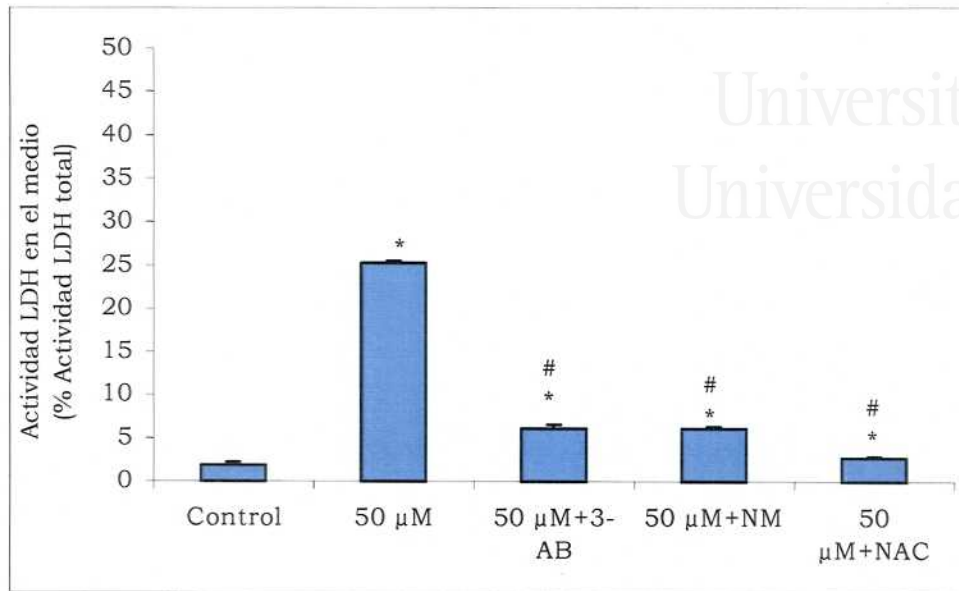


Figura 18. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PARP Y NAC SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Se estudió el efecto protector de los inhibidores de la PARP (3-AB y NM) y del antioxidante NAC sobre la viabilidad de las células de EPRb expuestas a PN 50μM durante 1 hora. El efecto se determinó midiendo la actividad LDH secretada al medio por células de EPRb siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado, (*) = $p < 0,05$ vs control; (#) = $p < 0,05$ vs 50μM PN.

Resultados

1.2. Inducción de estrés oxidativo por agentes químicos

Cuando el estrés oxidativo fue inducido por ascorbato e ión ferroso (Asc/Fe²⁺), la concentración de ATP no varió con respecto a las condiciones control, al incubar las células con tampón Hepes (Figura 19), mientras que, sí se observó un descenso en la concentración de ATP al inducir hipoxia mediante incubación con oligomicina y ácido iodoacético (OL-IAA), al igual que cuando se indujo *glucopenia* mediante exposición al ácido iodoacético (IAA) y cuando se incubaron las células en presencia de compuestos capaces de inducir efectos patológicos (OL-CN-IAA) similares a los de la *isquemia*.

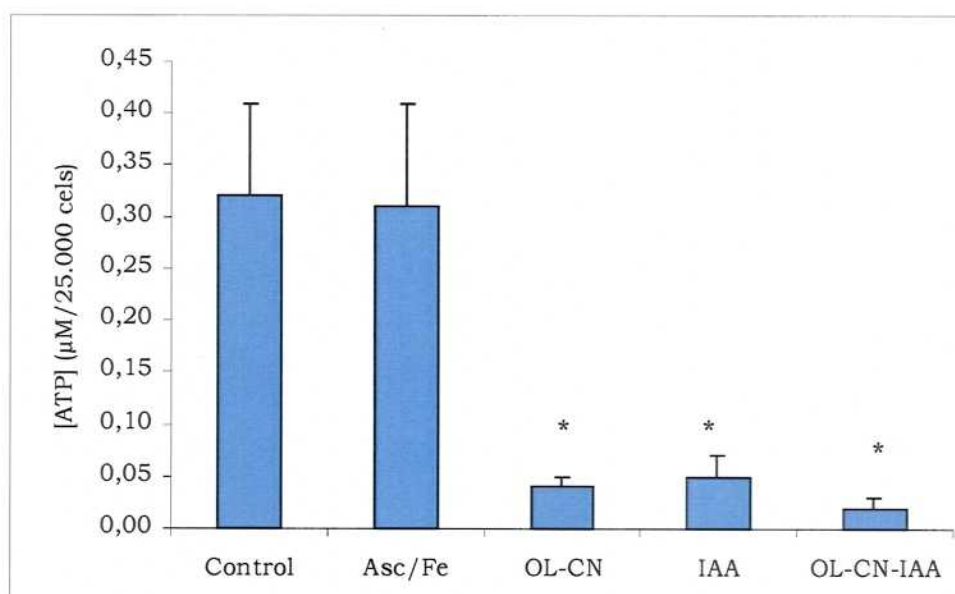


Figura 19. NIVELES DE ATP EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Se determinó la concentración intracelular de ATP en células del EPRb sometidas a estrés oxidativo, hipoxia, *glucopenia* o *isquemia* siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado. (*) $p < 0,05$ con respecto a los resultados obtenidos en condiciones control.

Todos los antioxidantes utilizados protegieron a las células sometidas a hipoxia mientras que tras la exposición a *glucopenia* solo NAC fue capaz de proteger frente al daño celular, TP previno la disminución de la concentración de ATP sin alcanzar los niveles del control, mientras que VC fue ineficaz.

Por otra parte, en el modelo de *isquemia* química, VC y NAC protegieron significativamente la disminución de los niveles de ATP sin alcanzar los niveles del control ($0,32 \pm 0,09$) (Figura 20), mientras que en este caso TP fue incapaz de mantener los niveles de ATP.

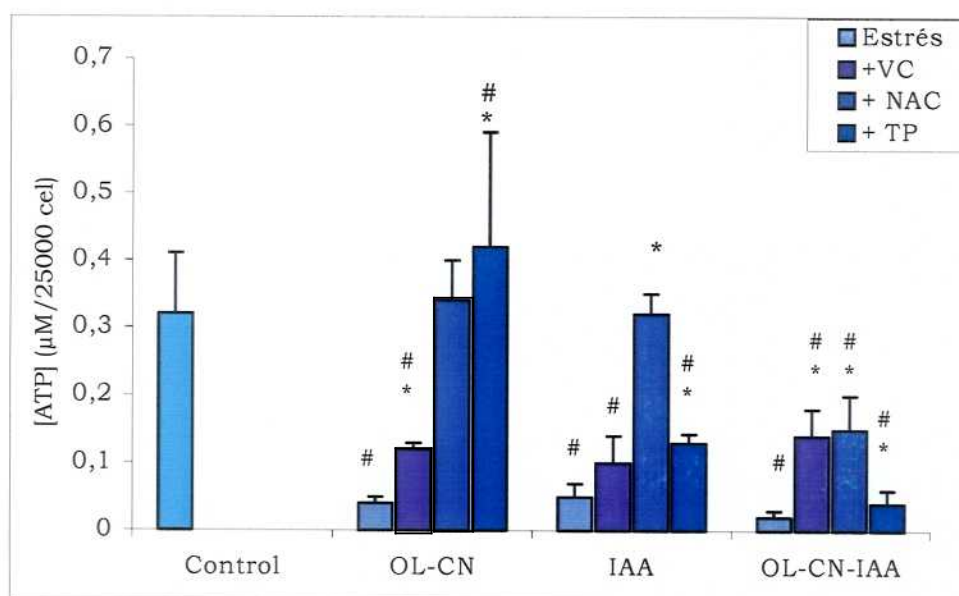


Figura 20. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LOS NIVELES DE ATP.

Efecto de la vitamina C (300 μ M), N-acetil-cisteína (10 mM) y tioprolina (3 mM) sobre la concentración intracelular de ATP en células de EPRb sometidas a hipoxia, *glucopenia* o *isquemia* química, determinado según está descrito en la sección de Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado. (#) = $p < 0,05$ frente control, (*) = $p < 0,05$ comparado con el estrés correspondiente.

La viabilidad celular se determinó midiendo la secreción al medio de cultivo del enzima LDH, indicador de la integridad de la membrana plasmática. Como se puede observar en la Figura 21, se produjo un marcado aumento de la actividad de este enzima en el medio de cultivo con respecto a

Resultados

las condiciones control cuando las células se incubaron en condiciones de hipoxia e *isquemia*, mientras que en las demás condiciones experimentales sólo se observó un ligero aumento no significativo de la liberación al medio de este enzima.

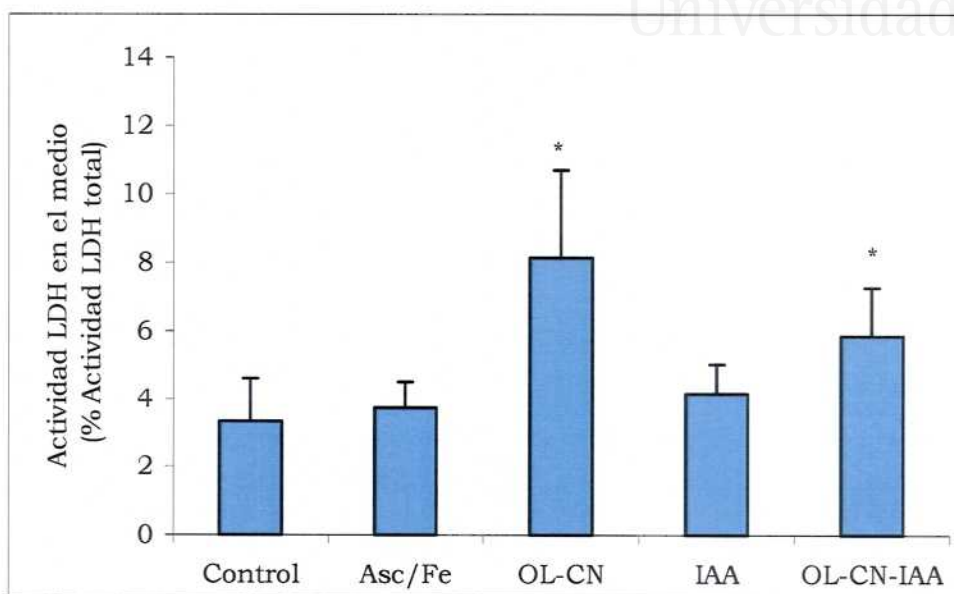


Figura 21. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.

Se determinó la actividad LDH secretada al medio por las células de EPRb sometidas a estrés oxidativo, hipoxia, *glucopenia* e *isquemia*, siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado. (*) $p < 0,05$ vs control.

Como ya se ha mostrado anteriormente, el incremento de la secreción de LDH al medio de cultivo se produjo en las condiciones experimentales de *hipoxia química* e *isquemia* (Figura 21). Cuando las células fueron pretratadas con los antioxidantes durante dos horas antes de ser sometidas a ***hipoxia química***, se observó como el incremento de LDH en el medio disminuyó significativamente cuando las células se trataron con NAC y TP (Figura 22), siendo TP el antioxidante que mantuvo los niveles de secreción ($2,98 \pm 0,59$) más próximos a los niveles de las condiciones control ($3,34 \pm 1,27$).

Mientras que en la condición de **glucopenia** (IAA, la secreción de LDH al medio de cultivo no incrementó significativamente), al incubar las células con VC, disminuyeron significativamente los niveles de secreción al medio, TP los mantuvo similares a las condiciones control y de *glucopenia* y paradójicamente NAC incrementó significativamente los niveles de secreción al medio de cultivo.

En la condición de **isquemia** se produjo un ligero aumento significativo en los niveles del enzima secretado al medio de cultivo (Figura 21) que disminuyeron significativamente cuando las células se preincubaron con TP, alcanzando los valores de las condiciones control ($3,46 \pm 0,26$ y $3,34 \pm 1,27$ respectivamente). Cuando el antioxidante fue VC se produjo un ligero descenso significativo de la secreción al medio de LDH con respecto a los niveles obtenidos en presencia de OL-CN-IAA mientras que NAC volvió a producir un incremento de la secreción al medio de LDH (Figura 22).

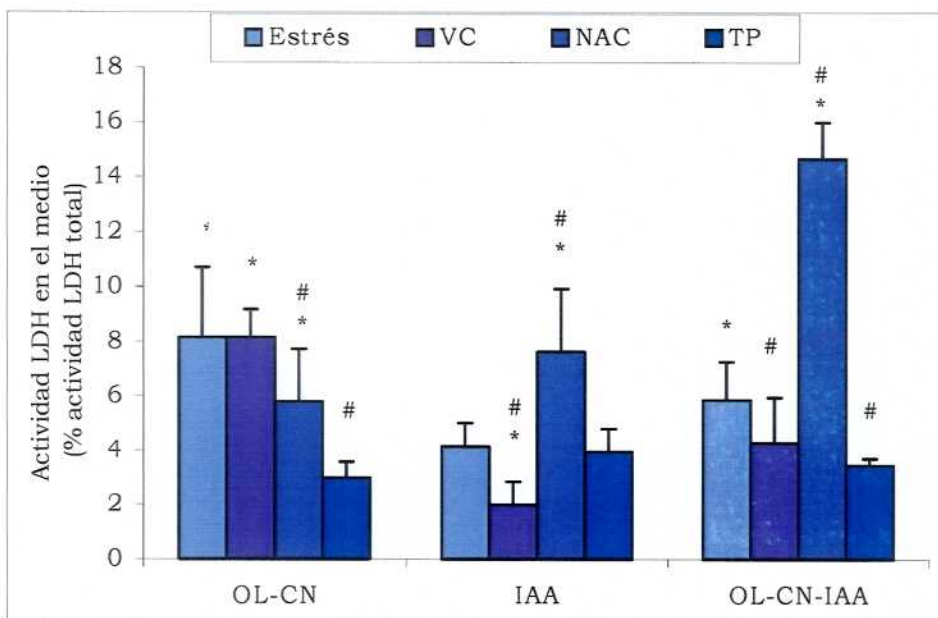


Figura 22. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Se determinó la concentración de LDH secretado al medio de cultivo en células de EPRb incubadas en ausencia o presencia de antioxidantes: VC $300\mu\text{M}$, NAC 10mM y TP 3mM y sometidas a diferentes condiciones de estrés oxidativo hipoxia, *glucopenia* o *isquemia química*, siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. (*) = $p < 0,05$ vs control ($3,34 \pm 1,27$) y (#) = $p < 0,05$ frente a la condición de estrés oxidativo.

Resultados

1.3. Inducción de daño celular por hipoxia

Una exposición prolongada a bajas concentraciones de oxígeno induce un daño en las células del EPRb. Como se puede observar en la Figura 18, cuando las células se incubaron durante 72 horas en medio de cultivo sin suero fetal bovino y con una concentración de O₂ al 3 % se produjo una disminución significativa en la concentración intracelular de ATP comparada con los niveles obtenidos en las condiciones control (21 % de O₂).

Como se observa en la Figura 23 la concentración de ATP fue preservada solamente cuando las células fueron tratadas con tioprolina que mantuvo la concentración de ATP próxima a la observada en condiciones control.

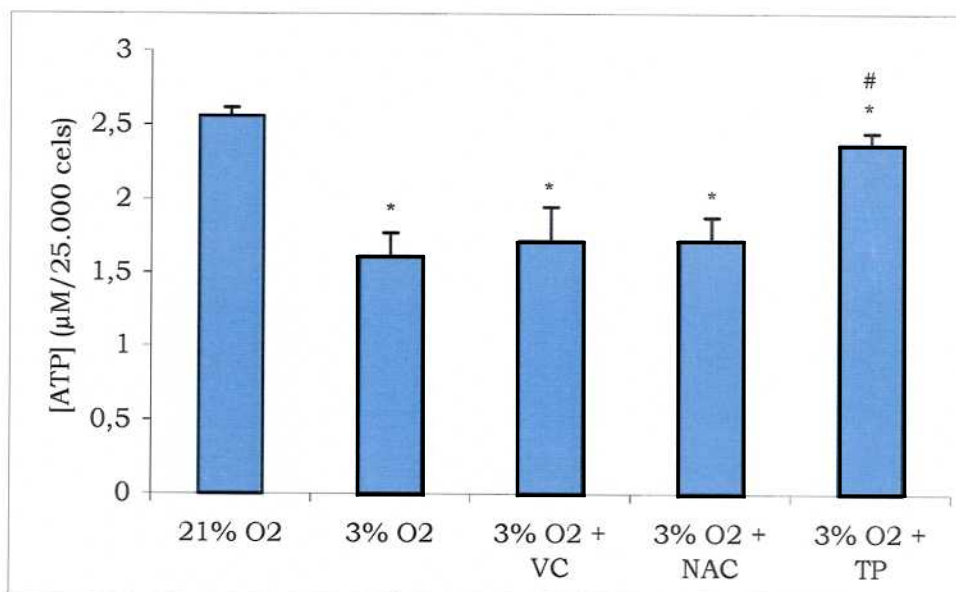


Figura 23. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LOS NIVELES DE ATP.

Contenido intracelular de ATP en células de EPRb incubadas durante 72 horas en normoxia e hipoxia, y en presencia de antioxidantes. Se siguió el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. del contenido intracelular de ATP, de tres experimentos realizados por triplicado (* = $p < 0,05$ comparado con el control en normoxia, (#) = $p < 0,05$ vs control hipoxia).

Se determinó la viabilidad celular tras someter a una hipoxia prolongada a las células midiendo los niveles de LDH secretados al medio de cultivo. Se observó un incremento significativo de la actividad LDH en condiciones de hipoxia al comparar con los resultados obtenidos en condiciones control (Figura 24).

Cuando las células se incubaron en hipoxia y en presencia de los antioxidantes se observó una reducción significativa en la liberación al medio de LDH, siendo el tratamiento con tioprolina el más efectivo.

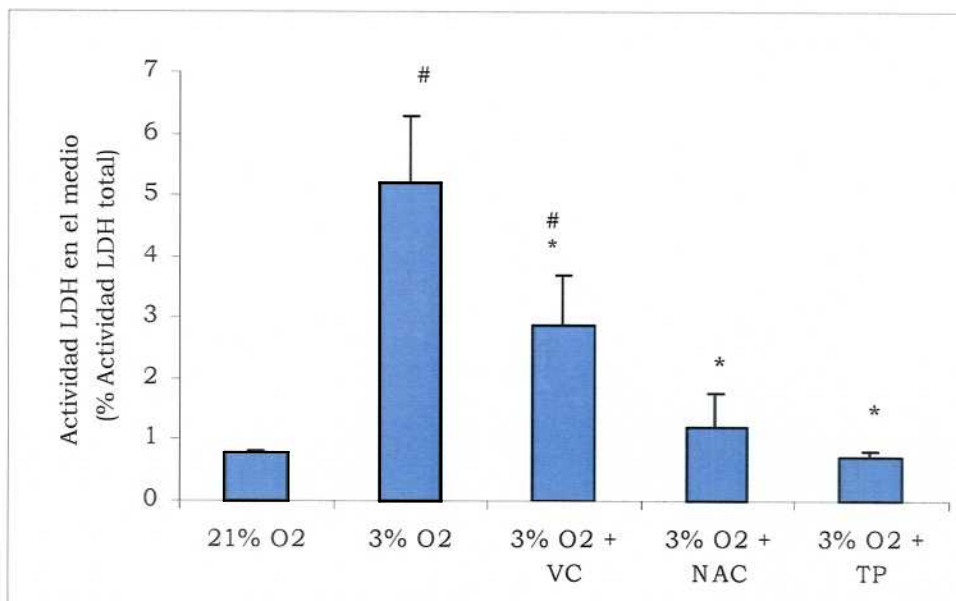


Figura 24. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Se determinó la actividad de LDH secretada al medio de cultivo por células de EPRb incubadas en normoxia (21% de O₂) o en hipoxia (3% de O₂), y en presencia de antioxidantes, siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. Las barras representan la media \pm D.E. del porcentaje de LDH total secretado al medio de cultivo en tres experimentos realizados por triplicado. (#) = $p < 0,05$ vs control normoxia; (*) = $p < 0,05$ vs control hipoxia).

Resultados

1.4. Inducción de apoptosis por estrés oxidativo

1.4.1. Detección mediante tinción con Hoechst

En el presente estudio se realizó la tinción Hoechst en los diferentes modelos de inducción de estrés oxidativo en las células de EPRb para comprobar si inducían apoptosis.

Los resultados se indican en las figuras presentadas a continuación. En las células de EPRb la apoptosis no muestra el típico patrón de cuerpos apoptóticos, en el que el núcleo se divide en pequeños fragmentos dando la impresión de que hay más de una célula. Cuando las células de EPRb sufren apoptosis muestran una reducción del tamaño del núcleo y una mayor fluorescencia que en condiciones normales (Osborne et al., 1997).

En la Figura 25 se muestra la tinción de los núcleos de células que se incubaron en medio de cultivo control. Como se puede apreciar, la fluorescencia es muy tenue y el aspecto de los núcleos es el de una célula normal.

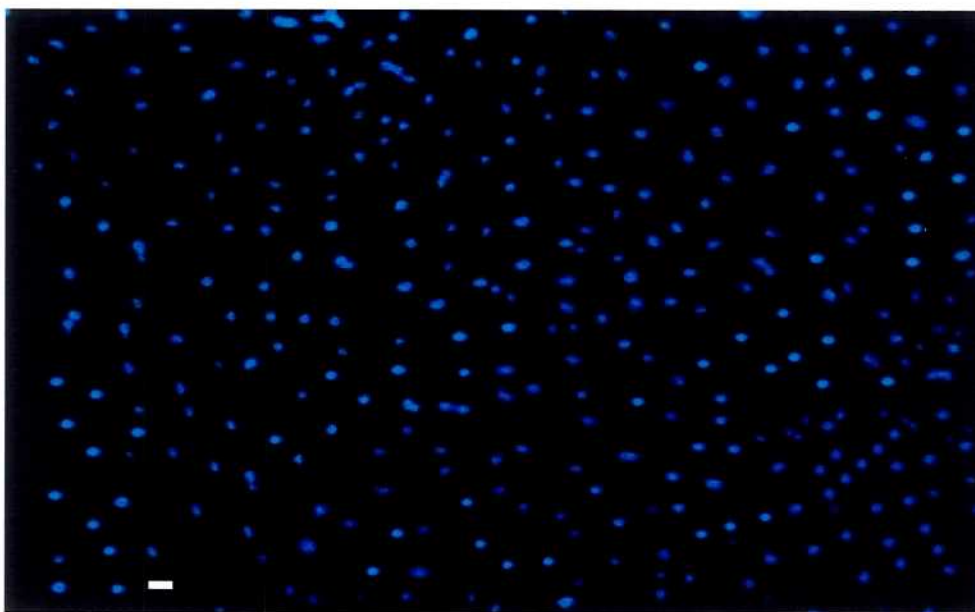


Figura 25. MORFOLOGÍA DE CÉLULAS DE EPRb. TINCION DE HOECHST.

Aspecto de las células de EPRb sin ningún tipo de estrés oxidativo. Las células se incubaron en medio de cultivo y posteriormente se realizó la tinción con Hoechst 33258 (0,05 µg/mL) durante 25 min., siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. Barra =20 µm

Cuando las células se incubaron con PN 50 μM se observó apoptosis como se muestra en la Figura 26, mientras que con las concentraciones más altas estudiadas se producía un aumento dosis dependiente de muerte por necrosis. Esta apoptosis inducida por PN 50 μM fue prevenida cuando las células se incubaron con NAC 10mM como se observa en la Figura 27.

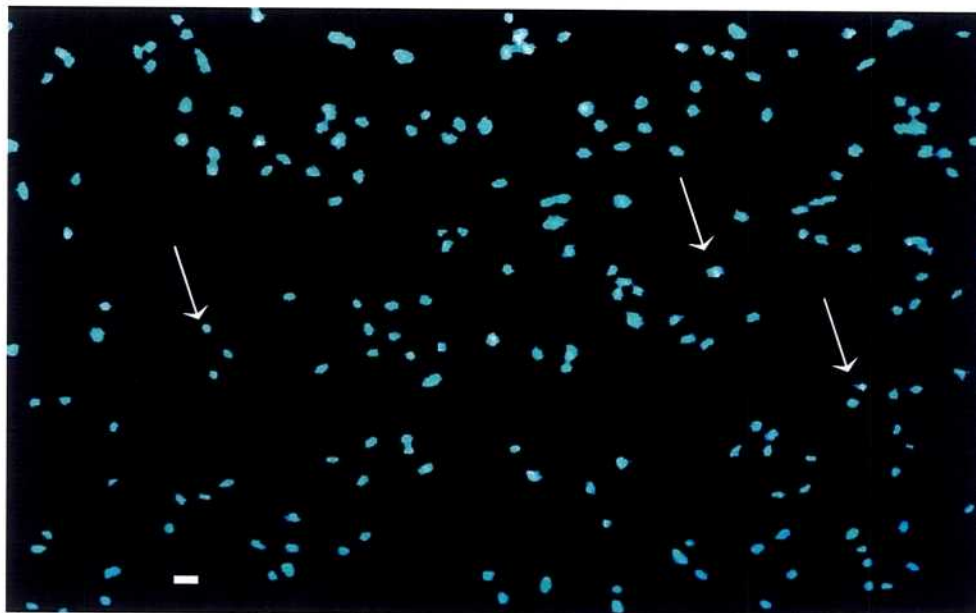


Figura 26. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CON PN 50 μM .

Estudio morfológico de la apoptosis en células del EPRb mediante tinción con Hoechst. Las células del EPR tras 1 horas de exposición a 50 μM PN fueron teñidas siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. Las flechas blancas señalan os núcleos apoptóticos. Barra =10 μm

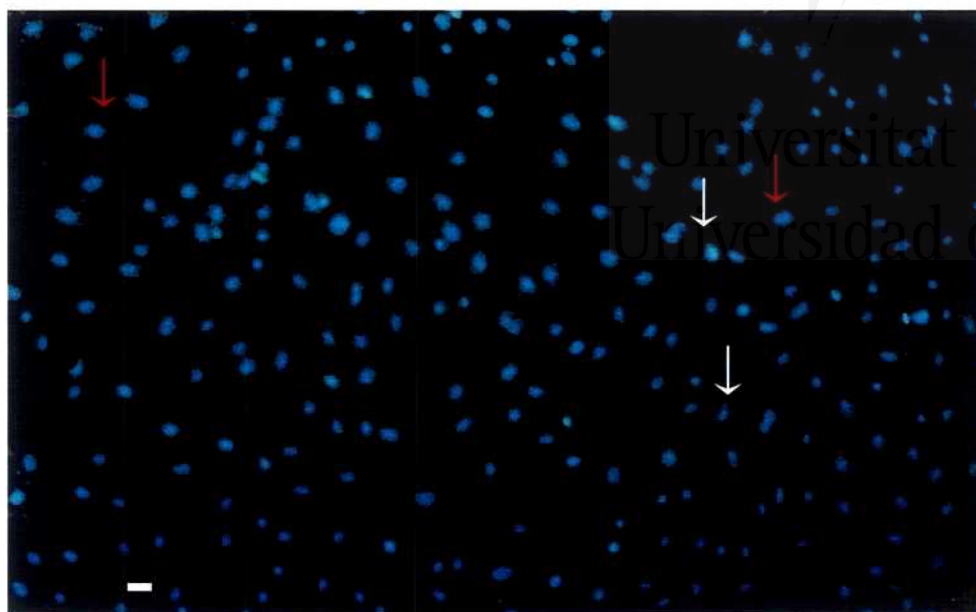
Resultados

Figura 27. EFECTO PROTECTOR DE NAC SOBRE PN 50 μ M.

Las células se preincubaron durante 1 hora con NAC 10mM y posteriormente fueron expuestas a PN 50 μ M durante 1 hora y se tiñeron siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos. Las flechas blancas indican los núcleos apoptóticos y las rojas los núcleos no apoptóticos. Barra= 10 μ m

En la Figura 28 se observa la ausencia de apoptosis en las células de EPRb expuestas a hipoxia química, *glucopenia* y a *isquemia química*, morfología que también se observó cuando las células se incubaron con los antioxidantes previamente a la incubación con los diferentes agentes químicos inductores del estrés oxidativo. Como se puede observar, la morfología celular no varía con respecto a la de las células control, no sometidas a ningún tipo de estrés (Figura 25).

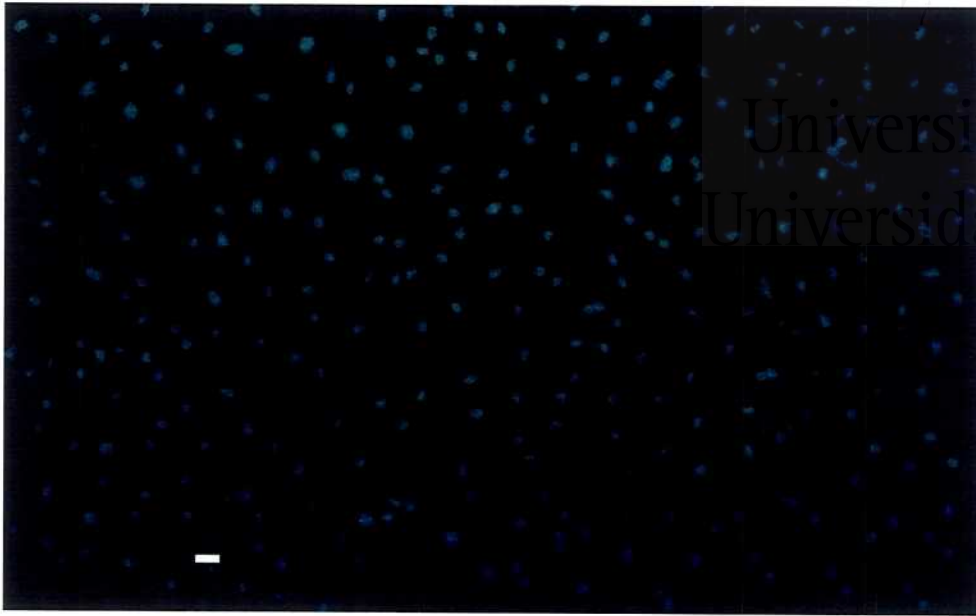


Figura 28. EFECTO DE LA HIPOXIA QUÍMICA SOBRE LA APOPTOSIS.

Las células se incubaron durante 15 min con OLCN para someterlas a hipoxia química y posteriormente se fijaron con PFA 4% para teñirlas según el protocolo de la Tinción con Hoechst descrito en Material y Métodos. Barra= 20 μ m.

Como se muestra en la Figura 29, en las condiciones de hipoxia ambiental (3% de O₂ durante 72 horas) se observó apoptosis. Cuando las células se preincubaron con los antioxidantes y posteriormente se expusieron a una hipoxia prolongada (3% de O₂ durante 72 horas) se observó que los antioxidantes protegían frente al daño celular producido por la exposición a las bajas concentraciones de oxígeno como se observa en la Figura 30, donde el antioxidante utilizado fue VC, menos efectivo que NAC (Figura 31). El antioxidante más efectivo fue TP como se observa en la Figura 32.

Resultados

Figura 29. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CON HIPOXIA AMBIENTAL.

Se observa la morfología de las células del EPRb tras haber sido incubadas durante 72 horas en una atmósfera al 3% de O₂ con medio de cultivo sin SFB. Las flechas señalan los núcleos apoptóticos. Barra= 10µm.

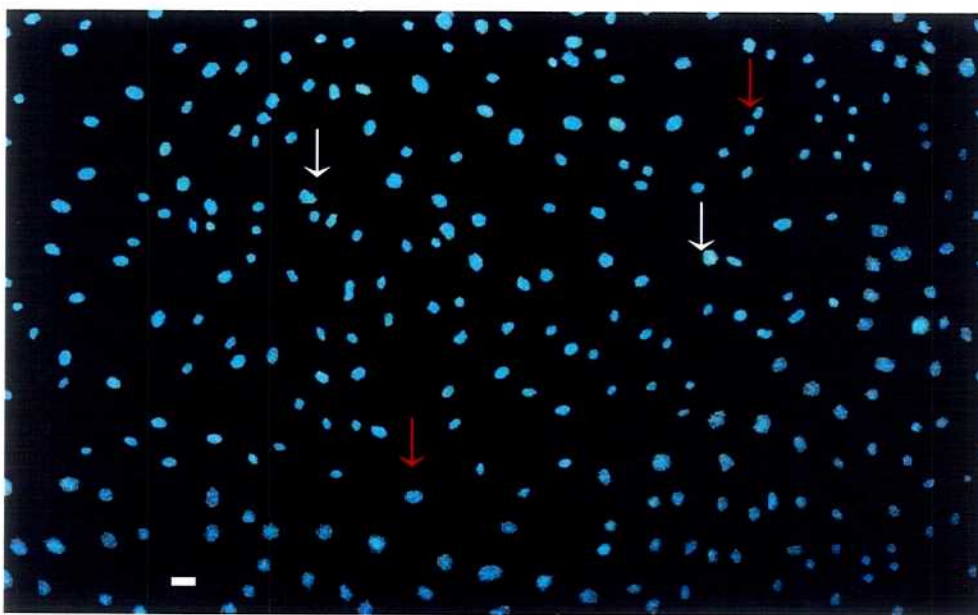


Figura 30. EFECTO DE VC SOBRE LA HIPOXIA AMBIENTAL.

Las células del EPRb se preincubaron durante 2 horas con VC antes de ser expuestas a una hipoxia ambiental transcurrido el periodo de incubación se realizó la tinción con Hoechst. Las flechas blancas indican los núcleos apoptóticos y la rojas los no apoptóticos. Barra= 20µm.

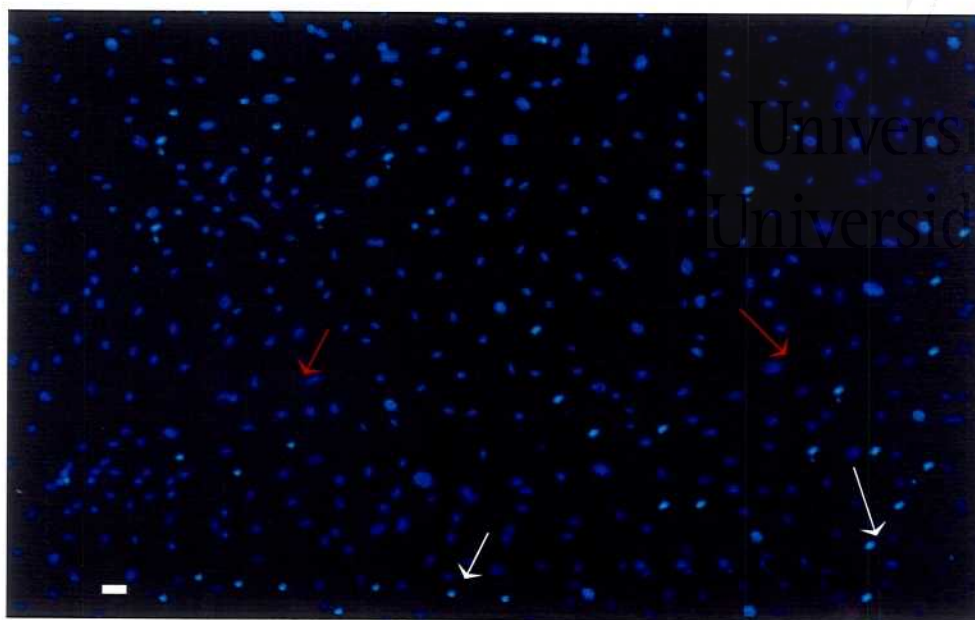


Figura 31. EFECTO DE NAC SOBRE LA HIPOXIA AMBIENTAL

Las células se preincubaron con NAC durante 2 horas y posteriormente se incubaron durante 72 horas en una atmósfera al 3% O₂. Transcurrido la incubación se fijaron con PFA al 4% y se realizó la Tinción de Hoechst siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos. Las flechas blancas señalan los núcleos apoptóticos y las rojas los núcleos no apoptóticos. Barra= 20µm.

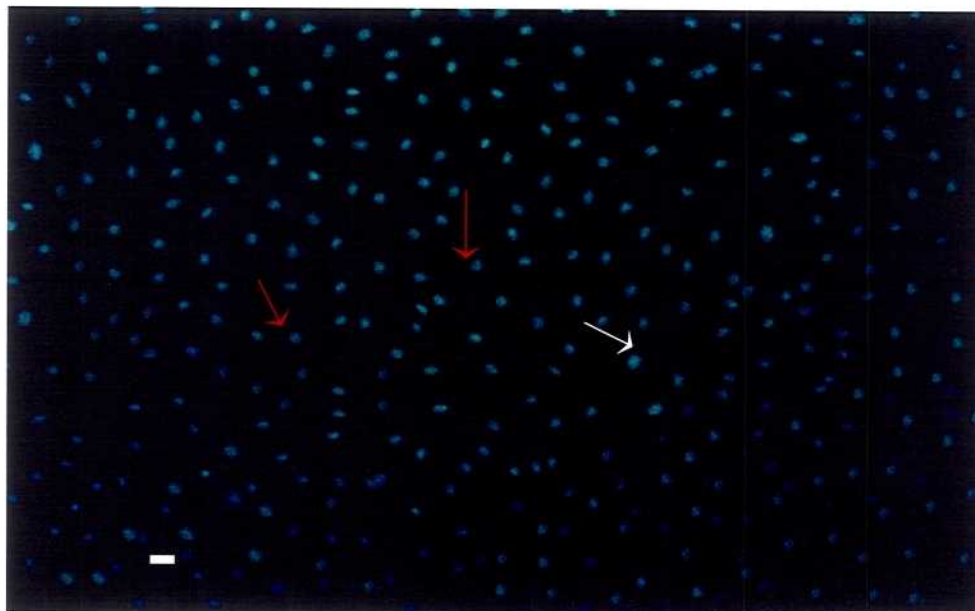


Figura 32. EFECTO DE TP SOBRE LA HIPOXIA AMBIENTAL

Las células se preincubaron con TP durante 2 horas y posteriormente se incubaron durante 72 horas en una atmósfera al 3% O₂. Posteriormente se realizó la Tinción de Hoechst siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos. Las flechas blancas indican los núcleos apoptóticos y las rojas los núcleos no apoptóticos. Barra= 20µm.

Resultados

1.4.2. Electroforesis en gel de agarosa

Después de determinar qué tipo de estrés induce muerte celular por apoptosis mediante la tinción Hoechst, se confirmaron los resultados mediante realización de electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron para este estudio la hipoxia ambiental y el PN como inductores de apoptosis.

En la Figura 33 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de PN sobre las células del EPRb. La fragmentación del ADN se muestra como una “estela” que va disminuyendo su intensidad conforme aumenta la concentración de PN siendo la más intensa la calle 4 correspondiente a la concentración de PN 50 μM , en las calles 5 a 7, en las que se representan concentraciones crecientes de PN, disminuye la intensidad de la estela ya que la muerte es por necrosis y no se produce fragmentación del ADN.

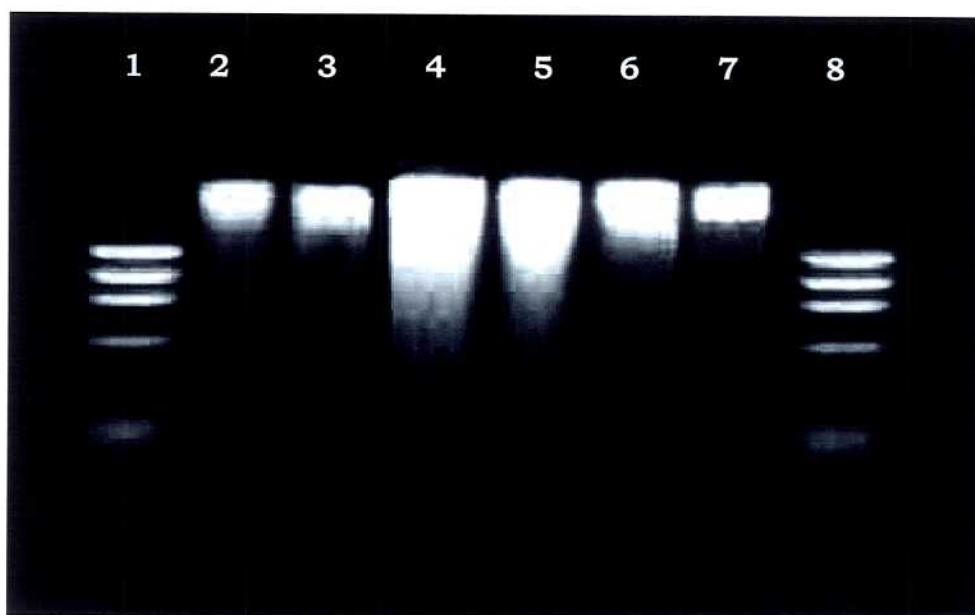


Figura 33. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR PEROXINITRITO.

Se detectó la muerte celular por apoptosis mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. La fragmentación del ADN se demuestra por una estela en las calles correspondientes. 1 y 8: Standard de ADN ($\Phi\text{X174 DNA/ HAE III}$); 2: Control negativo (solvente del PN); 3: 0 μM PN; 4, 5, 6 y 7: 50, 100, 250 y 500 μM de PN, respectivamente.

Cuando las células se incubaron con los inhibidores de la PARP y el antioxidante NAC a la concentración 10 mM, se observó como disminuía la fragmentación del ADN extraído de estas células al igual que sucedía en la tinción de Hoechst, como se observa en la Figura 34, siendo NAC y 3-AB los que mayor protección ofrecen (calles 6 y 4, respectivamente).

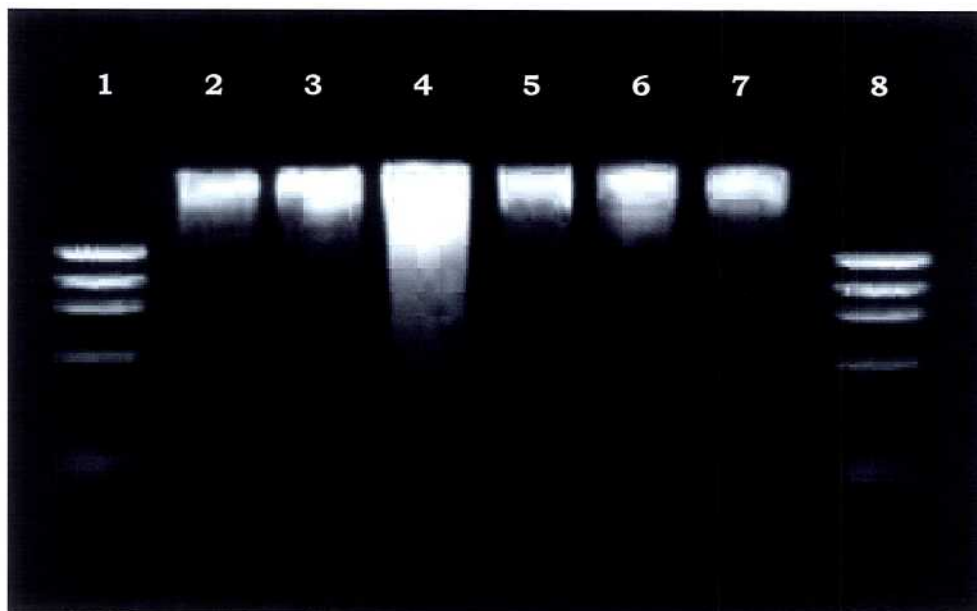


Figura 34. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PARP Y NAC SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PEROXINITRITO.

Se determinó el efecto protector de los inhibidores de la PARP (3-AB y NM) y NAC sobre la muerte celular por apoptosis inducida por PN 50 μ M, según el protocolo experimental descrito en Material y Métodos. Para ello se realizó electroforesis en gel de agarosa siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. La fragmentación del ADN se demuestra por una estela en las calles correspondientes. Calles 1 y 7: Standard de ADN (Φ X174 DNA/ HAE III); calle 2: Control negativo (solvente del PN); calle 3: PN 50 μ M; calle 4: PN 50 μ M + 3-AB 10mM, calle 5: PN 50 μ M + NM 10mM, calle 6: PN 50 μ M + NAC 10mM.

Resultados

En células expuestas a hipoxia prolongada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa, en el que quedó reflejado la “típica” estela de la fragmentación de ADN en la calle 3 (3% O₂) no observada en la calle 2 (21% O₂), como se observa en la Figura 35, también se quedó reflejado como los antioxidantes poseen un efecto inhibitor de la apoptosis, siendo el más eficaz TP (calle 6), seguido de NAC (calle 5).

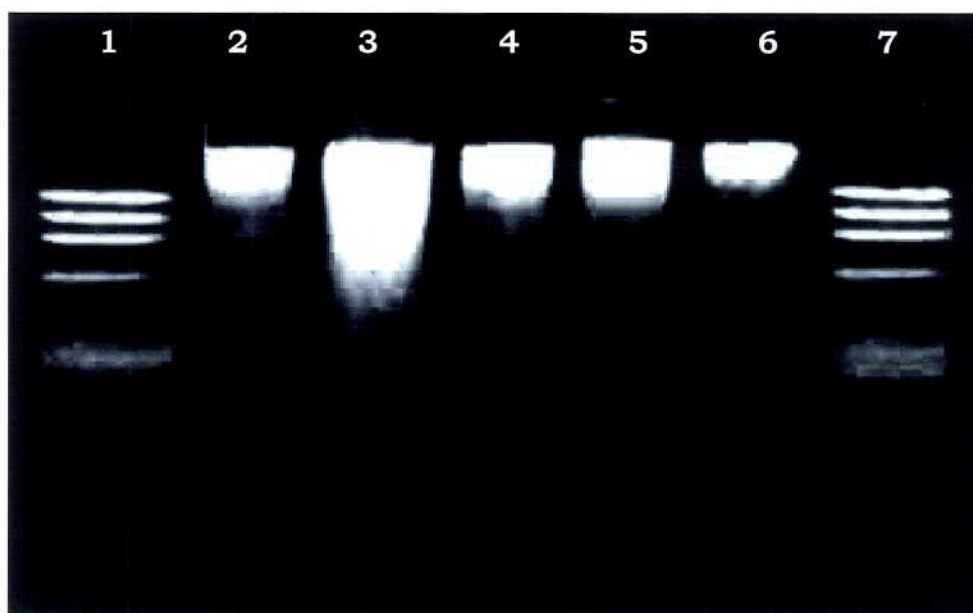


Figura 35. EFECTO PROTECTOR DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR HIPOXIA AMBIENTAL.

Se determinó el efecto protector de los antioxidantes sobre la muerte celular por apoptosis inducida por un exposición prolongada de bajas concentraciones de O₂, mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. Calles 1 y 7: Standard de ADN (ΦX174 DNA/HAE III); calle 2: Control 21 % O₂; calle 3: Hipoxia (3 % O₂) calle 4: 3 % O₂ + VC, calle 5: 3 % O₂ + NAC; calle 6: 3 % O₂ + TP.

2. Modelo de envejecimiento *in vivo*

2.1. Supervivencia y parámetros fisiológicos del ratón

2.1.1. Supervivencia de la población

En el grupo de animales control, que a lo largo de todo el ensayo recibieron pienso de mantenimiento, tuvo lugar una disminución progresiva de la supervivencia partiendo de un 100% al inicio del estudio. Así se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) del número de ratones supervivientes en el grupo control hasta llegar a un 55% de supervivencia al terminar el estudio.

De los ratones que consumían antioxidantes, aquellos cuya dieta fue suplementada con TP tenían una mayor supervivencia (un 75 %), y los que recibieron NAC en el pienso mostraban la mayor longevidad aunque, al alcanzar el último mes del estudio, la supervivencia disminuyó marcadamente hasta un nivel del 60%.

Las medias de los valores del porcentaje de supervivencia de los ratones NAC y TP, desde 50 a 62 semanas, eran significativamente diferentes ($p < 0,05$) en relación con el porcentaje de supervivencia de los ratones control (Tabla 4; Figura 36).

Edad	42	46	50	54	58	62
Control	100 ± 0,01 (20)	95 ± 0,01 (19)	80 ± 0,01 ^a (16)	72,5 ± 3,5 ^a (14)	68 ± 4,0 ^a (13)	55 ± 0,01 ^a (11)
NAC	100 ± 0,01 (20)	90 ± 0,01 ^{a,b} (18)	90 ± 0,01 ^{a,b} (18)	90 ± 0,01 ^{a,b} (18)	90 ± 0,01 ^{a,b} (18)	67,5 ± 10,6 ^{a,b} (12)
TP	100 ± 0,01 (20)	95 ± 0,01 ^a (19)	85 ± 0,01 ^{a,b} (17)	82,5 ± 3,5 ^{a,b} (16)	77,5 ± 4 ^{a,b} (15)	75 ± 0,01 ^{a,b} (15)

Tabla 4. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

Porcentaje de ratones supervivientes en poblaciones control (alimentadas con pienso estándar), y en las que consumían pienso suplementado con NAC o TP. Entre paréntesis: número de ratones supervivientes ((a) = $p < 0,05$ vs control 42 semanas; (b) = $p < 0,05$ frente control misma edad).

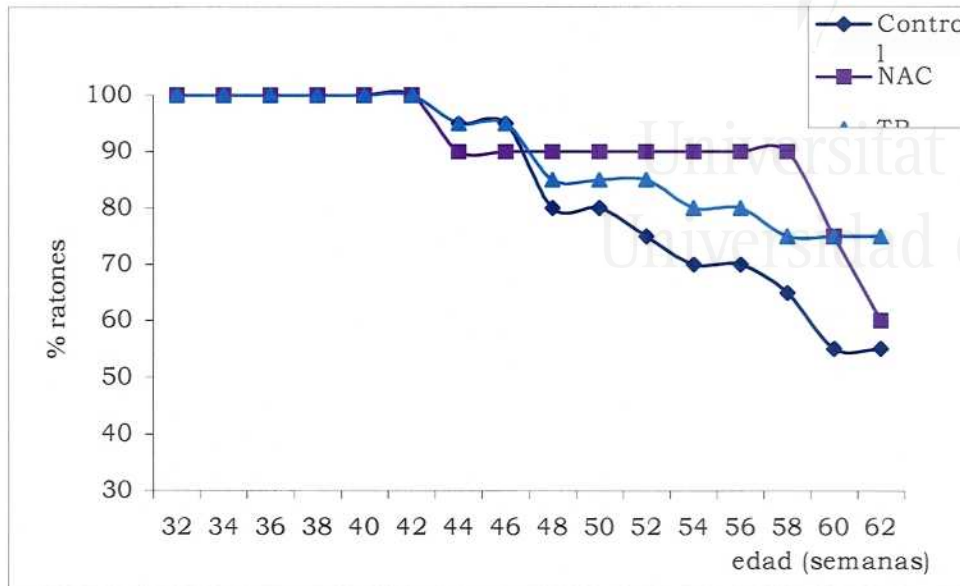
Resultados

Figura 36. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA SUPERVIVENCIA.

Curva de supervivencia de la población de ratones hembra OF1, subdividida en tres grupos: control, NAC y TP. Al inicio del estudio (a las 32 semanas): n=20 ratones por grupo, y al final (62 semanas): n=11, 12 y 15, para los grupos control, NAC y TP, respectivamente.

2.1.2. Peso corporal

Al comparar los resultados obtenidos en los ratones control con la curva ponderal facilitada por los suministradores de la cepa estudiada (OF1) se observó que, a cada edad investigada, el peso de los ratones de nuestra población estaba dentro del rango normal. El peso que al inicio del estudio, a la edad de 32 semanas, era de $34,8 \pm 3,2$ g, se fue incrementando progresivamente con el paso del tiempo, como se muestra en la Figura 37. Al finalizar el estudio, a la edad de 62 semanas, el peso era de $38,4 \pm 4,9$ g.

En los animales de los grupos que consumían antioxidantes se observó la misma tendencia al aumento del peso corporal. Así en los animales tratados con NAC el peso medio al inicio del estudio, de $35,3 \pm 1,7$ g, se fue elevando hasta alcanzar un valor de $38,5 \pm 1,7$ g, y en los ratones que consumieron TP el peso aumentó de $34,6 \pm 3,1$ g hasta $39,5 \pm 2,8$ g (Figura 37).

Aunque en los tres grupos de animales el peso aumentaba con el paso del tiempo, no se observaron cambios significativos en este parámetro debidos a la edad o al consumo de antioxidantes.

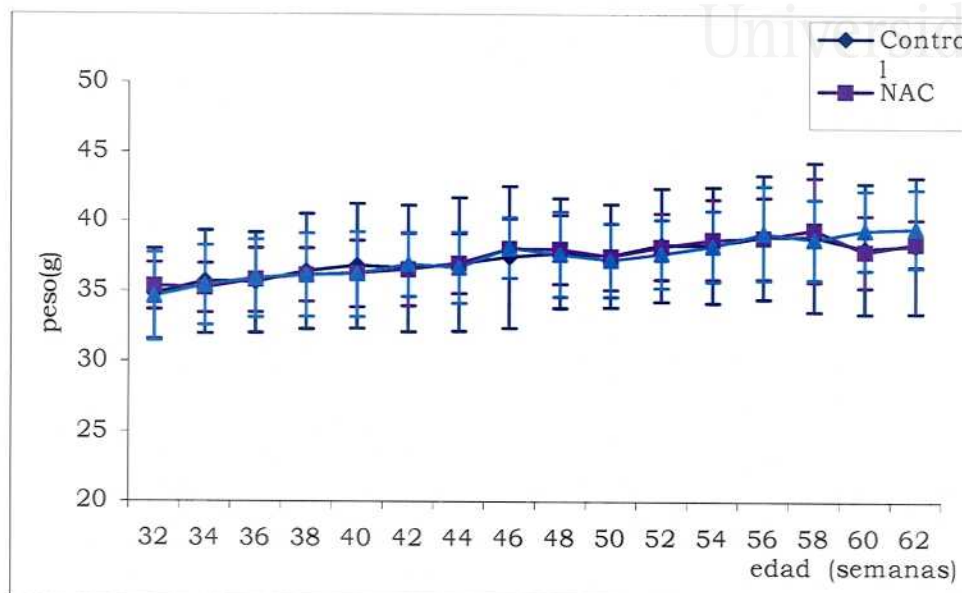


Figura 37. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE EL PESO CORPORAL.

Cambios con la edad del peso corporal de los ratones. Se realizó una determinación cada dos semanas del peso de cada uno de los animales. En la gráfica están representadas las medias \pm desviación estándar de los animales control, NAC y TP (n=20 por grupo).

El envejecimiento se acompaña de un aumento en la heterogeneidad de los ratones en lo que respecta a los valores del peso corporal (como evidencia el aumento de su desviación estándar, de las 32 a las 62 semanas de edad). Este efecto desorganizador del envejecimiento no tuvo lugar en los animales que consumían NAC o TP, a causa de la probable acción protectora de estos antioxidantes sobre los mecanismos homeostáticos que preservan el mantenimiento de un peso normal. Si se compara la distribución de valores del peso corporal en intervalos de 5g, a diferentes edades, se observa que el porcentaje de ratones de peso elevado (>40,0 g) de los tres grupos aumenta al envejecer (Figura 38).

Resultados

Como se observa en esta figura, la curva de distribución del peso de los ratones control se “aplana” considerablemente con el paso del tiempo, al ganar peso los ratones, mientras que en las curvas de los grupos que fueron tratados con antioxidantes destaca un “pico” que refleja que la homeostasis de estos animales es capaz de mantener el peso de la mayoría de los ratones en el rango más normal para esta edad de 36,0-40,9 g.

En resumen, el análisis estadístico de los datos revela que el porcentaje de ratones que se encuentran en el rango de 31,0-35,9 g es significativamente más elevado ($p < 0,05$) a las 32-38 semanas que a una mayor edad. Por otra parte, el porcentaje de ratones que se encuentran en el rango de 36,9-40,9 g es mayor ($p < 0,05$) para los animales tratados con antioxidantes que para los animales control.

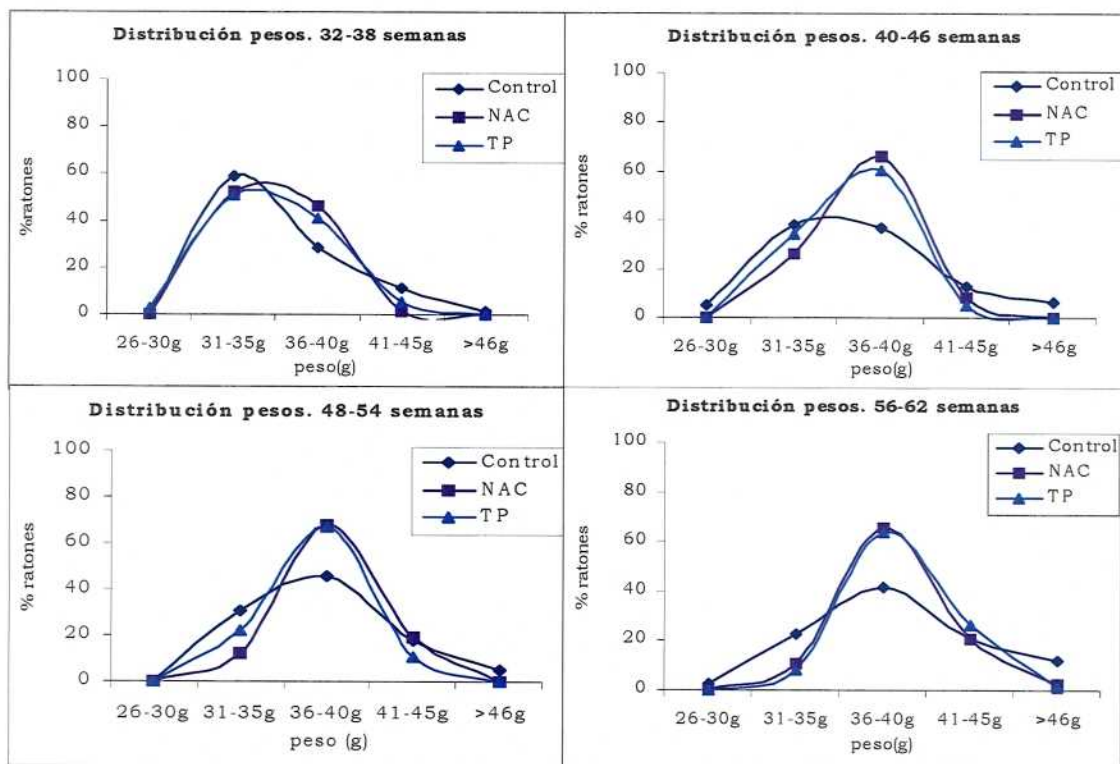


Figura 38. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE PESOS CORPORALES.

Se representa la distribución de los pesos corporales de los ratones de varias edades, expresada como % de ratones en cada rango de pesos ($n=20$ por grupo de cada edad). (26-30 significa 26,0-30,9 g, 31-35 significa 31,0-35,9 g, etc).

Como se puede observar en la Figura 39, nuestros datos sugieren que el estudio de la distribución de los pesos corporales de los ratones en el rango 31,0-40,9g proporciona un sencillo método para identificar los animales que probablemente sufren un envejecimiento prematuro, es decir muestran una edad biológica mayor que su edad cronológica. Se puede observar en esta Figura que el pico en la curva de los pesos de los ratones supervivientes (S) corresponde al valor de 33-34 g, mientras que los picos de la curva de los ratones no-supervivientes (NS) de la misma edad cronológica (32-38 semanas) y la de los ratones supervivientes, cuya edad cronológica era aproximadamente dos meses mayor (40-46 semanas), coinciden en el valor de 35-36 g.

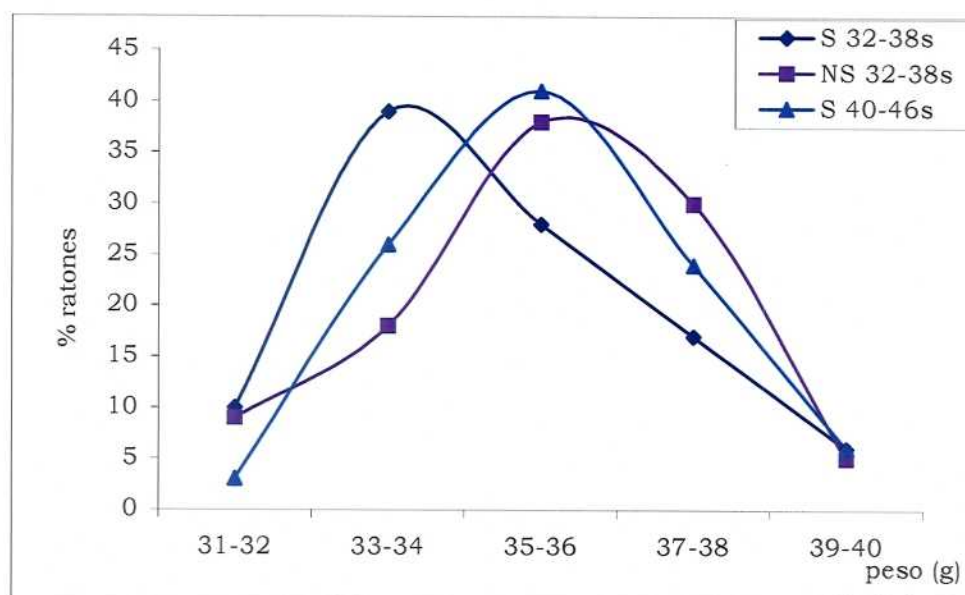


Figura 39. DISTRIBUCIÓN DE LOS PESOS CORPORALES.

Curvas de distribución de los valores medios del peso corporal de ratones supervivientes y no-supervivientes ("prematuramente envejecidos"). Las edades de determinación del peso fueron 32-38 semanas y 40-46 semanas para los animales supervivientes (n=38) y 32-38 semanas para los no-supervivientes (n=34). (31-32 significa 31,0-32,9 g, etc).

Resultados

Una comparación de la Figura 39 con la Tabla 5 sugiere que el análisis de la distribución de los pesos corporales individuales, que hace resaltar la aparición de subgrupos de ratones de peso no-óptimo, puede ser un método más sensible, para detectar los efectos del envejecimiento (normal o prematuro), que el examen de los valores medios del peso, que aunque tienden a aumentar (de 35,4 a 36,5 g en los S, y de 36,3 a 36,9 g en los NS), no muestran alteraciones estadísticamente significativas desde las 32 a las 46 semanas de edad.

Así de acuerdo con lo antes expuesto, la Tabla 6 muestra que el porcentaje de ratones control cuyo peso está comprendido entre los 30,0 y los 34,9 g (*peso óptimo*) es mayor en el grupo de los supervivientes que en el de los no-supervivientes a lo largo del estudio (con valores a las 32-38, 40-46 y 48-54 semanas de 73, 45 y 27 % para los S, y de 33, 22 y 20 % para los NS, respectivamente).

Edad Semanas	Supervivientes (S)			No supervivientes (NS)		
	Control (11)	NAC (12)	TP (15)	Control (9)	NAC (8)	TP (5)
32-38	35,4 ± 3,6	35,5 ± 1,6	35,3 ± 3,2	36,3 ± 3,2	35,5 ± 1,9	35,8 ± 1,5
40-46	36,5 ± 4,7	36,2 ± 1,9	36,5 ± 2,4	36,9 ± 4,4	37,5 ± 2,0	38,0 ± 2,3^a

Tabla 5. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL PESO CORPORAL.

Efectos del envejecimiento y de la suplementación del pienso con antioxidantes sobre el peso medio de los ratones (en gramos). Entre paréntesis: número de ratones en cada grupo ((a) = p <0,05 vs animales de 32-38 semanas del mismo grupo).

Edad	32-38 semanas		40-46 semanas		48-54 semanas	
Grupos	S (11)	NS (9)	S (11)	NS (9)	S (11)	NS (5)
	32*	32*	32*	30*	32*	34*
	33*	34*	33*	33*	34*	37
	33*	34*	34*	35	34*	38
	34*	35	34*	36	35	40
	34*	35	34*	36	36	43
	34*	37	35	38	37	
	34*	38	36	39	37	
	34*	40	36	42	38	
	38	42	37	44	39	
	39		48		43	
	44		48		46	
Peso ± D.E. (g)	35,5 ± 3,6	36,3± 3,2	36,5 ± 4,7	36,9± 4,4	37,4 ± 4,1	38,4± 3,4
% ratones de peso "juvenil"	73 %	33 %^a	45 %	22 %^a	27 %	20 %^a

Tabla 6. CALCULO DEL PORCENTAJE DE PESO EN CADA EDAD.

Peso, a tres edades, de cada ratón control del grupo de supervivientes (S) y de los ratones no-supervivientes (NS), que no sobrevivieron hasta el fin del estudio a las 62 semanas. (30 significa 30,0-30,9 g, etc; el asterisco* identifica los pesos óptimos). Entre paréntesis: número de animales en cada grupo (a= p<0,05 con respecto al valor del porcentaje de pesos óptimos en los ratones supervivientes de la misma edad).

Como se indica en la Tabla 7, hay una relación directa entre el porcentaje de ratones control que muestran un peso óptimo (30,0-34,9 g) a las 32-38 semanas de edad y el porcentaje de animales que sobreviven hasta el final del estudio.

Edad (semanas)	Peso (g)	Nº total de ratones (S y NS)	% ratones supervivientes
32-38	30,0 - 34,9	11	73
	≥ 35,0	9	33^a

Tabla 7. RELACION PESO IDEAL Y SUPERVIVENCIA.

En esta tabla se establece la relación existente entre el peso corporal de los ratones control a la edad de 32-38 semanas y la supervivencia (a=p<0,05 con respecto al porcentaje de supervivientes de peso 30,0-34,9g).

Resultados

La comparación de los datos de la Tabla 7 con los de la Tabla 6 sugiere que la administración de los antioxidantes en el pienso se asocia con mayores porcentajes de supervivientes en los grupos de ratones de peso $\geq 35,0$ g a las 32-38 semanas de edad, en comparación con el porcentaje de supervivencia que muestran los ratones control del mismo peso. Así, los valores son 57% y 69% para el grupo NAC y el grupo TP, respectivamente, y sólo 33% para los control, con diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de supervivientes de cada uno de los grupos de ratones de peso no-óptimo tratados con antioxidante y el porcentaje de supervivientes del grupo control ($p < 0,05$). En los animales tratados con TP también se observa un efecto beneficioso sobre el porcentaje de supervivientes de peso óptimo, según las determinaciones realizadas a las 32-38 semanas.

Edad (semanas)	Peso (g)	NAC	TP
32-38	30,0-34,9	67 % (6)	86 % ^a (7)
	$\geq 35,0$	57 %^a (14)	69 %^a (13)

Tabla 8. EFECTO DE ANTIOXIDANTES SOBRE EL PESO Y ENVEJECIMIENTO.

Porcentaje de ratones supervivientes (S) en relación con el peso corporal y el consumo de antioxidantes. Entre paréntesis: número de ratones en el grupo ($a = p < 0,05$ con respecto a los porcentajes de ratones S control de igual peso, cuyos datos se muestran en la Tabla 4).

Los datos de supervivencia y de distribución de pesos corporales de los ratones también pueden ser objeto de representación gráfica como *histograma ponderal* tanto en estudios sobre los mecanismos del envejecimiento como en las investigaciones para valorar la eficacia de los tratamientos antioxidantes. Como se puede observar en la Figura 40, y de acuerdo con lo antes expuesto, el envejecimiento se asocia con cambios muy marcados en la distribución de los pesos corporales de los ratones, con descenso del porcentaje de ratones de

peso “óptimo para las expectativas de supervivencia” (30,0-34,9 g), del 70% al 35%, desde las 32-38 a las 48-54 semanas de edad.

Simultáneamente, se produce el correspondiente aumento del porcentaje de ratones de peso elevado (≥ 35 g; “no-óptimos para la supervivencia”). También se puede observar en la Figura 40 que a la edad de 32-38 semanas el porcentaje de ratones de peso óptimo (más “juvenil”) es significativamente mayor en el grupo de supervivientes que en el de no-supervivientes.

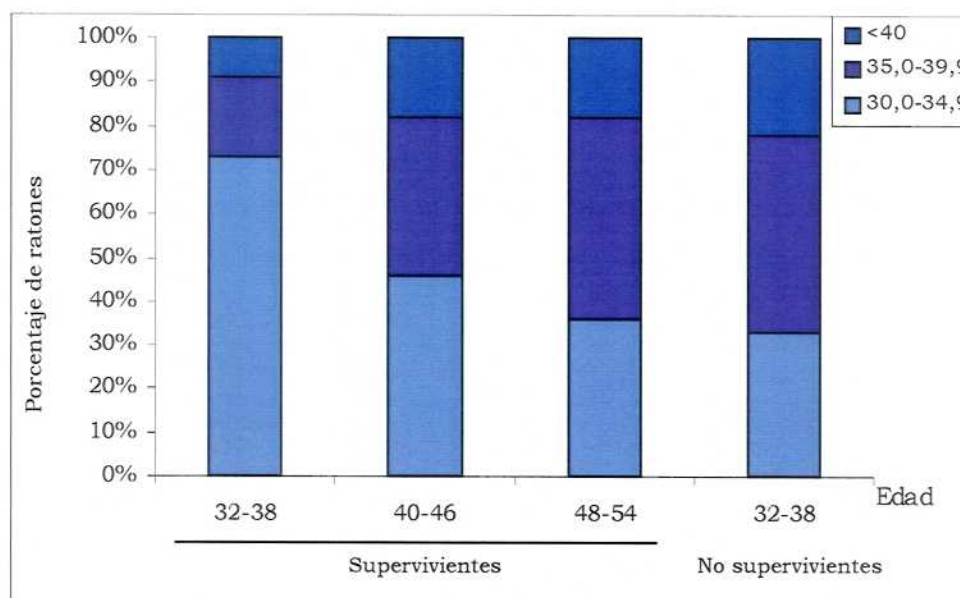


Figura 40. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

Con la edad se producen cambios en la distribución de los pesos de los ratones control ($n=11$ para los supervivientes, y $n=9$ para los no-supervivientes; edad en semanas). Existen diferencias significativas ($p<0,05$) entre las varias edades para los porcentajes de ratones supervivientes de peso 30,0-34,9 g, así como para los de peso $\geq 35,0$ g.

Por otra parte, a la edad de 32-38 semanas, el porcentaje de animales de peso 30,0-34,9 g (peso óptimo) de los ratones no-supervivientes había descendido a un nivel aproximadamente igual al del porcentaje de animales

Resultados

de dicho peso que se encontraba en el grupo de supervivientes de mayor edad cronológica (48-54 semanas).

Como muestra la Figura 41, el histograma ponderal es muy adecuado para presentar en forma resumida los resultados de los estudios con antioxidantes en ratones cuyo peso está comprendido en los dos rangos de peso corporal investigados. Se observa que, mientras la administración de NAC no influye significativamente en el porcentaje de supervivientes de peso 30,0-34,9 g, la suplementación del pienso con TP sí que muestra un efecto beneficioso, aunque sin significancia estadística sobre el porcentaje de supervivientes que mostraban este peso óptimo a la edad de 32-38 semanas.

Por otra parte, en los grupos de animales de peso no óptimo la diferencia entre el porcentaje de supervivientes en el grupo control (41%) y en el que consumía TP (68%) es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

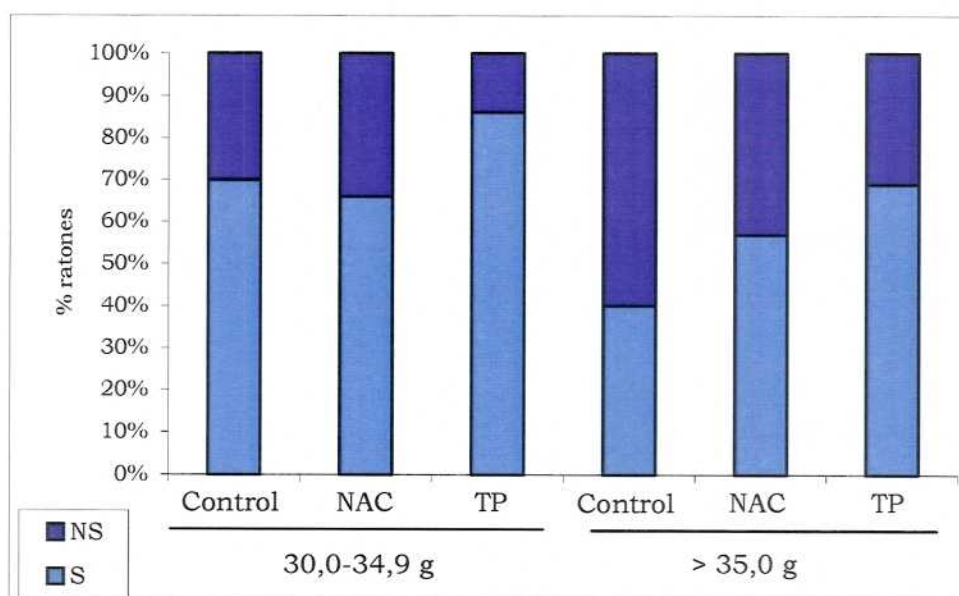


Figura 41. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE PESOS CORPORALES.

Supervivencia de ratones control y tratados con los antioxidantes en los dos rangos de peso (óptimo y no-óptimo), según los valores del peso corporal determinados a las 32-38 semanas de edad. En los ratones de peso no óptimo (>35,0 g) hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de supervivientes en el grupo de ratones control y en el de los ratones suministrados TP.

2.1.3. Consumo promedio de pienso

Como ya se ha indicado, la ingesta se calculó pesando al inicio de cada período de quince días el pienso, que se coloca en el compartimento de cada jaula y pesando de nuevo el pienso que queda en la jaula a los quince días. Dividiendo el valor de la diferencia entre ambas cantidades por el número de días (o sea 15) y por el número de animales alojados en la jaula, se obtienen los valores expresados en la Figura 42.

El consumo fue de $4,8 \pm 0,7$ g por ratón/día al inicio del estudio y de $4,6 \pm 0,8$ g al terminarlo, en el grupo control, mientras que los valores correspondientes a los grupos tratados con antioxidantes fueron: $4,4 \pm 0,5$ g y $4,7 \pm 0,2$ g para NAC; $3,7 \pm 0,6$ g y $4,3 \pm 0,3$ g para TP. Aunque la ingesta de pienso a lo largo del estudio (32 a 62 semanas de edad) fue mayor en los animales control (que recibían pienso estándar de mantenimiento) que en aquellos cuya dieta fue suplementada con antioxidantes, las diferencias entre el consumo quincenal de los control y el de los que ingerían antioxidantes no alcanzaron significancia estadística.

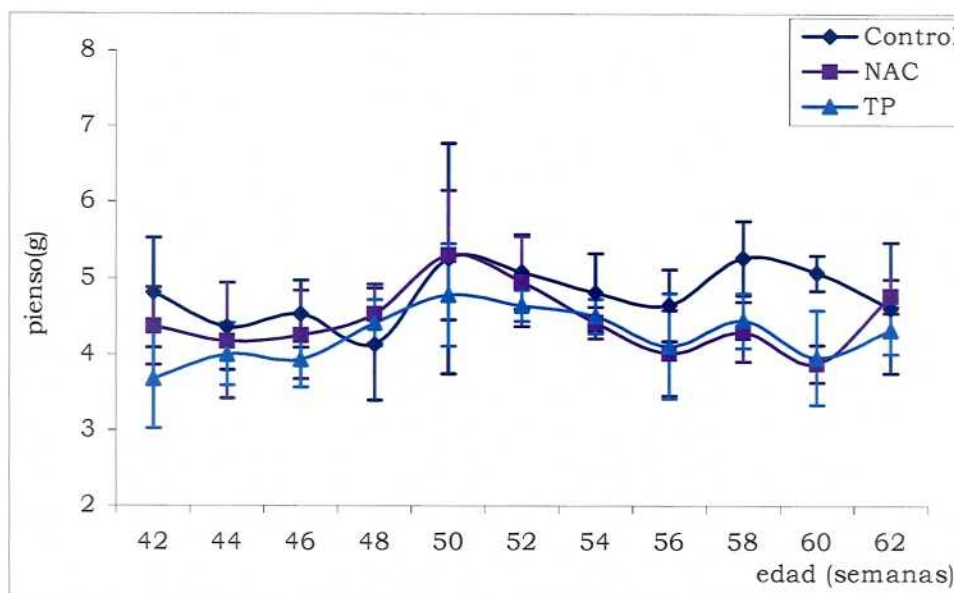


Figura 42. DISTRIBUCIÓN DEL CONSUMO DE ALIMENTO.

En la gráfica se representa la ingesta media de pienso por ratón (gramos/día) de los animales control y de los que consumían NAC o TP. (n=20 en cada grupo, al inicio del estudio; n=11, 12 y 15, respectivamente, al terminar).

Resultados

2.2. Efectos sobre parámetros de conducta

2.2.1. Prueba de coordinación neuromuscular y vigor

Los resultados obtenidos mediante esta prueba de “vitalidad” demuestran que, al envejecer, hay una pérdida progresiva del rendimiento funcional de la población expresado como el porcentaje de animales que realizan correctamente la prueba en un minuto o menos.

En el grupo control, cuando se inició el estudio a la edad de 32 semanas el porcentaje de ratones que realizaban la prueba con éxito (en menos de un minuto) era de un 47%, y al terminar el estudio (cuando los ratones habían alcanzado la edad de 62 semanas) dicho porcentaje había descendido al 11%.

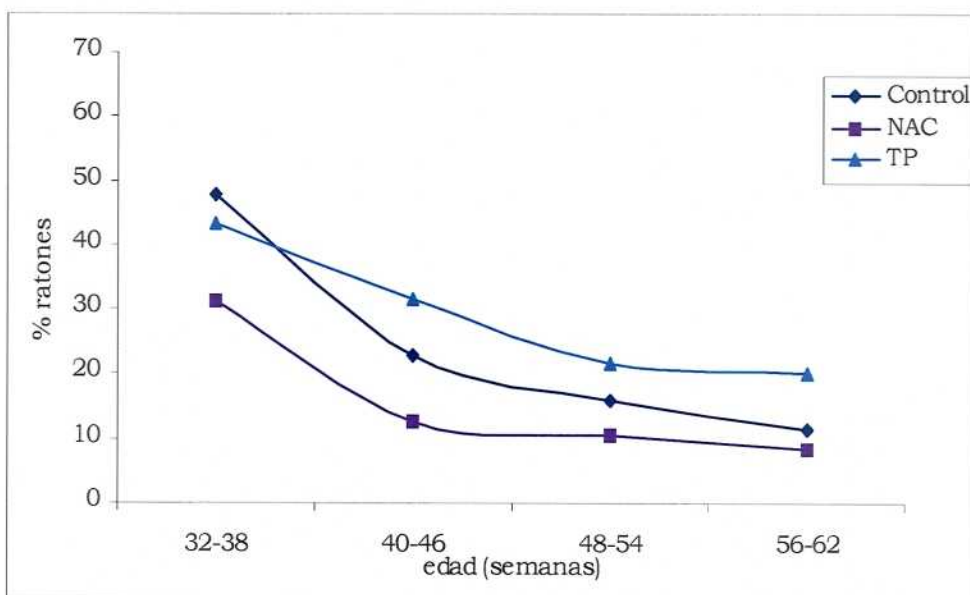


Figura 43. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO Y LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA COORDINACIÓN NEUROMUSCULAR.

Disminución con la edad del rendimiento en la prueba de vigor y coordinación neuromuscular (método de la cuerda tirante). Porcentaje de ratones que realizan el test en ≤ 60 segundos.

También se observaron descensos con la edad en el número de ratones de los grupos NAC y TP que realizaban con éxito el test de la cuerda tirante. No obstante, los datos sugieren que los tratamientos con estos antioxidantes tiólicos influyen en la prueba. Así, la administración de NAC parece ejercer un efecto negativo sobre la conducta de los ratones, mientras que la suplementación del pienso con TP probablemente ejerce un efecto protector sobre la pérdida de coordinación neuromuscular y vigor, ya que existen diferencias significativas al comparar con el grupo control (Figura 43).

Sin embargo, si expresamos los resultados como porcentaje de pérdida de rendimiento, asignando el valor de 100% a los resultados obtenidos en la primera prueba de cada grupo (control, NAC, TP), es obvio que el envejecimiento se acompaña de una marcada disminución de dicho rendimiento. Como se muestra en la Figura 43 (basada en los mismos datos de la Figura 43, convertidos en % preservado de un valor inicial del 100%) las diferencias entre los valores del rendimiento inicial a las 32-38 semanas y el rendimiento posterior, a las 40-46, 48-54 y 56-62 semanas son significativas tanto para el grupo control como para los que consumieron NAC o TP ($p < 0,05$, a todas las edades mencionadas).

Por otra parte, la administración de TP aparentemente preservaba el rendimiento en la prueba de la cuerda tirante (Figura 44). Así los valores del rendimiento en la cuerda tirante a las 40-46, 48-54 y 56-62 semanas eran mayores para el grupo de ratones al que se administró TP, en comparación con el grupo control y el grupo-NAC ($p < 0,05$ a las tres edades).

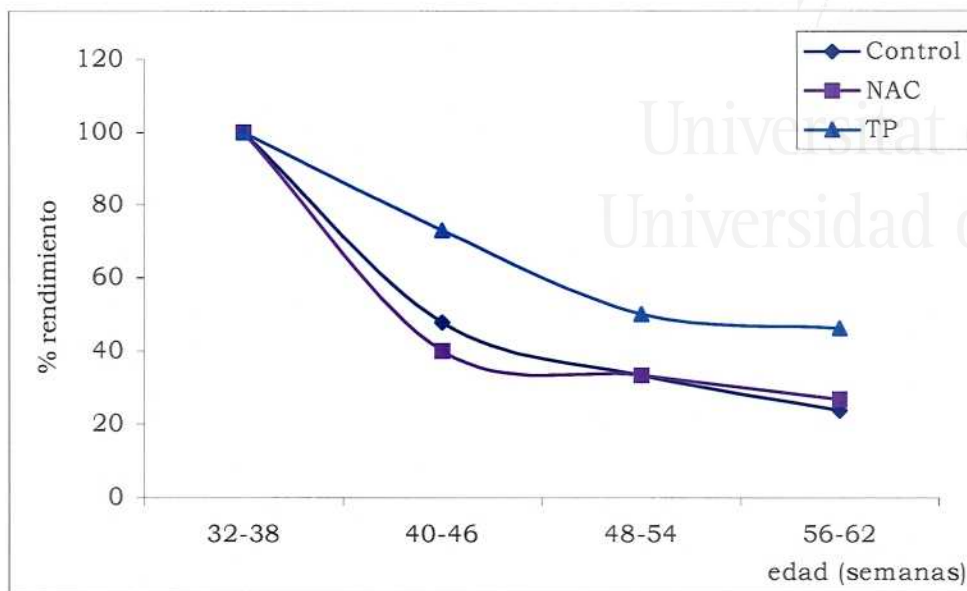
Resultados

Figura 44. EFICACIA DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA COORDINACIÓN NEUROMUSCULAR.

En esta Figura se representa el rendimiento (coordinación neuromuscular y vigor) en la prueba de la cuerda tirante: efectos de la edad y de la suplementación de la dieta con los antioxidantes tiólicos NAC y TP. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la edad de 56-62 y la edad de 32-38 semanas.

2.2.2. Efectos sobre la actividad exploratoria

Según estudios anteriores, el envejecimiento se acompaña de una disminución de la actividad exploratoria de los ratones en la prueba del laberinto en forma de T (De Juan, 1994; De la Fuente et al., 1998a). La presente investigación longitudinal también muestra un descenso con la edad en el número de ratones “rápidos” control (que completan en un tiempo ≤ 20 s la exploración del brazo de entrada en el laberinto).

No obstante, según se muestra en la Figura 45, el % de ratones “rápidos” en la población que alcanzó una longevidad mayor de 62 semanas (ratones supervivientes) podría aumentar de las 32-38 a las 40-46 semanas, debido al entrenamiento, en los ratones que consumen NAC ó TP, mientras que este efecto positivo del entrenamiento no tendría lugar en los animales control.

No obstante, los cambios que tienen lugar en este parámetro desde las 32-38 a los 56-62 semanas no son estadísticamente significativos ni en el grupo control ni en los tratados con los antioxidantes.

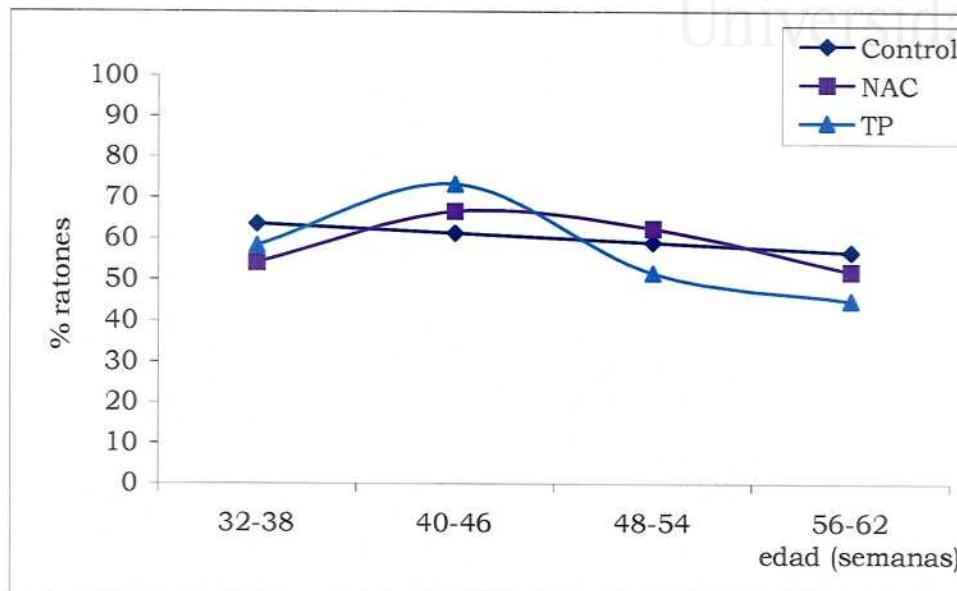


Figura 45. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA.

En esta figura se representan los efectos del entrenamiento y del envejecimiento sobre la actividad exploratoria espontánea en la prueba del laberinto en forma de porcentaje de ratones “rápidos” (que realizan el test con éxito en un tiempo ≤ 20 s).

Como complemento a la investigación anterior, de entre la población inicial de ratones se identificó el conjunto de animales que no sobrevivió durante el tiempo del estudio, es decir que no sobrepasó las 62 semanas de edad (al que, como ya hemos indicado, designamos “grupo no superviviente” o de “escasa longevidad”) y se determinaron los porcentajes de ratones “rápidos” que este grupo contenía a las diversas edades investigadas.

Resultados

Si se comparan las Figuras 45 y 46, a las edades de 40 a 62 semanas había un porcentaje mayor de ratones capaces de completar la exploración del laberinto en ≤ 20 segundos (ratones “rápidos”) en la población “longeva” que en los que mostraron una mortalidad prematura ($p < 0,05$). Estas diferencias entre el porcentaje de “ratones rápidos” presentes en la población “longeva” y en la de “escasa longevidad” de cada grupo (control, NAC, TP) son estadísticamente significativas a los 48-54 y 56-62 semanas ($p < 0,05$).

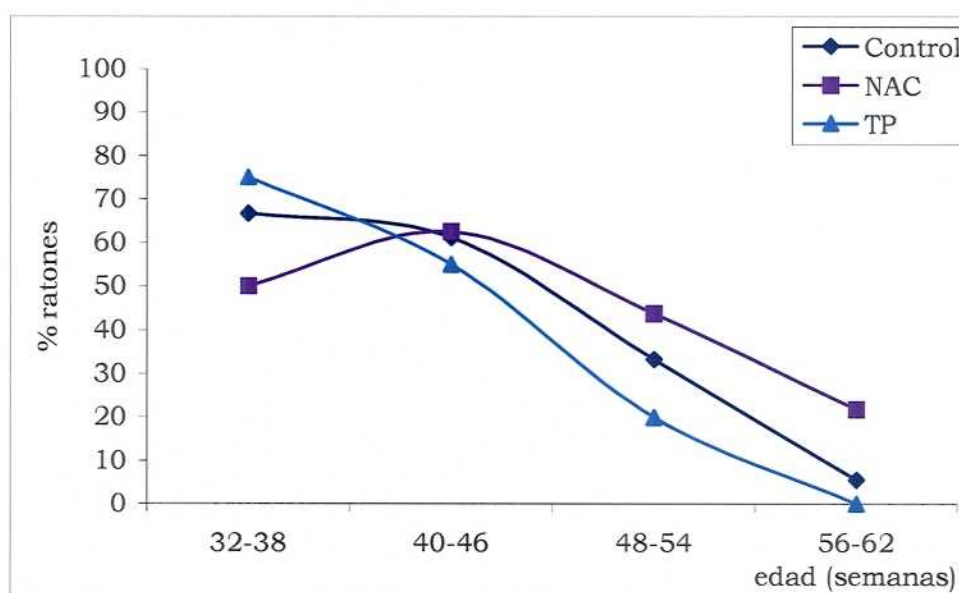


Figura 46. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA EN RATONES DE ESCASA LONGEVIDAD.

Se representan los efectos del envejecimiento y de la administración de antioxidantes en ratones de escasa longevidad sobre el porcentaje de ratones “rápidos” en la prueba de actividad exploratoria espontánea en el laberinto.

2.3. Determinaciones Bioquímicas

2.3.1. Consumo de oxígeno mitocondrial

El índice de control respiratorio (ICR) es una medida directa del acoplamiento de la mitocondria y de la eficiencia en la generación de ATP por la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La determinación del ICR (que se define como el cociente entre el estado 3, o activo, de la respiración mitocondrial y el estado 4, o de reposo) es útil para comprobar la integridad funcional de las mitocondrias. El método de determinación del ICR se estandarizó en mitocondrias de animales jóvenes (16 semanas), obteniéndose un valor de ICR de $4,16 \pm 0,36$ en mitocondrias hepáticas, mientras que en mitocondrias renales fue de $5,36 \pm 1,38$.

La temperatura elegida para medir el consumo de oxígeno fue 25 °C, ya que en controles previos se observó una mayor eficacia respiratoria a esta temperatura que a 37 °C, y el medio utilizado fue el tampón de ensayo descrito en la sección “Material y Métodos”, suplementado con rotenona para bloquear el complejo I de la cadena de transporte de electrones. El consumo de oxígeno se inició tras la adición de succinato 5 mM como sustrato de la cadena de transporte de electrones (estado 4), una vez estabilizado el registro se añadió ADP/Mg²⁺ 0,4 mM (estado 3).

Se determinó el consumo de oxígeno en ambos estados de la respiración mitocondrial, en mitocondrias aisladas de hígado y riñón de animales adultos y viejos.

* Mitocondrias hepáticas

Al comparar los valores de ICR obtenidos en mitocondrias hepáticas de animales de 48 (ICR= $2,16 \pm 0,26$) y 62 (ICR= $2,56 \pm 0,30$) semanas de edad con los obtenidos a partir de animales de 16 semanas (ICR = $4,16 \pm 0,36$), se puede observar que se produce un deterioro de la integridad mitocondrial paralelamente al envejecimiento cronológico de los ratones.

Resultados

Como se observa en la Tabla 9, dicha alteración se paraliza una vez que el animal alcanza la edad adulta ya que no se observaron diferencias significativas en el consumo de O₂ entre los animales adultos y viejos.

Al estudiar el efecto de los antioxidantes sobre el consumo de O₂ mitocondrial (Tabla 9) se observó que el ICR de las mitocondrias de animales adultos cuya dieta contenía fue significativamente superior al ICR de las mitocondrias de ratones adultos control, mientras que TP en este grupo careció de efecto (Figura 47).

En mitocondrias hepáticas procedentes de animales viejos (de 62 semanas) no se observaron diferencias en el consumo de O₂ en el estado 3 y 4 con respecto a los animales adultos (Tabla 9). En este grupo de animales que consumieron pienso con antioxidantes durante 5 meses, sólo TP mantuvo las mitocondrias hepáticas acopladas ya que el valor de ICR obtenido en los animales de 62 semanas de edad fue semejante al de los animales jóvenes (Figura 47).

	Adultos (48 semanas)		Viejos (62 semanas)	
	Estado 4	Estado 3	Estado 4	Estado 3
Control	0,68 ± 0,11	1,46 ± 0,19	0,50 ± 0,07	1,28 ± 0,49
NAC	0,65 ± 0,07	1,72 ± 0,50	0,38 ± 0,18	1,14 ± 0,36
TP	0,27 ± 0,04 ^a	0,64 ± 0,07 ^a	0,24 ± 0,07 ^b	0,96 ± 0,21

Tabla 9. EFECTO DE ANTIOXIDANTES SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE MITOCONDRIAS HEPÁTICAS.

Consumo de oxígeno en los estados 4 y 3 de las mitocondrias hepáticas aisladas de animales adultos y viejos, expresado como $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ((a)= $p < 0,05$ vs adulto control; (b) = $p < 0,05$ vs viejo control) .

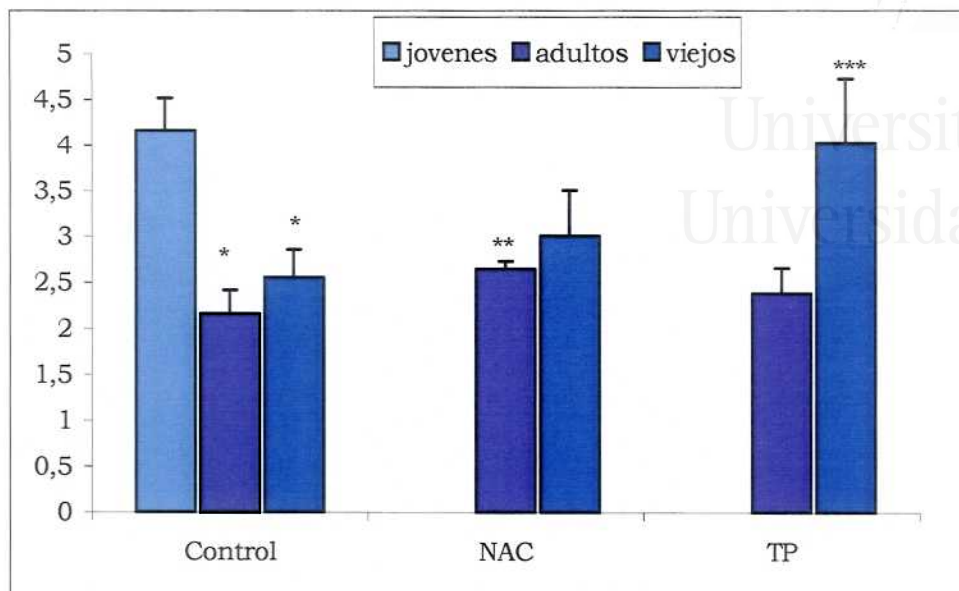


Figura 47. EFECTO DE ANTIOXIDANTES SOBRE EL ICR DE MITOCONDRIAS HEPÁTICAS.

Consumo de oxígeno de mitocondrias hepáticas de ratones control y de los que consumieron antioxidantes, expresado como ICR. (jóvenes=16 semanas, n=8; adultos=48 semanas, n=8; viejos=62 semanas; n=12) (*) = $p < 0,05$ vs joven control; (**) = $p < 0,05$ vs adulto control; (***) = $p < 0,05$ vs viejo control).

* Mitocondrias renales

Al contrario que en mitocondrias hepáticas, el envejecimiento de los ratones no llevó asociado una alteración de las mitocondrias renales ya que no sufrieron un desacoplamiento entre la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa ya que los valores de ICR obtenidos en mitocondrias renales de animales adultos ($4,19 \pm 0,69$) y viejos ($4,41 \pm 0,46$) no se diferenciaron significativamente del valor obtenido en animales jóvenes ($5,36 \pm 1,38$). Tampoco se observó ninguna diferencia significativa en el consumo de oxígeno y por tanto en el valor de ICR obtenido de las mitocondrias renales entre los animales de ambos grupos adultos o viejos tratados con NAC o TP (Tabla 10).

Resultados

Así pues, nuestros datos indican que las mitocondrias renales no sufren alteraciones de su capacidad respiratoria debidas al envejecimiento o a la suplementación de la dieta con antioxidantes.

	Adultos (48 semanas)			Viejos (62 semanas)		
	Estado 4	Estado 3	ICR	Estado 4	Estado 3	ICR
Control	0,98 ± 0,34	4,12 ± 0,90	4,19 ± 0,69	0,84 ± 0,21	3,47 ± 0,96	4,41 ± 0,46
NAC	0,75 ± 0,24	3,15 ± 0,48	4,20 ± 0,71	0,96 ± 0,20	3,66 ± 0,82	3,82 ± 0,90
TP	0,61 ± 0,11	2,85 ± 0,50	4,67 ± 0,59	0,81 ± 0,18	3,65 ± 0,69	4,50 ± 0,70

Tabla 10. EFECTO DE NAC Y TP SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO EN MITOCONDRIAS RENALES.

Consumo de O₂ de las mitocondrias renales aisladas de animales adultos y viejos, expresada como $\mu\text{moles de O}_2 \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ e ICR. (Adultos= 48 semanas, n=8; viejos=62 semanas, n=12).

2.3.2. Actividad citocromo c oxidasa

Se determinó la actividad específica de este complejo respiratorio en mitocondrias hepáticas y renales aisladas de ratones de diferentes edades. Los valores obtenidos a partir de animales jóvenes, de 16 semanas, fueron $0,68 \pm 0,3 \text{ M} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en mitocondrias hepáticas y $0,57 \pm 0,15 \text{ M} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en mitocondrias renales (Figura 48 y 49).

Con la edad, la actividad enzimática del enzima citocromo c oxidasa mostró una disminución significativa en ambos tipos mitocondriales, descendiendo hasta valores de $0,20 \pm 0,05$ en el caso de mitocondrias hepáticas de animales adultos o de $0,29 \pm 0,08$ en el caso de mitocondrias renales de animales de la misma edad (Figura 48 y 49).

* Mitocondrias hepáticas

Con respecto a las mitocondrias hepáticas, no se observó un cambio estadísticamente significativo en la actividad del citocromo c oxidasa desde las 48 a las 62 semanas de edad y al determinar la actividad de este enzima en mitocondrias hepáticas de los ratones que consumieron antioxidantes, se observó que tanto NAC como TP fueron ineficaces tanto en animales adultos como viejos (Figura 48).

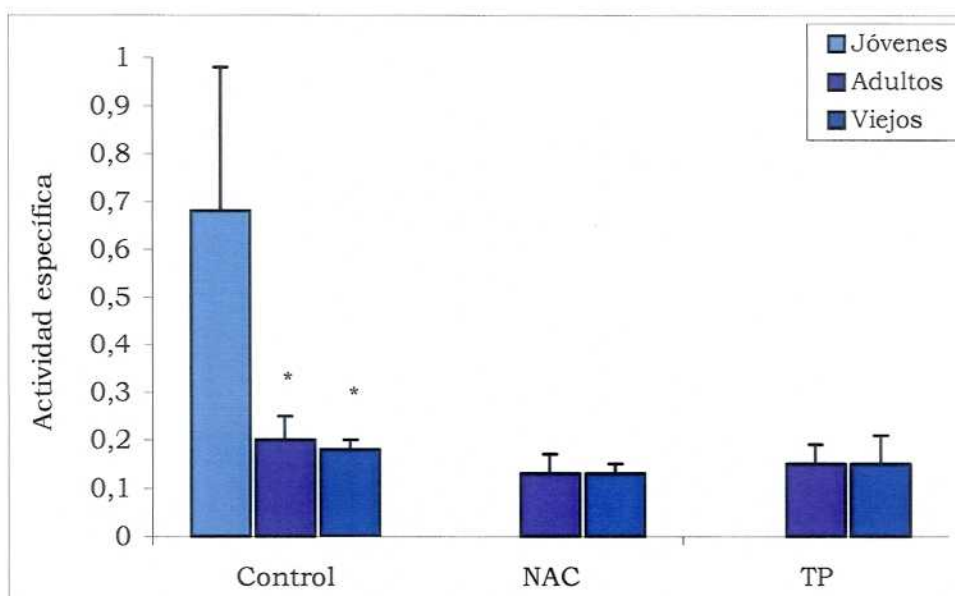


Figura 48. ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA DE MITOCONDRIAS HEPÁTICAS: EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES

Actividad de la citocromo c oxidasa (expresada como Actividad específica en $M \cdot mg \text{ proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) en mitocondrias hepáticas control y de animales que consumían dieta suplementada con antioxidantes. (Jóvenes: 16 semanas; $n=8$; Adultos=48 semanas; $n=8$; Viejos=62 semanas; $n=12$, (*) $p < 0,05$ vs joven control).)

* Mitocondrias renales

Con respecto a las mitocondrias renales de los animales control, se observó una disminución significativa de la actividad enzimática entre los animales adultos y viejos, en los que el valor de la actividad específica del enzima citocromo c oxidasa descendió hasta valores de $0,15 M \cdot mg \text{ prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en el grupo de los animales viejos, de 62 semanas de edad (Figura 49).

Resultados

En la misma figura se puede observar que el tratamiento con NAC no fue eficaz ni en los animales adultos, cuya actividad enzimática incluso disminuyó significativamente con respecto al adulto control, ni en las mitocondrias de animales viejos cuya dieta fue suplementada con NAC durante 5 meses.

El tratamiento con TP, no fue eficaz tras 2 meses de tratamiento con este antioxidante pero sí lo fue tras 5 meses de tratamiento, ya que la actividad enzimática de citocromo c oxidasa alcanzó valores similares a los obtenidos en animales adultos control de 48 semanas de edad, y superiores a la actividad observada en animales viejos sin suplemento de TP en la dieta.

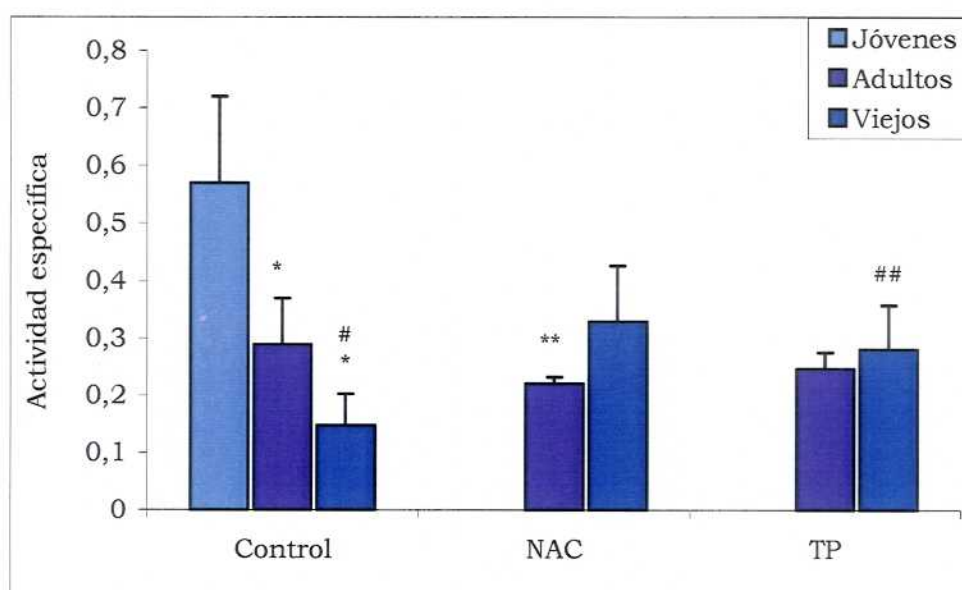


Figura 49. ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA RENAL: EFECTO DE ANTIOXIDANTES

Actividad de la citocromo c oxidasa de mitocondrias renales (expresada como actividad específica en $M \cdot mg \text{ proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). (Jóvenes: 16 semanas, $n=8$; Adultos: 48 semanas, $n=8$; Viejos: 62 semanas, $n=12$). (*) $p < 0,05$ frente joven control, (**) $p < 0,05$ frente adulto control, (#) $p < 0,05$ viejo frente adulto, (##) $p < 0,05$ frente viejo control).

2.3.3. Actividad citrato sintetasa

Se determinó la actividad de este enzima marcador de matriz mitocondrial, en mitocondrias hepáticas y renales aisladas de ratones de diferentes edades. Los valores obtenidos a partir de animales jóvenes, de 16 semanas, fueron $94,23 \pm 19,75$ nmoles \cdot min $^{-1}\cdot$ mg proteína $^{-1}$ en mitocondrias hepáticas y $307,67 \pm 60,44$ nmoles \cdot min $^{-1}\cdot$ mg proteína $^{-1}$ en mitocondrias renales (Figuras 50 y 51).

Con la edad, esta actividad enzimática mostró una disminución significativa en ambos tipos mitocondriales, descendiendo en el caso de mitocondrias hepáticas hasta valores de $45,91 \pm 6,34$ en animales adultos o $55,66 \pm 12,09$ en animales viejos; y en el caso de mitocondrias renales hasta valores de $116,94 \pm 17,29$ en animales adultos o $148,01 \pm 0,05$ en animales viejos (Figuras 50 y 51).

* Mitocondrias hepáticas

Cuando se proporcionó pienso con NAC a los ratones de 9 meses de edad durante 2 ó 5 meses, la actividad enzimática fue ligeramente superior a los valores obtenidos en los grupos control de animales adultos y envejecidos. Sin embargo tras el consumo de TP, el efecto protector sobre la actividad enzimática fue muy evidente, manteniendo dicha actividad enzimática, tanto en los ratones adultos como en los viejos, semejantes a los obtenidos en los animales jóvenes de 16 semanas de edad (Figura 50)

* Mitocondrias renales

Cuando se determinó la actividad de la citrato sintetasa de mitocondrias renales de animales control no se observaron diferencias significativas entre animales adultos y viejos.

El efecto de NAC en animales de 48 y 62 semanas de edad no mostró diferencias significativas con respecto a los animales de la misma edad del grupo control. Sin embargo el tratamiento con TP durante 5 meses si fue eficaz previniendo una disminución de la actividad del enzima citrato sintetasa en los animales de 62 semanas de edad, alcanzando valores semejantes a la actividad enzimática de mitocondrias de ratones de 16 semanas de edad (Figura 51).

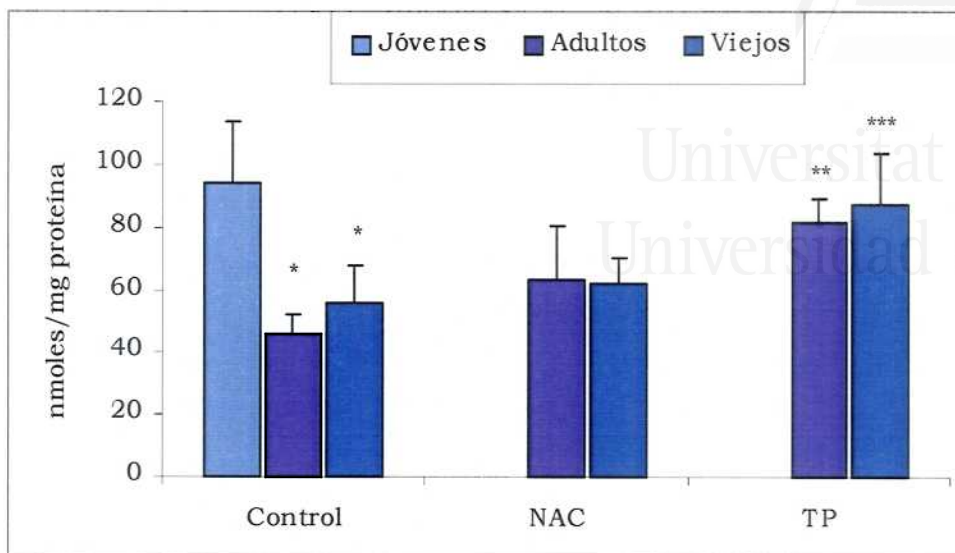
Resultados

Figura 50. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA ACTIVIDAD CITRATO SINTETASA HEPÁTICA.

Actividad del enzima citrato sintetasa en mitocondrias hepáticas (expresada como [Actividad catalítica] = $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$). (Jóvenes:=16 semanas, n=8; Adultos=48 semanas, n=8; Viejos=62 semanas, n=12). (*) $p < 0,05$ vs joven control ; (**) $p < 0,05$ vs adulto control; (***) $p < 0,05$ vs. viejo control.

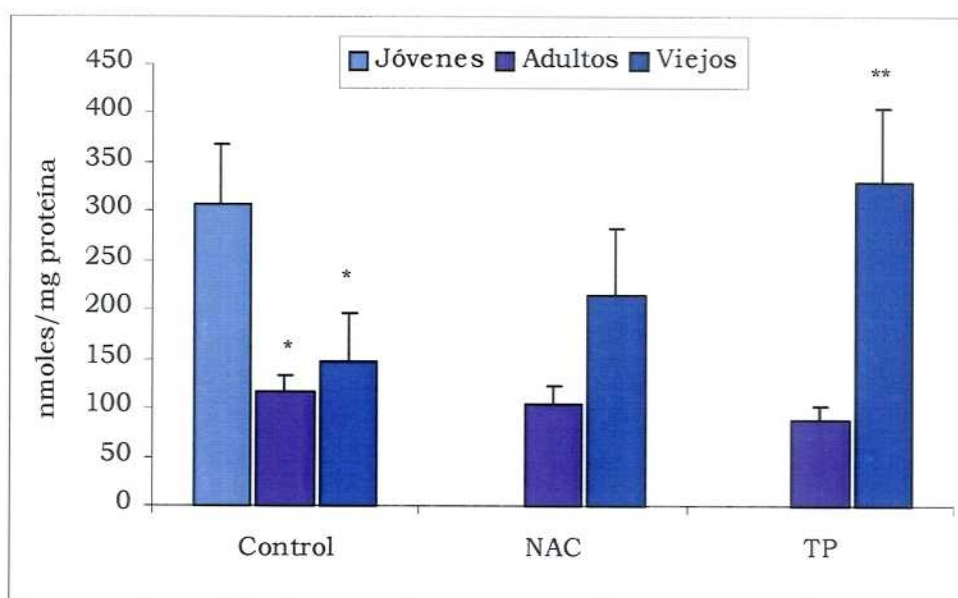


Figura 51. EFECTO DE NAC Y TP SOBRE CITRATO SINTETASA RENAL.

Actividad del enzima citrato sintetasa en mitocondrias renales (expresada como [Actividad catalítica] = $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$). (Jóvenes: 16 semanas, n=8; Adultos=48 semanas, n=8; Viejos=62 semanas, n=12).(*) $p < 0,05$ frente jóvenes control; (**) $p < 0,05$ vs viejos control)

2.3.4. Determinación de Malondialdehído

El objetivo principal de esta determinación fue comprobar si los órganos de los ratones viejos (62 semanas) mostraban una mayor peroxidación lipídica y por lo tanto sufrían un envejecimiento prematuro. Para ello se analizaron, como indicador de peroxidación lipídica, los niveles de malondialdehído (MDA), mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogenizados de hígado y corteza renal. En paralelo se cuantificaron estos niveles en los órganos de ratones adultos control prematuramente envejecidos y en los de ratones de la misma edad cronológica (24 ± 2 semanas) que no habían envejecido prematuramente.

Los niveles de MDA en ratones prematuramente envejecidos (PE) (ratones “lentos” en el test del laberinto) son significativamente superiores a los no prematuramente envejecidos (NPE; ratones “rápidos” en el test del laberinto), y los niveles en los adultos PE son similares a los de los viejos NPE (resultados no mostrados).

La ingestión de antioxidantes tiólicos NAC y TP tiene un efecto evidente en los animales PE, reduciendo significativamente los niveles de MDA, que llegan a ser similares a los que muestran los NPE control (Figuras 52 y 53). Por ejemplo, en la corteza renal de animales PE se demostraron niveles de $2,03 \pm 0,28$ nmoles/mg proteína, y en animales PE suplementados con NAC los valores fueron de $1,56 \pm 0,34$ nmoles/mg proteína, valores similares a los del MDA de los animales control NPE ($1,51 \pm 0,14$).

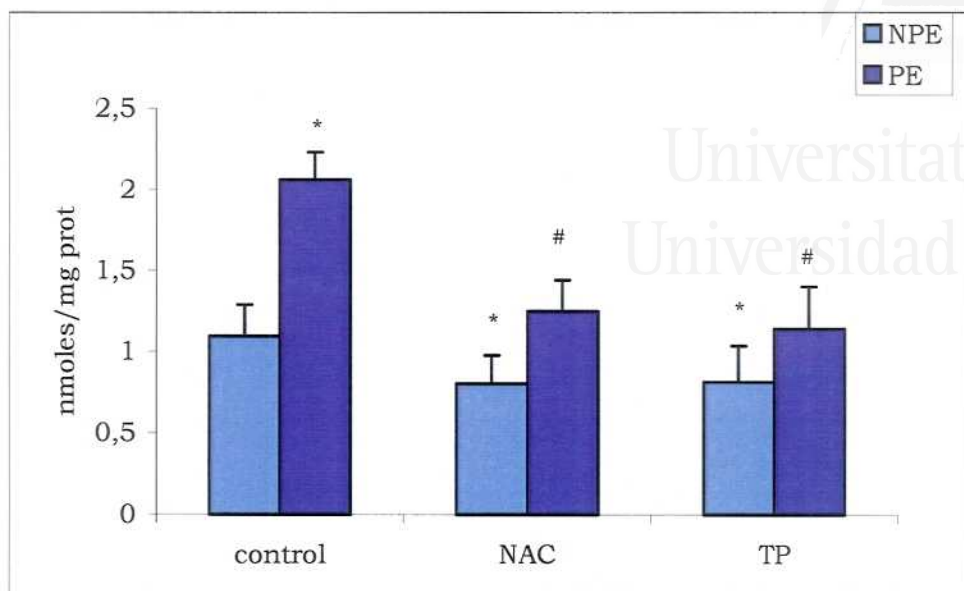
Resultados

Figura 52. EFECTO PROTECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA HEPÁTICA.

Niveles de MDA en hígado de ratones de 62 semanas. Prematuramente envejecidos (PE) y no prematuramente envejecidos (NPE), (*= $p < 0,05$ vs control NPE; # $p < 0,05$ vs control PE (n=6)).

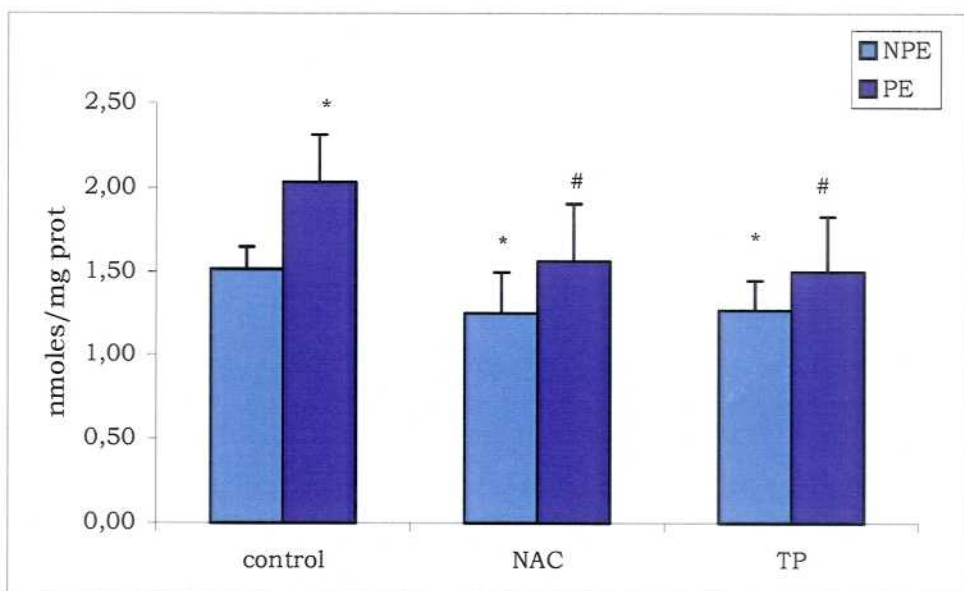


Figura 53. EFECTO PROTECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA RENAL.

Niveles de MDA en corteza renal de ratones de 62 semanas. Prematuramente envejecidos (PE) y no prematuramente envejecidos (NPE). (*= $p < 0,05$ vs control NPE; # $p < 0,05$ vs control PE. (n=6)).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DISCUSIÓN



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Modelo de envejecimiento celular *in vitro*

Los resultados obtenidos en los modelos *in vitro* descritos en esta memoria pueden interesar a oftalmólogos y gerontólogos, ya que desde el punto de vista de la patología celular estos modelos ayudan a entender los mecanismos específicos implicados en la senescencia de las células del EPR y de otras células del SNC y especialmente el papel del estrés oxidativo en el proceso de la muerte celular ligada al envejecimiento (Harman, 1956; Miquel, 1991; Cohen et al., 1994).

Efecto de la exposición de células de EPRb al peroxinitrito.

Nuestros resultados sugieren que el daño oxidativo inducido por el peroxinitrito en las células del EPRb mantenidas en cultivo es semejante a las alteraciones que tienen lugar durante el envejecimiento normal, *in vivo*, de las neuronas del encéfalo y otros tipos de células diferenciadas (Miquel, 1998). Así, el tratamiento con peroxinitrito causa una disminución de la viabilidad celular. Además, el peroxinitrito produce una depleción energética de estas células, como demuestra la reducción significativa del contenido intracelular de ATP (como ocurre al envejecer) y, por otra parte, el daño celular se manifiesta en forma de apoptosis cuando se exponen las células a las concentraciones más bajas de peroxinitrito usadas en este trabajo, mientras que hay una inducción más intensa de necrosis celular a las concentraciones más altas.

Nuestros resultados apoyan el concepto de que el enzima PARP puede tener un efecto importante tanto en el proceso de apoptosis como en el de necrosis. Como se demuestra por la disminución de NAD, sustrato específico del enzima PARP (Szabo et al., 1996; Messmer et al., 1996). Así el presente estudio corrobora la hipótesis de que el peroxinitrito es citotóxico frente a las células del EPRb, provocando una activación del PARP que priva completamente a la célula de su contenido de ATP y termina induciendo la necrosis celular.

Discusión

Reacciones patológicas al estrés oxidativo, semejantes a las que causa el peroxinitrito, probablemente contribuyen a la ruptura de la barrera hemato-retiniana en las enfermedades inflamatorias y degenerativas de la retina. En enfermedades inflamatorias intraoculares (como las uveítis) la infiltración de células inflamatorias desde los vasos coroideos puede ser la fuente de ERO de acción análoga a la del peroxinitrito, pero también se ha observado que las células residentes de los tejidos intraoculares, como las del epitelio pigmentario de la retina o las células gliales de Müller, pueden ser una fuente importante de radicales libres de oxígeno (Goureau et al., 1994a, 1994b; De Kozak et al., 1997). Así, en las enfermedades degenerativas de la retina, como la DMAE, la formación de radicales libres y el daño oxidativo de las células del EPR podrían estar implicadas (Snodderly, 1995; Delcourt et al., 1999).

En resumen, en lo que respecta a la patología ocular, las ERO de acción lesiva semejante a la del peroxinitrito estarían especialmente implicadas en los procesos inflamatorios y degenerativos del ojo, como la uveítis, la retinopatía diabética y la DMAE (Rao, 1990; Goureau et al., 1995; Beatty et al., 2000). De acuerdo con este concepto, se ha observado peroxidación lipídica *in vivo* inducida por ERO en enfermedades retinianas degenerativas (Anderson et al., 1984) y en el daño fotooxidativo de la retina (Kagan et al., 1973).

De acuerdo con nuestros presentes resultados, el estrés oxidativo podría tener un papel fundamental en los mecanismos que desencadenan la muerte de las células del EPR, un tema al que hasta ahora se ha prestado poca atención. En condiciones fisiológicas no parece disminuir apreciablemente el número de células del EPR *in vivo*. Sin embargo, la muerte celular sí que podría ocurrir en condiciones patológicas en las que hay un aumento en la producción de radicales libres y/o un descenso de las defensas antioxidantes. Este concepto está de acuerdo con estudios epidemiológicos sobre la dieta y otros factores de riesgo tanto ambientales como de estilo de vida que sugieren que el estrés oxidativo contribuye, a la DMAE, cuya lesión inicial se localiza en el EPR (Cai et al., 2000).

Depleción de ATP en células expuestas a hipoxia química, glucopenia, isquemia o hipoxia ambiental.

Generalmente se acepta que la hipoxia inhibe la producción de radicales libres, sin embargo, según Smith (1986) los radicales libres de oxígeno pueden desencadenar reacciones patológicas en el encéfalo tras breves episodios de anoxia o isquemia. Esto se debe a que el repentino descenso de la tensión de O₂ que acompaña a la isquemia permite que se produzcan reacciones de radicales libres que alteran las membranas mitocondriales, provocando cambios que alteran su fluidez, con la resultante pérdida de rendimiento bioenergético y función celular. Según Smith (1986), concentraciones de O₂ tan bajas como 10-100 p.p.m., como se encuentran en graves episodios de isquemia, bastan para iniciar cadenas de desorganización peroxidativa ligadas a las ERO. Por ello, en nuestra opinión, tanto los modelos *in vitro* de estrés oxidativo, como los modelos de *hipoxia* e *isquemia química* causadas por bloqueo de los mecanismos de la cadena respiratoria mitocondrial y de la fosforilación oxidativa pueden contribuir a la elucidación de la patología del proceso de envejecimiento celular y de muchas enfermedades degenerativas asociadas a dicho proceso. De acuerdo con lo anterior, los presentes experimentos en nuestros modelos de *hipoxia química*, *glucopenia*, *isquemia* e *hipoxia ambiental* revelan un daño bioquímico expresado por un descenso en los niveles de ATP en las células del EPRb. La depleción de ATP (que está directamente relacionada con un incremento en la liberación al medio de cultivo de LDH) tiene lugar en las células que han sido expuestas a cianuro y oligomicina, que inducen una *hipoxia química* ya que el cianuro (CN) inhibe el enzima mitocondrial citocromo oxidasa y la oligomicina (OL) actúa bloqueando el enzima ATP sintetasa, al igual que ocurre en condiciones de hipoxia ambiental. Los niveles de ATP descendieron aún más cuando las células del EPRb fueron expuestas a las condiciones de *glucopenia* inducidas por el IAA y con la consiguiente *isquemia química*, lo que sugiere que la glucólisis no puede ser estimulada para suplir el descenso de ATP (Palmero et al., 2000; 2001; Castillo et al., 2002).

Discusión

Estas observaciones concuerdan con estudios de otros laboratorios que demuestran que la exposición de células del EPRb a estrés oxidativo, *hipoxia* e *isquemia química* induce cambios en el metabolismo celular, debido a una alteración de la cadena de transporte mitocondrial, como se observa al envejecer (Miquel, 1998; 2002), o de la glucólisis (Rego et al., 1995, 1996, 1997). Sin embargo, según las observaciones de Rego et al. (1995), los niveles de ATP no sufren cambios significativos en las células de la retina completa, lo que sugiere que se produce una estimulación de la glucólisis para mantener los niveles normales de ATP. La diferencia entre nuestros resultados y los de Rego et al. (1995) se debe probablemente a que nosotros separamos el EPRb de la retina neural, y las células de EPRb no pueden acumular glucógeno debido a que la glucosa no es convertida en glucógeno en este tipo celular (Basinger et al., 1983).

La condición de *glucopenia* no aumenta la liberación al medio de LDH, de acuerdo con el concepto de que las células del EPRb podrían utilizar piruvato y lactato para la producción de ATP sin implicar la vía de la glucólisis. Cuando se añade al medio IAA y la concentración de lactato es alta, no se produce un descenso significativo en los niveles de ATP en las células de retina, según demostraron los estudios de Winkler (1981, 1983).

Efectos beneficiosos de los antioxidantes sobre la concentración de ATP

El uso de suplementos antioxidantes para prevenir o frenar algunas degeneraciones retinianas asociadas a la edad encuentra justificación en el siguiente comentario de Winkler (1999): “El complejo fotorreceptores/EPR está expuesto a la luz solar, se encuentra rodeado por niveles de O₂ que llegan de las arterias y las membranas de este complejo contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados”. En efecto, todos ellos son factores de riesgo que vuelven a la retina muy vulnerable al daño oxidativo. De acuerdo con estos conceptos, la suplementación del medio de cultivo con antioxidantes está de acuerdo con la siguiente opinión: “Probablemente los

sistemas de defensa antioxidante en la retina son imperfectos, permitiendo reacciones de autooxidación que ocurren a baja velocidad a lo largo de la vida” (Katz y Robinson, 1986).

En el presente estudio se ha escogido la vitamina C como tratamiento antioxidante debido a que el ascorbato es capaz de detener eficazmente las reacciones de peroxidación lipídica que se producen en cadena, a causa de los radicales libres, por la transferencia de un electrón (Katz y Robinson, 1986).

Por otra parte se han escogido los antioxidantes tiólicos NAC y TP por el papel fundamental de los grupos tiólicos reducidos para proteger contra la peroxidación lipídica y las mutaciones u otros cambios del ADN mitocondrial (Miquel y Fleming, 1986; Miquel, 1991, 1998). Estudios anteriores muestran que tanto NAC como TP retrasan los cambios causados por el envejecimiento a nivel mitocondrial y celular (Miquel et al., 1995). También es relevante en relación con el presente estudio que los efectos protectores de los tratamientos con antioxidantes han sido demostrados en las células del sistema inmunológico. En efecto, las investigaciones del grupo de De la Fuente han mostrado una preservación de las funciones de las células de este sistema en experimentos en que se administró NAC y/o TP *in vitro* o *in vivo* (Del Río et al., 1998; De la Fuente et al., 1998a; Correa et al., 1999; Puerto et al., 2002). En base a sus resultados, De la Fuente (2002) concluye que: “...puesto que el sistema inmunológico es un indicador de salud y un predictor de longevidad, la protección de este sistema proporcionada por los antioxidantes puede jugar un papel importante para conseguir un envejecimiento con salud”.

Nuestra presente investigación sugiere que los antioxidantes también tienen un efecto beneficioso sobre el EPRb. Así, la suplementación del medio con vitamina C (VC) causó un aumento significativo en los niveles de ATP en células de EPRb expuestas a las condiciones de *hipoxia* e *isquemia química* así como en la hipoxia ambiental, pero no en condiciones de *glucopenia*. Estos resultados concuerdan con la función fisiológica del ácido ascórbico en el metabolismo de estas células (Delamere et al., 1993; Hou et al., 1998).

Discusión

Por otra parte, varios estudios realizados en ratas muestran que cuando se suplementa la dieta con ácido ascórbico aumenta la extensión del daño retiniano (Organisciak, 1990).

Cuando el medio de cultivo de EPRb se suplementó con NAC, el efecto beneficioso sobre la concentración de ATP fue más pronunciado cuando las células fueron sometidas a condiciones de *glucopenia* e *hipoxia química*. Sin embargo, en condiciones de *isquemia* e hipoxia ambiental, el efecto de NAC sobre la concentración de ATP fue menor. El efecto beneficioso de NAC sobre estas células puede ser debido a que es un precursor del GSH, el cual potencia varios mecanismos de defensa frente a la peroxidación excesiva y además puede desempeñar una función clave en el mantenimiento de la integridad funcional de las mitocondrias frente al estrés oxidativo, con la consiguiente preservación de la síntesis de ATP.

La eficacia de TP sobre la concentración de ATP fue mayor en condiciones de hipoxia química y ambiental, ya que la concentración de ATP era similar a la observada en condiciones control. También tuvo efecto, aunque menor en condiciones de *glucopenia* e *isquemia*. El efecto beneficioso de TP sobre las células sometidas a estos estreses metabólicos se debe probablemente a que este compuesto es un precursor del glutatión, y tiene un papel esencial en la conservación de la integridad funcional de las mitocondrias (Haugaard et al., 1969; Scaduto, 1990).

Relación del estrés oxidativo y el envejecimiento con la muerte celular.

En la presente investigación se utilizaron diferentes técnicas para comprobar si con nuestros modelos de estrés oxidativo se podía causar apoptosis. Con la tinción de Hoechst, que demuestra la fragmentación del ADN nuclear y en condiciones de *hipoxia química*, *glucopenia* e *isquemia*, no se observó esta fragmentación. Esta aparente falta de efecto sobre el proceso apoptótico puede deberse a que, aunque se haya activado la señalización para que se desencadene el proceso de apoptosis, el tiempo que están las células sometidas al estrés oxidativo es demasiado corto (15 minutos) para que puedan aparecer los cambios morfológicos de la muerte apoptótica (Anderson et al., 1999). Mientras que durante una exposición a prolongada a hipoxia ambiental sí que se observó la muerte por apoptosis como revela la tinción de Hoechst.

Desde un punto de vista más general, relacionado con el envejecimiento, los modelos *in vitro* investigados en el presente estudio pueden tener interés biomédico con respecto al papel de las ERO en la patogenia del envejecimiento (Miquel, 1998; Palmero et al., 2000; Castillo et al., 2002). Así, estos modelos pueden ayudar a elucidar los mecanismos que relacionan a las ERO, y a los procesos de muerte celular (necrosis y apoptosis), con la senescencia de las células del EPR y de otros tipos celulares del SNC. Aunque la pérdida de neuronas y el incremento de la glia se han observado en varias regiones encefálicas en el envejecimiento fisiológico (Terry et al., 1987) y en el asociado con enfermedades neuro-degenerativas (Whitehouse et al., 1982), no se sabe cual es el principal mecanismo responsable de la muerte neuronal. Algunos autores proponen que la principal causa de pérdida neuronal es la necrosis unida a altos niveles de glutamato (Dessi et al., 1993), pero otros como Zhang et al. (1995), utilizando la técnica del TUNEL han observado células apoptóticas en la zona estriada de cerebros de ratas adultas. Además, estos autores sugieren que la muerte programada de las neuronas comienza en un estadio temprano de la vida adulta y se va incrementando con la edad.

Discusión

Aparentemente las células del EPR no muestran un marcado descenso en número durante la senescencia pero pueden sufrir apoptosis cuando el envejecimiento se encuentra acompañado por diferentes tipos de estrés metabólico como falta simultánea de O₂ y glucosa a causa de la isquemia (Wood et al., 1997) o hiperoxia (Cai et al., 2000).

De acuerdo con los datos anteriores, nuestros resultados sugieren que la incubación de las células de EPRb, en condiciones de hipoxia ambiental y en presencia de todos los nutrientes, desencadena el proceso apoptótico (Castillo et al., 2002), lo que apoya el concepto de que la muerte apoptótica puede ser un mecanismo de pérdida de células del EPR durante la fase inicial de la DMAE (Cai et al., 2000), y justifica la investigación de los tratamientos de suplementación antioxidante.

El efecto protector contra la muerte celular de los inhibidores de la PARP, también observado en el presente estudio, apoya la hipótesis de que la inducción de la PARP es un mecanismo implicado en el daño celular provocado por el estrés oxidativo. Así lo sugiere el hecho de que la inhibición de la PARP consigue mejorar los niveles intracelulares de ATP, y disminuye el número de células apoptóticas en comparación con el número de estas células en muestras tratadas con peroxinitrito sin el mencionado tratamiento inhibitor. La participación de la PARP en el daño celular provocado por el estrés oxidativo podría realizarse mediante una alteración de las mitocondrias que llevaría a la muerte celular (Bolaños et al., 1996; Virag et al., 1998).

Como ya hemos comentado, los trabajos anteriores sugieren que los antioxidantes tiólicos tienen un efecto beneficioso sobre el proceso de envejecimiento, probablemente a causa de su acción protectora sobre las membranas y el genoma mitocondrial frente a las ERO producidas en la cadena respiratoria (Miquel 2002). Además, se acepta que un descenso del rendimiento bioenergético (ligado a un daño mitocondrial) tiene un importante papel en el desencadenamiento de la apoptosis (Sastre et al., 2000a).

Por ello es razonable suponer que la suplementación de la dieta con antioxidantes tiólicos podría frenar tanto la desorganización mitocondrial (y disminución de la síntesis de ATP) como la muerte celular apoptótica que tiene lugar al envejecer.

En base a lo anterior, hemos investigado los efectos de NAC sobre la respuesta de las células del EPRb al oxidante peroxinitrito, cuya acción tóxica ya ha sido demostrada por Behar-Cohen et al. (1996). Según nuestros resultados, NAC protege a las células del EPRb frente al estrés oxidativo inducido por peroxinitrito así como la muerte celular programada inducida por éste.

Cuando las células se incubaron con los antioxidantes y se sometieron a hipoxia ambiental, los antioxidantes preservaron la muerte por apoptosis del mismo modo que mantuvieron los niveles de ATP y la viabilidad celular, de manera que TP fue el antioxidante más eficaz seguido de NAC y por último VC que fue el antioxidante que menos protegió.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. Modelo de envejecimiento in vivo

Longevidad, peso corporal y consumo de pienso en los ratones control y en los tratados con antioxidantes tiólicos

El objetivo principal de esta parte del estudio fue investigar si los antioxidantes tiólicos NAC y TP tienen algún efecto beneficioso sobre el envejecimiento de los ratones. Según nuestros resultados, los grupos de ratones cuyo pienso había sido suplementado con estos antioxidantes tenían un porcentaje de supervivencia a las 62 semanas mayor que el grupo control, siendo el antioxidante TP el más eficaz para prevenir contra la mortalidad a lo largo de todo el estudio. Por otra parte, la administración de NAC fue muy beneficiosa para la longevidad desde las 44 hasta las 58 semanas de edad, a juzgar por el 100 % de supervivencia de los animales que consumían este antioxidante. No obstante, desde las 58 semanas hasta la terminación del estudio, 62 semanas, tuvo lugar un marcado descenso en la supervivencia desde el 90 % hasta el 60 % de la población inicial, que es un porcentaje similar al de la supervivencia del grupo control. Estos resultados sugieren que el tratamiento prolongado con NAC podría tener un efecto negativo sobre el equilibrio homeostático estrés oxidativo/defensa antioxidante.

Otro parámetro de fácil determinación, que tiene importantes relaciones con los mecanismos del envejecimiento normal y patológico y la longevidad, es el peso corporal del animal. Si se comparan los pesos de nuestros ratones con la curva ponderal facilitada por el centro distribuidor de la cepa, se observa que el peso de los animales pertenecientes a los tres grupos (control, NAC y TP) se halla dentro del rango que se considera normal para esta cepa. Además, como en estudios anteriores (Economos y Miquel, 1980; De Juan, 1994), tuvo lugar un aumento progresivo del peso y de la desviación estándar, tanto en los animales que consumían el pienso estándar como en los que consumían pienso suplementado con NAC o TP.

Discusión

Las desviaciones estándar de las medias de los valores de los pesos de los dos grupos de ratones tratados con antioxidantes son menores que las del grupo control, y de entre los dos grupos que consumían antioxidantes, los valores de los ratones TP son los que muestran una menor desviación estándar. Esto sugiere que TP puede tener un efecto beneficioso sobre el metabolismo, lo que también concuerda con el aspecto de los ratones, pues los tratados con este antioxidante tienen un aspecto semejante a los ratones jóvenes más que los animales control, sobre todo en lo que respecta a la apariencia de su pelaje y ojos.

La hipótesis de que NAC y TP pueden proteger contra la pérdida de homeostasis ligada al envejecimiento también está de acuerdo con la presente observación de que, como en investigaciones anteriores (Economos y Miquel, 1980; De Juan, 1994), la curva de distribución de los pesos corporales de los ratones control se “aplana” con la edad, mientras que las curvas ponderales de los grupos que consumen los suplementos antioxidantes muestran un pico en el rango de pesos “óptimos” (36,0-40,9 g), predictores de longevidad, que se mantiene a lo largo de todo el período de estudio.

Resulta evidente, al comparar la Tabla 5 con la Figura 39, que el análisis de la distribución de los pesos corporales individuales suministra más información que el simple estudio de los efectos de la edad sobre el peso medio de los ratones. En efecto, dicho análisis detecta la aparición de subgrupos de ratones de peso no óptimo, es decir permite identificar los ratones que muestran una “edad biológica” mayor que su edad cronológica con respecto a la homeostasis ponderal (Collier y Coleman, 1991), con la consiguiente disminución de las probabilidades de alcanzar una edad avanzada. Según nuestra experiencia, la expresión de los datos en forma gráfica (como en la Figura 39) facilita la comparación retrospectiva de las diferencias del peso entre el subgrupo de animales que sobrepasan la edad de 62 semanas (ratones supervivientes; *S*) y los que mueren antes de esa edad (ratones no supervivientes, *NS*). Así se observa en esta figura que el pico en la curva de

distribución de los pesos de los *S* corresponde al valor de 33-34 g, mientras que casi coinciden la curva de distribución de los pesos de los ratones *NS* (determinados a la edad de 32-38 semanas) y la curva de los pesos de los *S* (determinados a las 40-46 semanas). O sea que a la edad de 32-38 semanas los ratones *NS* mostraban en lo que respecta a su homeostasis ponderal una edad biológica aproximadamente 8 semanas mayor que los que tenían mayores expectativas de longevidad (*S*).

Los datos resumidos en la Tabla 7 y Figura 40 permiten concluir que los ratones que a la edad de 32-38 semanas tienen un peso óptimo o “juvenil”, comprendido entre los 30,0 y los 34,9 g tienen una probabilidad de alcanzar las 62 semanas de edad de aproximadamente un 70 %, mientras que la probabilidad de alcanzar esta edad es sólo de aproximadamente un 30 % para los ratones de peso superior a 34,9 g a las 32-38 semanas.

La utilidad del estudio del peso para aclarar los mecanismos de acción “anti-envejecimiento” de los antioxidantes ha sido confirmada por nuestra observación de que, como se muestra en la Tabla 8 y Figura 41, la administración de NAC y TP es especialmente eficaz para aumentar la supervivencia de los ratones de peso no óptimo, desde unos niveles de aproximadamente el 30 % para los control hasta el 60 % y 70 %, respectivamente, para los que consumen NAC o TP (los porcentajes correspondientes a los ratones de peso óptimo son de aproximadamente 70 % para los control, 70 % para los NAC y 85% para los TP). El hecho de que el efecto beneficioso de NAC y TP sobre la longevidad sea mas evidente en los ratones de peso mayor que 34,9 g puede deberse, por lo menos en parte, a que estos aportadores de grupos tiol reducidos protegen contra la disfunción del sistema inmunológico y consiguiente aumento de procesos neoplásicos (De la Fuente, 2002), que son probablemente más frecuentes en los animales que sufren la deficiente homeostasis responsable del excesivo peso corporal.

Discusión

Parámetros conductuales: pruebas de coordinación y vigor y de actividad exploratoria espontánea.

Con respecto a los efectos de la edad y del tratamiento antioxidante sobre los parámetros conductuales, se observa que el envejecimiento lleva a una pérdida progresiva de la capacidad de pasar con éxito la prueba de la cuerda tirante, mientras que los dos antioxidantes investigados difieren en su acción. Así, la suplementación de la dieta con NAC se acompaña de un efecto negativo sobre la coordinación neuromuscular. Por el contrario, en el grupo de ratones que consumieron TP, el porcentaje de ratones que resolvían el test con éxito al finalizar el estudio era mayor que en los animales control. Si los resultados se expresan como porcentaje de rendimiento preservado en relación con el rendimiento inicial (al que se asigna el valor de 100 %), se observa un marcado descenso del rendimiento de los ratones control y tratados con NAC, mientras que la pérdida de rendimiento es menos evidente en los animales que consumen TP.

En cuanto a la actividad exploratoria espontánea valorada mediante el método del laberinto en forma de T, el porcentaje de ratones que pasan la prueba con éxito en un tiempo ≤ 20 segundos (ratones rápidos) se mantiene relativamente constante en los grupos de ratones supervivientes del grupo control, e incluso los datos sugieren que el rendimiento podría mejorar desde las 32-38 hasta las 40-46 semanas de edad. No obstante, los cambios que tienen lugar en este parámetro durante el tratamiento, desde las 32-38 a las 56-62 semanas, no son estadísticamente significativos ni en el grupo control ni en los tratados con antioxidantes. Esta aparente preservación del rendimiento, que normalmente disminuye al envejecer (De Juan, 1994), quizás se debe a que en el presente estudio la prueba del laberinto se realiza cada dos semanas (en lugar de cada mes, como en los experimentos de De Juan). Por ello los efectos positivos del entrenamiento podrían compensar los efectos negativos de la edad en cuanto a la actividad exploratoria espontánea.

Según de De Juan (1994), los ratones de 12 meses de edad que pasan con éxito la prueba de actividad exploratoria espontánea, alcanzando la intersección de los tres brazos del laberinto en un tiempo ≤ 20 segundos (ratones rápidos), tienen una mayor longevidad que los ratones que necesitan más tiempo para realizar la prueba (ratones lentos).

Con respecto a las causas de la mortalidad prematura de los ratones lentos, De la Fuente et al. (1998a) han demostrado que, en ratones OF1-Swiss viejos, los animales lentos tienen peores funciones inmunológicas (y por lo tanto menor protección contra infecciones y tumores) que los rápidos de la misma edad, otros estudios del grupo de De la Fuente han confirmado que los ratones lentos tienen una función fagocítica menos activa que los rápidos "...de acuerdo con la estrecha relación entre el sistema inmunológico y el sistema nervioso" (Correa et al., 1999), y que a la misma edad cronológica, y con respecto a numerosos parámetros de inmunocompetencia, "los ratones lentos son biológicamente más viejos que los rápidos" (Guayerbas et al., 2002a). Este modelo de envejecimiento prematuro en ratón (expresado en déficits conductuales en las pruebas del laberinto y la cuerda tirante y en disfunción inmunológica) no sólo se ha identificado en la cepa OF-1 Swiss pues, según Correa et al. (1999), también se puede detectar en machos y hembras de la cepa BALB/c.

Según Gilad y Gilad (1995), la menor longevidad de los ratones que muestran una deficiente conducta exploratoria (e incluso la denominada *freezing behavior*), está ligada a una disfunción en las áreas del SNC que determinan la respuesta a factores estresantes. Como una reacción inadecuada a estos factores es una de las características esenciales del envejecimiento, efectivamente se puede considerar a los ratones que no pasan la prueba del laberinto en un tiempo ≤ 20 segundos como prematuramente envejecidos en lo que respecta a ciertas funciones de su SNC en comparación con los animales que pasan la prueba con éxito (ratones rápidos).

Discusión

Nuestros datos confirman que el porcentaje de ratones rápidos tiene una relación positiva con las expectativas de supervivencia de los animales control, pero, como en el estudio de De Juan (1994), la mayor expectativa de longevidad de los animales tratados con NAC no se refleja en una mayor rapidez de estos ratones en la prueba del laberinto en comparación con los animales control que reciben pienso no suplementado con antioxidante.

Parámetros bioquímicos

El envejecimiento lleva a un deterioro de las células somáticas y a una involución progresiva de las funciones fisiológicas, probablemente ligados a una alteración en la función de las mitocondrias. La denominada “teoría mitocondrial” del envejecimiento está acreditada por numerosos trabajos (Miquel, 1996; 1998), donde se demuestra que el proceso de envejecimiento está asociado a un acumulo de daño en la mitocondria como consecuencia del estrés oxidativo. En este sentido, en el presente trabajo se han determinado varios parámetros bioquímicos indicadores del estado funcional de las mitocondrias de hígado y de riñón de ratones control y tratados con NAC o TP.

Se acepta que la respiración mitocondrial está estrechamente acoplada a la fosforilación oxidativa en células intactas mantenidas en condiciones fisiológicas (Ozawa et al., 1987), y que el rango de valores que define la integridad funcional óptima de las mitocondrias oscila entre $3 < ICR < 15$, como demuestran trabajos realizados con mitocondrias de hígado y riñón (Tager et al., 1983; Hirsch et al., 1989).

Por otro lado, se han observado disminuciones con la edad en la eficacia de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de procedencia sinaptosomal (Curti et al., 1990; Benzi et al., 1992; Bowling et al., 1993); de encéfalo entero, no sinaptosomal y corazón (Guerrieri et al., 1992; Takasawa et al., 1993); músculo (Trounce et al., 1989; Cooper et al., 1992; Muller-Hocker, 1992; Byrne y Dennett, 1992) e hígado (Trounce et al., 1989; Yen et al., 1989), tanto de animales como de humanos.

Con relación a los resultados obtenidos en este estudio se pudo comprobar que la integridad funcional de mitocondrias hepáticas y renales, procedentes de animales jóvenes (16 semanas de edad), se mantuvo intacta, antes de comenzar la dieta suplementada con antioxidantes, pues los valores obtenidos de ICR se mantienen dentro de este rango, con valores de ICR 4,16 (mitocondrias hepáticas) y 5,36 (mitocondrias renales).

Al comparar el ICR de las mitocondrias hepáticas del grupo control, sin suplemento antioxidante en la dieta, se observó una disminución de este índice con la edad, obteniendo un valor de ICR en animales de 48 semanas de edad de 2,16. Dicho valor es inferior al valor mínimo que define la integridad funcional de las mitocondrias, sugiriendo que la membrana de mitocondrias hepáticas sufre cambios durante el envejecimiento. Estos resultados están en concordancia con estudios realizados en mitocondrias hepáticas de ratones de la cepa C57BL/6J que demuestran también que con la edad disminuye el ICR además de alterar la permeabilidad de las membranas mitocondriales de hígado (Godell y Cortopassi, 1998).

Sin embargo las mitocondrias renales no parecen sufrir ningún proceso degenerativo con la edad, manteniéndose el valor de ICR siempre en el rango de valores que definen la integridad funcional de las mitocondrias. Estos resultados se ajustan a la hipótesis planteada por Kwong y Sohal (2000), quienes defienden en sus estudios que la degeneración de la integridad mitocondrial con la edad puede deberse a diferencias específicas para cada tejido y/o al grado diferencial de envejecimiento en cada uno de ellos.

Puesto que se ha sugerido que la inactivación oxidativa de enzimas clave en el metabolismo puede jugar un papel importante en el envejecimiento celular, hemos investigado los efectos de dos compuestos tiólicos sobre enzimas de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado y de riñón de ratones hembra OF1, que fueron alimentados con pienso suplementado con TP y NAC durante 2 y 5 meses.

Discusión

En los ratones que consumieron antioxidantes durante dos meses, el estudio de sus mitocondrias hepáticas mostró que la administración de NAC en el pienso ejercía una ligera acción protectora frente a los efectos del envejecimiento sobre el ICR tras 2 meses de tratamiento pero no durante 5 meses. Este hecho podría explicarse por un posible efecto tóxico de NAC sobre la homeostasis del animal como así demuestra el incremento de mortalidad en ratones tratados con durante más de 3 meses. Tal vez este efecto sea debido a que a esa edad las mitocondrias de células hepáticas sean todavía capaces de adaptarse a un estímulo tóxico y mantener el cociente respiratorio aunque, basándonos en los recientes hallazgos sobre el doble efecto anti- y pro-oxidante de NAC (Sagrasta et al., 2002), los enzimas pudieran estar dañados por la acción de NAC.

Por otro lado, para poder observar un efecto protector del TP fueron necesarios 5 meses de tratamiento, tras los cuales, el ICR de las mitocondrias hepáticas de ratones viejos fue similar al de mitocondrias de ratones control de 16 semanas de edad. Estos datos están de acuerdo con estudios realizados sobre el sistema inmunológico, en los que el tratamiento con TP es más efectivo cuando los animales poseen déficits funcionales en su sistema, (animales envejecidos) que en animales con un sistema inmunocompetente (animales de corta edad) (Correa et al., 1999).

De acuerdo con trabajos anteriores realizados con mitocondrias de diferentes órganos de diferentes especies o cepas (Vitorica et al., 1981; Yen et al., 1989; Rooyackers et al., 1996; Tian et al. 1998; Navarro et al. 2002), nuestros resultados también muestran un marcado descenso con la edad tanto en la actividad específica de citocromo *c* oxidasa (complejo IV) como en la actividad del enzima marcador de la matriz mitocondrial, citrato sintetasa, tanto en las mitocondrias de hígado como en las de riñón. Sin embargo, un estudio comparativo de la actividad de todos los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones entre mitocondrias de diferentes órganos de un mismo animal, demostró que los cambios con la edad en la actividad de

estos sistemas no siguen un “modelo común” en los diferentes tejidos estudiados y podría ser debido al hecho de que las mitocondrias en los distintos tejidos son estructural y funcionalmente diferentes (Kwong y Sohal, 2000). Estos autores observaron que en hígado y riñón, en concreto el complejo IV y la actividad de citrato sintetasa, no sufrían variaciones con la edad en su actividad en un periodo de tiempo semejante, comprendido entre las 14 y 56 semanas de edad. Estas discrepancias con nuestros resultados podrían basarse tanto en el método de aislamiento de mitocondrias así como en el método utilizado en la determinación de la actividad del complejo IV, en el cual las mitocondrias fueron sometidas a sonicación, mientras que en nuestro estudio se utilizaron intactas.

Con respecto a la actividad del complejo IV mitocondrial en ratones cuya dieta fue suplementada con antioxidantes, ni NAC ni TP mostraron un efecto protector en mitocondrias hepáticas. Sin embargo en mitocondrias renales, sólo la administración prolongada (5 meses) de TP fue eficaz, manteniendo la actividad específica de citocromo c oxidasa semejante a la obtenida en el grupo control de edad adulta. Sobre la actividad del enzima citrato sintetasa al igual que en citocromo c oxidasa, NAC no ejerció efecto protector ni en mitocondrias hepáticas ni en renales, mientras que TP fue efectiva en mitocondrias hepáticas tras 2 meses de tratamiento y en renales nuevamente fueron necesarios 5 meses de tratamiento para observar un incremento de la actividad enzimática.

NAC es un reconocido antioxidante, barredor de radicales libres y precursor del glutathion (Aruoma et al., 1989) y puede actuar por reacción directa de su grupo reductor tiol y los radicales libres de oxígeno, protegiendo frente al daño oxidativo *in vitro*, como han demostrado otros autores (Hoffer et al., 1993; Yan y Greene, 1998; Martinez et al., 1997; Banaclocha, 2001) y los estudios realizados en esta memoria en el modelo *in vitro* con células de EPR. Sin embargo, no aparecen referencias en la bibliografía consultada sobre los efectos de NAC o TP *in vivo* o sobre los complejos de la fosforilación oxidativa.

Discusión

Los únicos datos son los aportados por De Juan (1994) quien observa un efecto protector sobre los dos complejos enzimáticos. En este estudio observamos una falta de efecto de NAC sobre citocromo c oxidasa, citrato sintetasa y sobre el ICR en mitocondrias renales, y un ligero efecto protector de NAC solo en el ICR de las mitocondrias hepáticas tras 2 meses de tratamiento pero no tras 5 meses. Posiblemente, la diferencia en cuanto a la edad de comienzo del tratamiento, 8 semanas mas tarde, o tal vez la dosis utilizada (1‰ frente a 0,2‰ utilizada en este estudio) por De Juan podrían ser la causa de las diferencias observadas.

Para obtener más información sobre los efectos desorganizadores del estrés oxidativo, se determinó la concentración de peróxidos de lípido en homogenizados de hígado y de corteza renal, observándose un aumento significativo de dicha concentración en los controles viejos en comparación con los controles jóvenes. Por otra parte, una comparación de los niveles de MDA en homogenizados de ratones control de 24 ± 2 semanas de edad cronológica muestra que los órganos de los ratones prematuramente envejecidos (PE), según la prueba del laberinto, han sufrido una mayor peroxidación lipídica que los de los animales no prematuramente envejecidos (NPE). Los antioxidantes tiólicos, NAC y TP disminuyeron significativamente la peroxidación lipídica en homogenizados de hígado y corteza renal de ratones viejos.

En resumen nuestros resultados sugieren que la administración de TP puede proteger a las mitocondrias hepáticas y renales frente a la alteración peroxidativa de sus lípidos estructurales que ocurre al envejecer, contribuyendo así a preservar los complejos respiratorios y la síntesis de ATP que es la base de la función fisiológica de cada órgano y de la longevidad funcional. Más concretamente, conviene considerar que el estrés oxidativo puede alterar los lípidos de la membrana mitocondrial interna, con la consiguiente pérdida de función de los complejos respiratorios, sobre todo del I y IV, que son particularmente vulnerables al ataque de las especies reactivas de oxígeno (Zhang et al., 1990).

Asimismo, el complejo I (Fry y Green, 1981), el complejo IV (Wharton y Griffith, 1965; Fry y Green, 1980; Vik et al., 1981; Paradies et al., 1993) y el complejo V (Nohl y Kramer, 1980) pueden ser alterados por cambios en el entorno lipídico de la membrana interna mitocondrial durante el envejecimiento, especialmente por el descenso en los niveles de cardiolipina (Robinson, 1993).

Desde el punto de vista de los probables mecanismos del envejecimiento, nuestros datos apoyan el concepto de que, de acuerdo con la antes mencionada teoría mitocondrial, las lesiones oxidativas del mtADN y la resultante pérdida de capacidad bioenergética celular tienen un papel clave en el envejecimiento de dos órganos fundamentales para la homeostasis: el hígado y el riñón.

Implicaciones clínicas, desde el punto de vista de la geriatría preventiva, de los presentes estudios sobre los antioxidantes tiólicos.

Las ventajas de la suplementación de la dieta con compuestos que protegen a las mitocondrias contra el estrés oxidativo y la posible aplicación clínica de estos compuestos, que incluyen a los antioxidantes tiólicos, han sido objeto de una reciente revisión (Miquel, 2002). Según las publicaciones revisadas, las primeras investigaciones en animales tratados con antioxidantes ya demostraron que algunos de estos compuestos podían aumentar la longevidad media de ratones y ratas, y que entre los antioxidantes más eficaces para retrasar el envejecimiento se encontraban los antioxidantes tiólicos. Así, Miquel y Economos (1979) demostraron que la suplementación de la dieta con tioprolina sódica o magnésica no sólo aumentaba la longevidad de drosófilas y ratones sino que también frenaba su pérdida de capacidad reproductora y coordinación neuromuscular.

A pesar del tiempo transcurrido desde estos estudios en animales, aun no se han investigado los efectos de la ingesta de estos antioxidantes para detener el envejecimiento prematuro que sufren numerosos humanos ni para

Discusión

proteger contra los síndromes degenerativos ligados a la edad, en cuya patogénesis parece estar implicado el estrés oxidativo, como cataratas, DMAE, arteriosclerosis y disfunción inmunológica (Harman, 1986; Miquel, 1998).

Según Yu (1999), un problema relacionado con la administración de antioxidantes es la difícil interpretación de los resultados a causa de la homeostasis “estrés oxidativo/defensa antioxidante” de los organismos y el consecuente reajuste de los niveles de los diversos antioxidantes (fisiológicos y administrados en la dieta).

Por otra parte, Rottkamp et al. (2000) comentan que los antioxidantes generalmente utilizados no pueden causar aumentos consistentes en la longevidad máxima de las especies y que esta relativa ineficacia de los tratamientos antioxidantes probablemente se debe a que se dirigen a “dianas inadecuadas”.

Las opiniones antes resumidas justifican el presente estudio centrado en mejorar la protección antioxidante de la importante “diana” del ataque desorganizador de las ERO que son las mitocondrias.

La justificación principal del estudio de los efectos de NAC y TP sobre la longevidad y la salud en humanos se basa en la observación de que el envejecimiento se acompaña de una progresiva oxidación del glutatión y de otros compuestos tiólicos en los tejidos de los vertebrados e invertebrados (Miquel y Weber, 1990). Además, el uso de antioxidantes activos sobre las mitocondrias se justifica por el dato más reciente de que el aumento del cociente GSSG/GSH es mucho más marcado en las mitocondrias que en el compartimento extramitocondrial (Esteve et al., 1999; Sastre et al., 2000b). Por ello sería conveniente realizar ensayos clínicos de NAC y TP, puesto que elevan los niveles tisulares de los principales tioles fisiológicos como el glutatión y cisteína y por lo tanto aumentan la protección contra el estrés oxidativo que sufren las mitocondrias (Dansette et al., 1990).

También justifican una futura aplicación clínica de los antioxidantes tiólicos los estudios inmuno-gerontológicos de otros laboratorios (De la Fuente y Miquel, 1994).

De entre los numerosos trabajos del grupo de De la Fuente, tiene particular relevancia que el tratamiento de ratones OF1 con NAC, TP o mezclas de ambos, modula numerosas funciones del sistema inmunológico, con efectos beneficiosos sobre la inmunocompetencia. Es muy importante desde el punto de vista de una posible acción preventiva del envejecimiento patológico de los humanos, que en estudios utilizando el modelo de envejecimiento prematuro del ratón (ligado a sus altos niveles de ansiedad, que impiden una rápida exploración del laberinto), la acción estimulante de la TP sobre la función fagocítica de los macrófagos y protectora de la normal homeostasis antioxidantes/estrés oxidativo (con disminución de los niveles de superóxido extracelular), fue mas evidente en los ratones prematuramente envejecidos que en los que mostraban un envejecimiento normal (Correa et al., 1999).

También tiene gran interés gerontológico la observación de que la cantidad de NAC y TP necesaria para aumentar la fagocitosis, la actividad de las células *natural killer* y especialmente la respuesta proliferativa al mitógeno Concanavalina A (una función que disminuye mucho con la edad) es mayor en los ratones viejos que en los adultos (De la Fuente, 2002), lo que apoya el concepto de que la homeostasis se deteriora al envejecer. Esta observación está de acuerdo con nuestros resultados sobre las alteraciones del peso corporal en los ratones que envejecen, y el mayor beneficio que obtienen del tratamiento con los antioxidantes tiólicos los ratones de peso excesivo (y menos eficaz homeostasis ponderal) en comparación con los animales de peso normal.

En resumen, nuestros datos sugieren que la acción antioxidante de TP puede proteger las mitocondrias de hígado y riñón de los ratones, frenando el envejecimiento y consiguiente pérdida de homeostasis y función (incluyendo la función excretora y detoxificadora) de estos dos órganos. Además, los resultados del grupo de De la Fuente muestran que NAC y TP tienen un marcado efecto normalizador de la función inmunológica, sobre todo en los animales de homeostasis deficiente debido a su envejecimiento.

Discusión

Esta acción anti-envejecimiento de NAC y TP sobre el hígado, riñón y sistema inmunológico ya demostrada en el ratón de laboratorio, aconseja la realización de estudios clínicos. Su principal objetivo sería investigar si estos antioxidantes podrían, a través de su acción protectora sobre múltiples mecanismos homeostáticos que se alteran con la edad, contribuir a prevenir o frenar varias de las enfermedades degenerativas, de patogenia ligada al estrés oxidativo, que dificultan o impiden la consecución de una larga vida, con salud y satisfactorio rendimiento funcional



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONES



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Modelo de envejecimiento celular *in vitro*

1. Se observó un daño celular demostrado por la inhibición de la síntesis de ATP y el incremento de LDH en el medio celular al incubar las células con PN, con agentes químicos inductores de *hipoxia, glucopenia e* isquemia y durante una exposición prolongada a bajas concentraciones de oxígeno. Por lo tanto una disminución del ATP sugiere que estos modelos de estrés metabólico proporcionan un nuevo modelo de envejecimiento celular *in vitro* en células diferenciadas. Este modelo puede ser utilizado como complemento al modelo más ampliamente utilizado hasta ahora que son fibroblastos en cultivo primario.
2. El tratamiento con antioxidantes de las células del EPRb, protegió frente al daño celular inducido en las condiciones anteriores, siendo el más eficaz TP seguido de NAC y por último VC.
3. De las anteriores condiciones de inducción de daño por estrés oxidativo, sólo peroxinitrito y una exposición prolongada a bajas concentraciones de oxígeno provocaron la muerte por apoptosis en estas células.
4. La apoptosis fue evitada cuando las células se trataron previamente con TP, NAC o VC antes de ser expuestas a una hipoxia prolongada.

Conclusiones

Modelo de envejecimiento *in vivo*

1. La supervivencia fue mayor en los grupos suplementados con antioxidantes, obteniendo la mayor supervivencia en el grupo suplementado con TP.
2. Los animales tratados con antioxidantes mantenían su peso óptimo (36-40 g) a lo largo del estudio.
3. Los ratones no supervivientes, poseían una distribución de peso semejante a la obtenida en animales de mayor edad (48-54 semanas).
4. La suplementación de la dieta con TP mantuvo un mejor aspecto físico y de coordinación neuromuscular.
5. Se produjo un descenso del ICR mitocondrial tanto en hígado como en riñón dependiente de la edad.
6. La administración de TP en el pienso ejerció un efecto protector los sistemas enzimáticos estudiados en mitocondrias renales.
7. La administración de antioxidantes disminuyó la formación de peróxidos de lípidos tanto en mitocondrias hepáticas como renales.

El antioxidante tiólico TP es más efectivo en la prevención del daño celular tanto *in vitro* como *in vivo*.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

BIBLIOGRAFÍA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

- Adler, R., Curcio, C., Hicks, D., Price, D., Wong, F.** Cell death in age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 5:31-39. 1999.
- Aikens, J., Dix, T. A.** Peroxyl radical (HOO[•]) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, 266:15091-15098. 1991.
- Alder, R., Jerdan, J., Hewitt, A.T.** Responses of cultured neural retinal cells to substratum-bound laminin and other extracellular matrix molecules. *Dev. Biol.*, 112:100-114. 1985.
- Ames, A., Li, Y.Y., Heher, E.C., Kimble, C.R.** Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J. Neurosci.*, 12:840-853. 1992.
- Anderson, K.M., Seed, T., Ou, D., Harris, J.E.** Free radicals and reactive oxygen species in programmed cell death. *Med. Hypotheses*, 52:451-463. 1999.
- Anderson, R.E., Rapp, I.M., Wiegand, R.D.** Lipid peroxidation and retinal degeneration. *Curr. Eye. Res.*, 3:223-227. 1984.
- Armstrong, R. S., Sohal, R. G., Cutler, R. G., Slater, T. F.** Free Radicals Molecular. En *Biology, Aging and Disease*. Armstrong R. S., Sohal R. G., Cutler R. G. and Slater T. F (eds). Raven, New York. 1984.
- Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo, H.G., Kuzuya, T., Hori, M., et al.** Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 270:21035-21039. 1995.
- Auer, R.N.** Excitotoxic mechanisms, and age related susceptibility to brain damage in ischemia, hypoglycemia and toxic mussel poisoning. *Neurotoxicology*, 12:541-546. 1991.
- Auroma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J.** The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 6:593-597. 1989.
- Autexier, C., Greider, C.W.** Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem.*, 21:387-391. 1996.
- Baccanari, D.P.** Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Arch. Biochem. Biophys.*, 191:351-357. 1978.

Bibliografía

- Banaclocha, M.M.** Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Medical Hypotheses*, 56:472-477. 2001.
- Basinger, S.F., Hoffman, R.T.** Biochemistry of the pigment epithelium. En: *Biochemistry of the Eye*. Anderson R.E. (Ed.). American Academy of Ophthalmology Manuals Program, San Francisco, pgs. 256-264. 1983
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M.** Cytochrome P₄₅₀ and glutathione: What is the significance of their interrelationship in lipid peroxidation?. *Trends Biochem. Sci.*, 9:510-513. 1984.
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., Boulton, M.** The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.*, 45:115-134. 2000.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., et al.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:1620-1624. 1990.
- Behar-Cohen, F.F., Heydolph, S., Faure, V., et al.** Peroxynitrite cytotoxicity on bovine retinal pigmented epithelial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226:842-849. 1996.
- Bendich, A., Olson, J.A.** Biological actions of carotenoids. *FASEB J.*, 3:1927-1931. 1989.
- Bennett, S.A., Tenniswood, M., Chen, J.H., Davidson, C.M., et al.** Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport.*, 9:61-66. 1998.
- Benzi, G., Pastoris, O., Marzatico, F., Villa, R.F., Dagani, F., Curti D.** The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol. Aging*, 13:361-368. 1992.
- Bergmeyer, H.U., Brent, E.** En: *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer, H.U. (Eds), New York, Academic Press, pgs. 574-579. 1974.
- Berman, E.R.** Retina. En: *Biochemistry of the eye*. Perspectives in vision research, Plenum Press, pgs. 309-467. 1991.

- Bianchi, A., de Lange, T.** Ku binds telomeric DNA in vitro. *J. Biol. Chem.*, 274:21223-21227. 1999.
- Birnbom, H. C., Kanabus-Kaminska, M.** The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide may involve a metabolic process. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:6820-6824. 1985.
- Blackburn, E.H.** Structure and function of telomeres. *Nature*, 350:569-573. 1991.
- Blake, D. R., Rallen, R. E., Lunec J.** Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.*, 45:371-385. 1987.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, P., Samper, E., et al.** Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91:25-34. 1997.
- Boix, J., Llecha, N., Yuste, V.J., Comella, J.X.** Characterization of the cell death process induced by Staurosporine in Human Neuroblastoma Cell lines. *Neuropharmacology*, 36:811-821. 1997.
- Bok, D., Young, R.W.** Phagocytic properties of the retinal pigment epithelium. In: *The Retinal Pigment Epithelium*. Zinn, K.M., Marmor, M.F., (Eds), Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, pgs. 148-174. 1979.
- Bolaños, J.P., Heales, S.J.R., Peuchen, S., Barker, M., Land, J.M.** Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 21:995-1001. 1996.
- Bolaños, J.P., Peuchen, S., Heales, S.J.R., Land, J.M., Clark, J.B.** Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, 63:910-916. 1994.
- Boonman, Z., Isacson, O.** Apoptosis in neuronal development and transplantation: role of caspases and trophic factors. *Exp. Neurol.*, 156:1-15. 1999.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B.** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 128:617-630. 1972.

Bibliografía

- Bowling, A.C., Mutisya, E.M., Walker, L.C., Price, D.L., Cork, L.C., Beal, M.F.**. Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J. Neurochem.*, 60:1964-1967. 1993.
- Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A.**. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res.* 145:532-541. 1996.
- Buettner, G.R.**. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 300:535-543. 1993.
- Burton, G.W., Ingold, K.V.**. β -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224:569-573. 1984.
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.V.**. First proof that vitamin E is the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma. *Lancet*, 2:327-328. 1982.
- Byrne, E., Dennett, X.**. Respiratory chain failure in adult muscle fibres: relationship with ageing and possible implications for the neuronal pool. *Mutat. Res.*, 275:125-131. 1992.
- Cadenas, E.**. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 51:79-110. 1989.
- Cadet, J., Ravanat, J.L., Buchko, G.W., Yeo, H.C., Ames, B.N.**. Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods enzymol.*, 234:79-88. 1994.
- Cai, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, P., Jones, D.P.**. Oxidative damage and protection of the RPE. *Progr. Ret. Eye Res.*, 19:205-221. 2000.
- Campisi, J.**. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*, 14:183-188. 2000.
- Campisi, J.**. The biology of replicative senescence. *J. Cancer*, 33:703-709. 1997.
- Carlson, J.C., Riley, J.C.M.**. A consideration of some notable aging theories. *Exp. Gerontol.*, 33:127-134. 1998.

- Cassarino, D.S., Bennett, J.P. Jr.**. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.*, 29:1-25. 1999.
- Castillo, M., Bellot, J.L., García-Cabanes, C., Miquel, J., Orts, A., Palmero, M.**. Effects of hypoxia on retinal pigmented epithelium cells: Protection by antioxidants. *Ophthalmic Res.* En prensa.
- Cerutti, P. A.**. Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227:375-381. 1985.
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S., et al.**. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* , 11:77-85. 1999.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A.**. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59:527-605. 1979.
- Choe, M., Jackson, C., Yu, B. P.**. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radical Biol. Med.*, 18:977-984. 1995.
- Choi, J. H., Yu, B.**. PBrain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity. *Free Rad. Biol. Med.*, 18:133-139. 1995.
- Choisy-Rossi, C., Reisdorf, P., Yonish-Rouach, E.**. Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death. *Toxicol. Lett.*, 102:491-496. 1998.
- Clarke, P.G., Posada, A., Primi, M.P., Castagne, V.**. Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed. Pharmacother.*, 52:356-362. 1998.
- Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M., Moncada, S.** Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:7631-7636. 1998.
- Clutton, S.** The importance of oxidative stress in apoptosis. *British Medical Bulletin*, 53:662-668. 1997.

Bibliografía

- Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., et al.** Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J. Immunol.*, 153:507-516.1994.
- Cohen, G.M.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 326:1-16. 1997.
- Collier, T.J., Coleman, P.D.** Divergence of biological and chronological aging: evidence from rodent studies. *Neurobiol. Ageing*, 12:685-693. 1991.
- Colton, C.A., Pagan, F., Snell, J., Colton, J.S., et al.** Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons. *Exp. Neurol.*, 132:54-61. 1995.
- Cooper, J.M., Mann, V.M., Schapira, A.H.** Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J. Neurol. Sci.*, 113:91-98. 1992
- Correa, R., Blanco, B., Del Río, M., Víctor, V., Guayerbas, N., Medina, S., De la Fuente, M.** Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *BioFactors*, 10:195-200. 1999.
- Cotgreave, I.A., Moldeus, P., Orrenius, S.** Host biochemical defense mechanism against prooxidants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 28:189-212. 1988.
- Curti, D., Giangare, M.C., Redolfi, M.E., Fugaccia, I., Benzi, G.** Age-related modifications of cytochrome C oxidase activity in discrete brain regions. *Mech. Ageing Dev.*, 55:171-180. 1990.
- Dam, H., Granados, G.H.** Peroxidation of body fat in vitamin E deficiency. *Acta Physiol. Scand.*, 10:162-170. 1945
- Dansette, P.M., Sassi, A., Deschamps, C., et al.** Sulfur containing compounds as antioxidants. En: *Antioxidants therapy and preventive medicine*. Emerit, I., Packer, L., Auclair, C. (eds), Plenum Press. New York y London, pgs. 209-215. 1990.

- Davies, K. J. A., Wiese, A. G., Sevanian, A., Kim, E. H.** Repair systems in oxidative stress. En: *Molecular Biology of Aging*. Finch, C. E., Johnson, T. E. (eds), Wiley-Liss, New York. 1990.
- Davis, M., Whitely, T., Turnbull, D.M., Mendelow, A.D.** Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage. *Acta Neurochir. Suppl.*, 70:56-58. 1997.
- De Duve, Ch.** The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, 173:710-720.1969.
- De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Cesarone, C.F.** Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am. J. Med.* ,91:122S-130S. 1991.
- De Juan, E.J.** Marcadores de edad biológica en el envejecimiento del ratón: Aplicación farmacológica .Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. 1994.
- De Kozak, Y., Cotinet, A., Goureau, O., Hicks, D., Thillaye, B.** Tumor necrosis factor and nitric oxide production by resident retinal glial cells from rats presenting hereditary retinal degeneration. *Ocular Immunol. Inflamm.*, 5:85-94. 1997.
- De la Fuente, M., Ferrandez, M.D., Del Rio, M., et al.** Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech. Ageing Dev.*, 104:213-225. 1998a.
- De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Muñoz, F., De Juan, E., Miquel, J.** Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice. *Mech. Ageing Dev.*, 68:27-36. 1993.
- De la Fuente, M., Miñano, M., Victor, V.M., Del Río, M., Ferrández M.D., Díez, A., Miquel, J.** Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study. *Mech. Agein Dev.*, 102:263-277. 1998b.
- De la Fuente, M., Miquel, J.** Efecto protector de antioxidantes tiólicos en la inmunodepresión asociada al envejecimiento. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.*, 29: 246-251. 1994.

Bibliografía

- De la Fuente, M.**. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56:55-58. 2002.
- De Vries, N., De Flora, S.**. N-acetyl-l-cysteine. *J. Cell. Biochem.*, 17:270-277. 1993.
- Dean, P., Key, C.**. Spatial deficits on radial maze after large tectal lesions in rats: possible role of impaired scanning. *Behav. Neural. Biol.*, 32:170-190. 1981.
- Del Río, M., Ruedas, G., Medina, S., Víctor, V.M., De la Fuente, M.**. Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. *Life Science*, 63:871-881. 1998.
- Delamere, W.A., Coca-Prados, M., Aggarwall, S.**. Studies on regulation of the ascorbic acid transporter in a cell derived from rabbit non-pigmented ciliary epithelium. *Biochim. Biophys. Acta*, 1149:102-108. 1993.
- Delcourt, C., Cristol, J.P., Tessier, F., Leger, C.L., et al.**. Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. POLA Study Group. Pathologies Oculaires Liees a l'Age. *Arch. Ophthalmol.*, 117:1384-1390. 1999.
- Demple, B., Linn, S.**. 5,6-saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.*, 10:3781-3789. 1982.
- Demple, B.**. Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. *Mutat. Environ.*, A:155-167. 1990.
- Dessi, F., Charriaut-Maarlangué, C., Khrestchatisky, M., Ben-Ari, Y.**. Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J. Neurochem.*, 60:253. 1993.
- Dorey, C.K., Wu, G., Ebenstein, D., Garsd, A., Weiter, J.J.**. Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 30:1691-1699. 1989.
- Dubouloz, F., Dumas, J.**. Sur le métabolisme des peroxydes lipidiques dans le peau au cours des processus "inflammatoires". *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 36:983-987. 1954.

- Dubouloz, F., Dumas, J.** Sur le role des peroxides dans la genèse des lesions produit par les radiations. *J.Radiol. Electrol.*, 36:343-370. 1955.
- Duke, R.C.** Apoptosis in cytotoxic T lymphocytes and their targets. *Semin. Immunol.*, 4:407-412. 1992.
- Economos, A.C., Miquel, J.** Usefulness of stochastic analysis of body weight as a tool in experimental aging research. *Exp. Ageing Res.*, 6:417-430. 1980.
- Esteve, J., Mompó, J., García de la Asunción, J.** Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione in apoptosis studies *in vivo* and *in vitro*. *FASEB J.*, 13:1055-1064. 1999.
- Evans, N.M., y Bishop, K.S.** On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor esential for reproduction. *Science*, 56:650-658. 1922.
- Falt, I.** An introduction to the vegetative functions. The lens. En: *Physiology of the eye*. Falt, I., Weissman, B., (Eds), Butterwoth, Heinemann, U.S.A., pgs. 93-95. 1992.
- Ferrandiz, M.L., Martinez, M., De Juan, E., Diez, A., et al.** Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of aged mice. *Brain Res.*, 644:335-338. 1994.
- Ferrari, G., Yan, C.Y.I., Greene, L.A.** N-acetylcysteine (D-and-L-stereoisomers) prevent apoptotic death of neuronal cells. *J. Neurosci.*, 15:2857-2866. 1995.
- Finch, C.E.** Longevity, senescence and the genome. Chicago: University of Chicago Press. 1990.
- Fisher, D.B., Kaufman, S.** Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalysed by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 248:4300-4304. 1973.
- Fnan, S., Cohen, G.** The oxidant stress hypothesis in Parkinson´s disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.*, 32:804-881. 1992.
- Fraga, C.G., Leikovitz, B.E., Tappel, A.L.** Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic. Biol. Med.*, 4:155-161. 1988.

Bibliografía

- Freeman, B. A., Grapo, J. D.** Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47:412-426. 1982.
- Frei, B., England, L., Ames, B.N.** Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:6377-6381. 1989.
- Frei, B., Stocker, R., England, L., Ames, B.N.** Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 264:155-163. 1990.
- Fridovich, I.** Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 44:147-159. 1975.
- Fridovich, I.** Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23:239-257. 1983.
- Fry, M., Green, D.E.** Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.*, 256:1874-1880. 1981.
- Fry, M., Green, D.E.** Ion-transport chain of cytochrome oxidase: the two chain-direct coupling principle of energy coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:6391-6395. 1980.
- García de la Asunción, J., Millán, A, Pla, R., Bruseghini, L., et al.** Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.*, 20:333-338. 1996.
- Gebicki, S., Gebicki, J. M.** Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.*, 289:743-749. 1993.
- Gems, D.** Nematode aging: Putting metabolic theories to the test. *Curr. Biol.*, 9:614-616. 1999.
- Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O.** Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119:623. 1954.
- Gerschman, R.** Man's dependence on the earthly atmosphere. En: *Proc 1st symp submarine and space medicine*. Schaeffer, K.S. (Ed). MacMillan, New York, pgs. 475. 1962.
- Gilad, G.H., Gilad, V.H.** Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech. Ageing Dev.*, 78:75-83. 1995.

- Glavind, J., Hartmann, S., Clemmenses, J., Jensen K.E., Dam, H.** Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the arterioclerotic aorta. *Acta Pathol. Microb. Scand.*, 30:1-6. 1952.
- Godell, S., Cortopassi, G.** Analysis of oxygen consumption and mitochondrial permeability with age in mice. *Mech. Ageing Dev.*, 101:245-256. 1998.
- Goureau, O., Bellot, J., Thillaye, B., Courtois, Y., de Kozak, Y.** Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Immunol.*, 154:6518-6523. 1995.
- Goureau, O., Hicks, D., Courtois, Y., de Kozak, Y.** Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal Müller glial cells. *J. Neurochem.*, 63:310-317. 1994b.
- Goureau, O., Hicks, D., Courtois, Y.** Human retinal pigmented epithelial cells produce nitric oxide in response to cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 198:120-126. 1994a.
- Gow, A.J., Stamler, J.S.** Reaction between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*, 391:169-173. 1998.
- Goyns, M.H., y Lavery, W.L.** Telomerase and mammalian aging: a critical appraisal. *Mech. Ageing Dev.*, 114:69-77. 2000.
- Goytisolo, F., Samper, E., Edmonson, S., Taccioli, G.E., et al.** Absence of ADN-Pkcs in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Mol. Cell Biol.*, 21:3642-3651. 2001.
- Goytisolo, F., Samper, E., Martín-Caballero, J., Finnin, P., et al.** Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J. Exp. Med.*, 192:1625-1636. 2000.
- Gray, L.H., Scott, O.C.A.** Oxygen tension and the radiosensitivity of tumors. En: *Oxygen in the Animal Organism.* Dickens F y. Neil E. (Eds), Pergamon Press, New York, pgs. 537-541. 1964.

Bibliografía

- Greenwald, R. W., Moy, W. W.**. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.*, 23:455-463. 1980.
- Guayerbas, N., Catalán, M., Victor, V.M., Miquel, J., De la Fuente, M.**. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a model of premature immuno senescence. *Behav. Brain Res.*, 134:41-48. 2002a.
- Guayerbas, N., Puerto, M., Ferrandez, M.D., De La Fuente, M.**. A diet supplemented with thiolic anti-oxidants improves leucocyte function in two strains of prematurely ageing mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 29:1009-1014.2002b
- Guerrieri, F., Capozza, G., Kalous, M., Papa, S.**. Age-related changes of mitochondrial FOF1 ATP synthase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 671:395-402. 1992.
- Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B.**. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 15:129-135. 1990.
- Gutteridge, J.M.C.**. Antioxidant properties of the protein caeruloplasmin, albumin and transferrin: A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim. Biophys. Acta*, 869:119-127. 1986.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E.**. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.*, 119: 598-620. 1992.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.**. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free radicals in biology and medicine*. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (eds), Oxford Clarendon Press, pgs. 188-276. 1989.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.**. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.*, 6:22-26. 1985.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.**. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219:1-14. 1984.
- Halliwell, B.**. Drug antioxidants effects. A basis for drug selection. *Drugs*, 42:569-605. 1991.
- Halliwell, B.**. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59:1609-1623. 1992

- Halliwell, B.** Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?. *Free Rad. Res.*, 25:439-454. 1996.
- Halliwell, B.** What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?. *FEBS Lett.*, 411:157-160. 1997
- Hande, M., Samper, E., Lansdorp, P., Blasco, M.A.** Telomere length dynamics in cultured cells from normal and telomerase null mice. *J. Cell. Biol.*, 144:589-601. 1999.
- Harman, D.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11:298-300. 1956.
- Harman, D.** Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution life, aging, and disease processes. En: *Free radicals, aging and degenerative diseases*. Walford, R.L., Johnson, J., Harman, D., Miquel, J. (Eds.) Alan R. Liss Inc. New York. pgs. 3-49. 1986.
- Harman, D.** Role of free radicals in aging and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 673:126-141. 1992.
- Harman, D.** The aging process. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 78:7124-7128. 1981.
- Harman, D.** The biological clock: The mitochondria. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 20:145-147. 1972.
- Harris, E.D.** Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.*, 6:2675-2683. 1992.
- Haugaard, N., Lee, N.H., Kostrzeva, R., Horn R.S., Haugaard E.S.** The role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 172:198-207. 1969.
- Hayflick, L.** The limited in vitro life span of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 37:614-636. 1965.
- Higuchi, Y., Linn, S.** Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells. *J. Biol. Chem.*, 270:7950-7956. 1995.
- Hirsch, J.D., Beyer, C.F., Malkowitz, L., Loullis, C.C., Blume, A.J.** Characterization of ligand binding to mitochondrial benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.* 35:164-172. 1989.

Bibliografía

- Hoffer, E., Avidor, I., Benjaminov, O., Shenker, L., Tabak, A., Tamir, A., Merzbach, D., Taitelman, U.** N-acetylcysteine delays the infiltration of inflammatory cells into the lungs of paraquat-intoxicated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 120:8-12. 1993.
- Hoffman, M. E., Mello Filho, A. C., Meneghini, R.** Correlation between cytotoxic effect of H₂O₂ and the yield of DNA strand break in cells of different species. *Biochim. Biophys. Acta*, 781:234-238. 1984.
- Holz, F.G., Schutt, F., Kopitz, J., Eldred, G.E., et al.** Inhibition of lysosomal degradative functions in RPE cells by a retinoid component of lipofuscin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40:737-743. 1999.
- Horton, A. A., Fairhurst, S.** Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 18:27-79. 1987.
- Horvitz, H.R.** Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59:1701s-1706s. 1999.
- Hou, Y., Pierce, W.M., Delamere, W.A.** The influence of ascorbic acid on active sodium transport in cultured rabbit non-pigmented ciliary epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39:143-150. 1998.
- Hsu, H.L., Gilley, D., Blackburn, E., Chen, D.J.** Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:12454-12458. 1999.
- Imlay, J. A., Linn, S.** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240:1302-1309. 1988.
- Ingram, D.K., y Jucker, M.** Developing mouse models of aging: a consideration of strain differences in age related behavioral and neural parameters. *Neurobiol Aging*, 20:37-145. 1999.
- Jacotot, E., Costantini, P., Laboureaux, E., et al.** Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 887:18-30. 1999.
- Jamieson, D.** Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Rad. Biol. Med.*, 7:87-108. 1989.
- Jazwinski, S.M.** The RAS genes: a homeostatic device in *Saccharomyces cerevisiae* longevity. *Neurobiol Aging*, 20:471-478. 1999.

- Johnson, T.E.**. Genetic influences on aging. *Exp. Gerontol.*, 32:11-22. 1997.
- Kagan, V., Shvedova, A., Novikov, K., Kozlov, Y.**. Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina. *Biochem. Biophys. Acta*, 330:76-79. 1973.
- Kappus, H., Sies, H.**. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37:1233-1237. 1981.
- Katz, M.L., Robinson, W.G.**. Nutritional influences on autoxidation, lipofuscin accumulation, and ageing. En: *Free radicals, ageing and degenerative diseases*. Johnson, J.E., Walford, R., Harman, D., Miquel, J. (Eds), Alan R. Liss, New York, pgs 221-259. 1986.
- Kennedy, C.J., Rakoczy, P.E., Robertson, T.A., Papadimitriou, J.M., Constable, I.J.**. Kinetic studies on phagocytosis and lysosomal digestion of rod outer segments by human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Exp. Cell Res.*, 210:209-214. 1994.
- Ketterer, B., Meyer, D.J.**. Glutathione transferases: A possible role in the detoxification and repair of DNA and lipid hydroperoxides. *Mutat. Res.*, 214:33-40. 1989.
- Ketterer, B.**. Detoxification reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* , 16:957-973. 1986.
- Kirkwood, T.B.**. Biological theories of aging: an overview. *Aging*, 2:144-146. 1998.
- Klein, M.L., Jorizzo, P.A., Watzke, R.C.**. Growth features of choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 96:1416-1419. 1989
- Kobayashi, H.**. The cell cycle and tumor suppressor genes. *Rinsho Byori*, 44:3-11. 1996.
- Kono, Y., Fridovich, I.**. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.*, 257:5751-5761. 1982.
- Kwong, L.K., Sohal, R.S.**. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. *Arch. Biochem. Biophys.*, 373:16-22. 2000.

Bibliografía

- Lipton, P., Kalil, R.** Neurotrophic factors: their role in the development, trauma and disease. *Neural. Notes*, 1:3-7. 1995.
- Lipton, S., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.V., et al.** A redox-based mechanism for then neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364:626-632. 1993.
- Liu, X., Zhu, X.Z.** Roles of p53, cMyc, Bcl2, Bax and caspases in serum deprivation-induced neuronal apoptosis: a possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor. *Neuroreport.*, 10:3087-3091. 1999.
- Longo, V.D.** Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol. Aging*, 20:479-486. 1999.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275. 1951.
- Luo, Q., Peyman, G.A., Conway, M., Woltering, E.A.** Effect of a somatostatin analog (octreotide acetate) on the growth of Retinal Pigment Epithelium cells in culture. *Curr. Eye. Res.*, 15:909-913. 1996.
- Ly, D.H., Lockhart, D.J., Lerner, R.A., Schultz, P.G.** Mitotic misregulation and human aging. *Science*, 287:2486-2492. 2000.
- Machlin, L.J., Bendich, A.** Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1:441-445. 1987.
- Malmström, B. G.** Enzymology of oxygen. *Annu. Rev. Biochem.*, 51:21-59. 1982.
- Marklund, S.L., Holme, E., Hellner, L.** Superoxide dismutasa in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acts*, 126:41-51. 1982.
- Marklund, S.L.** Extracellular superoxide dismutasa in human tissue and human cell lines. *J. Clin. Invest.*, 74:1398-1403. 1984.
- Marks, N., Berg, M.J.** Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem. Int.*, 35:195-220. 1999.
- Martinez, D.E.** Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Exp. Gerontol.*, 33:217-225. 1998.

- Martinez,M., Hernández, A.I., Martinez, N., Ferrándiz, M.L.** N-acetylcysteine protects against age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain Res.*, 762:256-258. 1997.
- Martinez-Cayuela, M.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77:147-161. 1995.
- Martinez-Cayuela, M.** Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica*, 39:5-18. 1998.
- Mason, R. P.** Free-radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. En: Pryor W. A. (ed) *Free Radicals in Biology*, (5). Academic Press, New York, pgs. 161-173. 1982.
- Matsunaga, H., Handa, J.T., Aotaki-Keen, A., et al.** β -galactosidase histochemistry and telomere loss in senescent retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40:197-202. 1999.
- May, J., Cobb, C.E., Mendiratta, S., Hill, K.E., Burk, R.F.** Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*, 273:23039-23045. 1998.
- Mayer, M., Noble, M.** N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:7496-7500. 1994.
- McAndrew, J., Patel, R.P., Jo, H., Cornwell, T., Lincoln, D., et al.** The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. *Semin. Perinatol.*, 21:351-366. 1997.
- McCord, J.M., Fridovich, I.** Superoxide and superoxide dismutases. En Michelson, A.M., McCord, J.M., Fridovich, I. (eds). Academic Press, New York. 1977.
- McCord, J.M., Fridovich, I.** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte peroxidase (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244:6049-6055. 1969.
- McCord, J.M.** Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185:529-531. 1974.
- Medvedev, Z.** An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol. Rev.*, 65:375-398. 1990.

Bibliografía

- Meikrantz, W., Schlegel, R.** Apoptosis and the cell cycle. *J. Cell. Biochem.*, 58:160-174. 1995.
- Merino, J.J., Cordero-Campana, M.I.** Molecular bases of the programmed cell death process: implications of tumor suppressor protein p53 and other proteins in the control of cell cycle. Mechanisms of apoptotic action. *Invest. Clin.*, 39:323-358. 1998.
- Messmer, U.K., Brüne, B.** Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD⁺ content, and p53 accumulation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327:1-10. 1996.
- Michelis, L.** Fundamental principles in oxido-reductions. *Biol. Bull.*, 92:2939-2947. 1949.
- Mills, L.R.** The sodium calcium exchanger and glutamate induced calcium loads in aged hippocampal neurons in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 15:379-390. 1996.
- Mills, R.G., Weiss, A.S.** Does progeria provide the best model of accelerated ageing in humans?. *Gerontology*, 36:84-98. 1990.
- Minot, C.S.** The problem of age, growth and age. *Pop. Sci. Monthly*, 71:509-527. 1907.
- Miquel, J., Blasco, M.** A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp. Gerontol.*, 13:389-396. 1978.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J.E.** Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.*, 15:579-591. 1980.
- Miquel, J., Economos, A.C., Johnson, J.E.** A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging. En: *Aging and cellular function*. Johnson, J.E., Jr. (Ed), Plenum Press, New York, pgs. 247-280. 1984.
- Miquel, J., Economos, A.C.** Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila sp.* and mice. *Exp. Gerontol.*, 14:279-285. 1979.
- Miquel, J., Ferrandiz, M.L., De Juan, E., Sevilla, I., Martinez, M.** N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. *Eur. J. Pharmacol.*, 292:333-335. 1995.

- Miquel, J., Fleming, J.E.** Theoretical and experimental support for an “oxygen radical-mitochondrial injury” hypothesis of cell aging. En: *Free radicals, aging and degenerative diseases*. Johnson, J.E., Walford, R., Harman, D., Miquel, J. (Eds), Alan R. Liss, New York, pgs 51-74. 1986.
- Miquel, J., Weber, J.** Aging and increased oxidation of the sulfur pool. En: *Glutathione Metabolism and Physiological Functions*. Viña J. (Ed.),. CRC Press, Boca Raton, Florida, pgs. 187-192. 1990
- Miquel, J.** An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 12:99-117. 1991.
- Miquel, J.** An update on the mitochondrial-ADN mutation hipótesis of cell aging. *Mutation Res.*, 275:209-216. 1992.
- Miquel, J.** An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp. Gerontol.*,33:113-126. 1998.
- Miquel, J.** Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage?. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959:508-516. 2002.
- Miquel, J.** Determination of biological age in antioxidant treated *Drosophila* and mice. En:*Intervention in the Aging Process*, Part B: Basic Research and Preclinical Screening (Regelson, Ed.), Alan R. Liss, New York, pgs.317-358. 1983.
- Miquel, J.** Envejecimiento celular y molecular. En: *Manual de geriatría*. Salgado, A., Guillén, F., (eds), Salvat, Barcelona, pgs. 1-18. 1990.
- Miquel, J.** Envejecimiento fisiológico, celular y subcelular. En: *Bioquímica y biología molecular*. Leloir, S., Ochoa, S., Oro, J., Sols, A. (Eds), Salvat, barcelona, pgs. 241-248. 1986.
- Miquel, J.** Nutrition and ageing. *Public Health Nutrition*, 4:1385-1388. 2001.
- Miquel, J.** Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. En: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. Miquel, J., Quintanilha, A., Weber, H. (Eds), Boca Raton Florida: CRC Pres, pgs. 3-13. 1989.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43:109-142. 1991.

Bibliografía

- Morel, F., Mazet, F., Touraille, S., Alziari, S.** Changes in the respiratory chain complexes activities and in the mitochondrial DNA content during ageing in *D. subobscura*. *Mech. Ageing Dev.*, 84:171-181. 1995.
- Müller, H.J.** The remaking of chromosomes. *Collect. Net. Woods Hole*, 13:181-198. 1938.
- Muller-Hocker, J.** Mitochondria and ageing. *Brain Pathol.*, 2:149-158. 1992.
- Mulliken, R.S.** Interpretation of the atmospheric absorption bands of oxygen. *Physiol. Rev.*, 32:880-887. 1929.
- Mund, M.L., Rodrigues, M.M.** Embryology of the human retinal pigment epithelium. In: *The Retinal Pigment Epithelium*. Zinn, K.M., Marmor, M.F., (Eds), Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, pgs. 45-52. 1979.
- Murphy, M.E., Sies, H.** Reversible conversión of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:10860-10864. 1991.
- Nagata, S.** Fas ligan-dinduced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.*, 33:29-55. 1999.
- Nagy, Z.S., Esiri, M.M.** Apoptosis-related protein expression in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 18:565-571. 1997.
- Naqui, A., Chance, B., Cadenas, E.** Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 55:137-166. 1986.
- Navarro, A., Sánchez del Pino, M.J., Gomez, C., Peralta, J.L., Boveris, A.** Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282:R985-R992. 2002.
- Nielsen, H.** Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein. III. Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids*, 16:215-222. 1981.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., Sato, E.** Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:2015-2055. 1991.
- Nohl, H., Hegner, D.** Do mitochondria produce oxygen free radicals in vivo?. *Eur. J. Biochem.*, 82:563-567. 1978.
- Nohl, H., Kramer, R.** Molecular basis of age-dependent changes in the activity of adenine nucleotide translocase. *Mech. Ageing Dev.*, 14:137-44. 1980.

- Olney, J.W.**. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J. Neural. Transm.*, 43:47-51. 1994.
- Organisciak, D.T., Jiang, Y.L., Wang, H.M., Bicknell, I.**. The protective effect of ascorbic acid in retinal light damage of rats exposed to intermittent light. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 31:1195-1202. 1990.
- Orgel, L.**. The maintenance of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 49:517-521. 1963.
- Osborne, N.N., Cazevieille, C., Pergande, G., Wood, J.P.**. Induction of apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells is counteracted by flupirtine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38:1390-1400. 1997.
- Ozawa, T., Tanaka, M., Suzuki, H., Nishikimi, M.**. Structure and function of mitochondria: their organization and disorders. *Brain Dev.*, 9:76-81.1987.
- Pallardó, E.V., Asensi, M., García de la Asunción, J., et al.**. Late onset administration of oral antioxidants prevents age-related loss of motor coordination and brain mitochondrial DNA damage. *Free Radic. Res.*, 29:617-623. 1998.
- Palmer, R.M.J., Rees, D.D., Ashton, D.S., Moncada, S.**. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,153:1251-1256. 1988.
- Palmero, M., Bellot, J.L., Castillo, M., García-Cabanes, C.,Miquel, J., Orts, A.**. An *in vitro* model of ischemic-like stress in retinal pigmented epithelium cells: Protective effects of antioxidants. *Mech. Aging Dev.*, 114:185-190. 2000.
- Palmero, M., Bellot, J.L., García-Cabanes, C., Orts. A.**. An in vitro model of oxidative stress and hypoxia in retinal pigmented epithelial cells". *J. Toxicol. Cut. & Ocular Toxicol.*, 20:29-38. 2001.
- Palmero, M.**. Caracterización funcional del receptor dihidropiridinico mitocondrial adrenomedular bovino. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Alicante. 1992.

Bibliografía

- Paradies, G., Ruggiero, F.M., Dinoi, P., Petrosillo, G., Quagliariello, E.** Decreased cytochrome oxidase activity and changes in phospholipids in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 307:91-95.1993.
- Paschen, W., Doutheil, J.** Disturbance of endoplasmic reticulum functions: a key mechanism underlying cell damage?. *Acta Neurochir. Suppl.*, 73:1-5. 1999.
- Pérez-Tur, J.** La genética y la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.*, 30:161-169. 2000.
- Porter, R.S.** Therapeutics bibliography for clinical pharmacists: respiratory disease. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 37:862-864. 1980.
- Proctor, P. H., Reynolds, E. S.** Free radicals and disease in man. *Physiol. Chem. Phys.*, 16:175-195. 1984.
- Pryor, W. ..** Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.*, 48:657-667. 1986.
- Pryor, W. A., Church, D. P.** Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radical as mediators of oxygen toxicity. *Free Rad. Biol. Chem.*, 11:41-46. 1991.
- Pryor, W.** Free radical biology, xenobiotics, cancer and aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 393:1-16. 1982.
- Pryor, W.** Free radicals in biology. In: *Free radicals in biology*. Vol 1 y 3. Academic press, New York. 1976.
- Pryor, W.A., Stone, K.** Oxidant in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 12-27. 1993.
- Puerto, M., Guayerbas, N., Víctor, V.M., De la Fuente, M.** Effect of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol. Biochem. Behavior* , 73:797-804. 2002.
- Ramachandra, S., Studzinski, G.P.** Morphological and biochemical criteria of apoptosis. In: *Cell Growth and Apoptosis. A practical approach*. Studzinski, G.P. (Eds), IRL Press, pgs. 119-142. 1995.
- Randerath, K., Reddy R., Danna, T. P., Watson, W. P., et al.** Formation of ribonucleotides in DNA modified by oxidative damage in vitro and in vivo. Characterization by ³²P postlabeling. *Mutat. Res.*,275:355-366. 1992.

- Rao, N.A.** Role of oxygen free radicals in retinal damage associated with experimental uveitis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 88:797-850. 1990.
- Rapp, L.M., Anderson, R.E.** Visual pigment dynamics and the vitamin A cycle. In: *Biochemistry of the Eye*, American Academy of Ophthalmology, pgs. 189-195. 1983.
- Ratan, R.R., Murphy, T.H., Baraban, J.M.** Macromolecular shynthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. *J. Neurosci.*, 17:4385-4392. 1994(a).
- Ratan, R.R., Murphy, T.H., Baraban, J.M.** Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.*, 62: 376-379. 1994(b).
- Reddel, R.R.** Genes involved in the control of cellular proliferative potential. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 854:8-19. 1998.
- Rego, A.C., Oliveira, C.R.** Dual effect of lipid peroxidation on the membrane order of retinal cells culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, 321:127-136. 1995.
- Rego, A.C., Santos, M.S., Oliveira, C.R.** Adenosine triphosphate degradation products after oxidative stress and metabolic dysfunction in cultured retinal cells. *J. Neurochem.*, 69:1228-1235. 1997.
- Rego, A.C., Santos, M.S., Oliveira, C.R.** Oxidative stress, hypoxia and ischemia-like conditions increse the release of endogenous aminoacids by distinct mechanisms in cultured retinal cells. *J. Neurochem.*, 66:2506-2516. 1996.
- Riceevans, C., Burdon, R.** Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.*, 37:37-110. 1993.
- Richter, C.** Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging?. *FEBS Lett.*, 241:1-5. 1988.
- Rickwood, D., Wilson, M.T., Darley-USmar, V.M.** Mitochondria: A practical approach. IRL Press, Oxford Washington, D.C. 1987.
- Robinson, N.C.** Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 25:153-163. 1993.

Bibliografía

- Rooyackers, O.E., Adey, D.B., Ades, P.A., Nair, K.S.** Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:15364-15369. 1996.
- Rose, M.R.** Can human aging be postponed? *Sci. Am.*, 281:106-111. 1999.
- Rose, M.R.** Evolutionary biology of aging. Oxford University Press. 1994.
- Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Hirai, K.** Will antioxidants fulfill their expectations for the treatment of Alzheimer disease?. *Mech. Ageing Dev.*, 116:169-179. 2000.
- Rubbo, H., Darley-Usmar, V.M., Freeman, B.A.** Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.*, 9:809-820. 1996.
- Rustin, P., von Kleist-Retzow, J., Vajo, Z., Rotig, A., Munnich, A.** For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging reality or mitochondria?. *Mech. Ageing Dev.*, 114:201-206. 2000.
- Sagrasta, M.L., Garcia, A.E., Africa de Madariaga, M., Mora, M.** Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radic. Res.*, 36:329-340. 2002.
- Samper, E., Goytisolo, F., Slijepcevic, P., van Jul, P., et al.** Mammalian Ku86 prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Reports*, 1:244-252. 2000.
- Saran, M., Bors, W.** Radical reactions in vivo. An overview. *Radiat. Environ. Biophys.*, 29:249-262. 1990.
- Sastre, J., Pallardó, F.V., García de la Asunción, J., Viña, J.** Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad. Res.*, 32:189-198. 2000a.
- Sastre, J., Pallardó, F.V., Viña, J.** Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 49:427-435. 2000b.
- Sastry, P.S., Rao, K.S.** Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.*, 74:1-20. 2000.
- Scaduto, R.S.** Glutathione in ischemia and reperfusion-induced tissue injury. En: *Glutathione metabolism and physiological functions*. Viña, J. (Ed), CRC Press, Boca Raton, Florida, pgs. 227-235. 1990.

- Schafer, K.A.**. The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.*, 35:461-478. 1998.
- Schaich, K. H.**. Metals and lipid oxidation. Cotemporary issues. *Lipids*, 27:209-218. 1992.
- Schoneich, C.**. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Exp. Gerontol.*, 34:19-34. 1999.
- Sevanian, A., Stein, R. A., Mead, J. F.**. Metabolism of epoxidized phosphatidylcholine by phospholipase A2 and epoxide hydrolase. *Lipids*, 16:781-788. 1981.
- Shakib, M., Cunha-Vaz, J.G.**. Studies on the permeability of the blood-ocular barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. *Exp. Eye Res.*, 5:229-234. 1966.
- Sharpe, M.A., Cooper, C.E.**. Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitrosyl anion and peroxynitrite. *Biochem. J.*, 332:9-19. 1998.
- Sies, H.**. *Oxidative Stress*. Sies H.(ed) Academic Press, London. 1.985.
- Slater, T.F.S.**. Free radicals fact or fiction?. *Br. J. Cancer*, 55:5-10. 1987.
- Smith,W.L.**. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu. Rev. Physiol.*, 48:251-262. 1986.
- Snodderly, D.M.**. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62:1448S-1461S. 1995.
- Song, Z., Steller, H.**. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 9:M49-M52. 1999.
- Southorn, P. A., Powis, G.**. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Clin. Proc.*, 63:381-389. 1988.
- Spallholz, J.E., Boylan, L.M.**. Glutathione peroxidase: The two selenium enzymes. En: *Peroxidases in chemistry and biology*. Everse, J., Everse, K.E., Grisham, M.B. (eds), CRC Press, Boca Raton. 1991.
- Stadtman, E. R.**. Protein oxidation and aging. *Science*, 257:1220-1224. 1992.

Bibliografía

- Stamler, J.S., Single, D., Loscalzo, J.** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258:1898-1902. 1992.
- Stein-Behrens, B.A., Spolsky, R.M.** Stress, glucocorticoids, and aging. *Aging Clin. Exp. Res.*, 4:197-210. 1992.
- Steinberg, R.H., Miller, S.H.** Transport and membrane properties of the retinal pigment epithelium. In: *The Retinal Pigment Epithelium*. Zinn, K.M., Marmor, M.F., (Eds), Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, pgs. 205-225. 1979.
- Strolin-Benedetti, M., Dostert, P., Marrari, P., Cini, M.** Effect of ageing on tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, 94:21-30. 1993.
- Sugrue, M.M., Wang, Y., Chalmers-Redman, R.M., et al.** Reduced mitochondrial membranes potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem. Biophys. Commun.*, 261:123-130. 1999.
- Szabo, C., Zingarelli, B., O'Connor, M., Salzman, A.** DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose) Synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:1753-1758. 1996.
- Szent-Gyorgi A.** Observations on the functions of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem J.*, 22:1387-1394. 1928.
- Tager, J.M., Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Kunz, W., Bohnensack, R., Küster, U., et al.** Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.*, 151:1-9. 1983.
- Tagliatela, G., Pérez-Polo, J.R., Rassin, D.K.** Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 15:936-942. 1998.
- Takasawa, M., Hayakawa, M., Sugiyama, S., Hattori, K., Ito, T., Ozawa, T.** Age-associated damage in mitochondrial function in rat hearts. *Exp. Gerontol.*, 28:269-280. 1993.

- Tamatani, M., Ogawa, S., Niitsu, Y., Tohyama, M.** Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J. Neurochem.*, 71:1588-1596. 1998.
- Tappel, A.L., Brown, V.D., Zalkin, H., Maier, V.P.** Unsaturated lipid peroxidation catalyzed by hematin compounds and its inhibition by vitamin E. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 38: 5-10. 1961.
- Tappel, A.L.** Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. *Fed. Proc.*, 24:73-78. 1965.
- Tate, D.J., Miceli, M.V., Newsome, D.A., Alcock, N.W., Oliver, P.D.** Influence of zinc on selected cellular functions of cultured human retinal pigment epithelium. *Curr. Eye Res.*, 14:897-903. 1995
- Terry, R.D., De Teresa, T., Hansen, L.A.** Neocortical cell count in normal human adult aging. *Ann. Neurol.*, 21:530-539. 1987.
- Thurnham, D.I.** Antioxidants and prooxidant in malnourished populations. *Proc. Nutr. Soc.*, 49:247-259. 1990.
- Tian, L., Cai, Q., Wei, H.** Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 24:1477-1484. 1998.
- Tosaki, A., Droy-Lepaix, M.T., Pali, T., Das, D.K.** Effects of SOD, catalase, and a novel semiarrhythmic drug, EGB 761, on reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat hearts. *Free Rad. Biol. Med.*, 14:361-370. 1993.
- Trounce, I., Byrne, E., Marzuki, S.** Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet*, 1:637-639. 1989.
- Trush, M. A., Mimnaugh, E. G., Gram, T. E.** Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the roles of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmac.*, 31:3335-3343. 1982.
- Turrens, J.F., Crapo, J.D., Freeman, B.A.** Protection against oxygen toxicity by intravenous injections of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.*, 73:87-95. 1984.

Bibliografía

- Valenzuela, A., Videla, L.A.** Formas activas del oxígeno, estrés oxidativo y su proyección patológica. *Rev. Med. Chile*, 117:60-67. 1989.
- Valenzuela, A.** The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life sci.*, 48:301-309. 1991.
- Van Steensel, B., Smogorzawska, A., de Lange, T.** TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 92:401-413. 1998.
- Vanfleteren, J.R., Braeckman, B.P.** Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol. Aging*, 20:487-502. 1999.
- Vijg, J., Muller, W.E.G.** The science of aging and the need for a mechanistic approach. *Mech. Ageing Dev.*, 114:1-3. 2000.
- Vik, S.B., Georgevich, G., Capaldi, R.A.** Diphosphatidylglycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:1456-1460. 1980.
- Viña J.** (Ed.). Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. CRC Press, Boca Raton. 1990.
- Virag, L., Salzman, A.L., Szabo, C.** Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J. Immunol.*, 161:3753-3759. 1998.
- Vitorica, J., Cano, J., Satrustegui, J., Machado, A.** Comparison between developmental and senescent changes in enzyme activities linked to energy metabolism in rat heart. *Mech. Ageing Dev.*, 16:105-116. 1981.
- Webster, N. R., Nunn, J. P.** Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.*, 60:98-108. 1988.
- Weiss, H., Linke, P., Haiker, H., Leonard, K.** Structure and function of the mitochondrial ubiquinol: cytochrome c reductasa and NADH: ubiquinone reductasa. *Biochem. Soc. Trans.*, 15:100-102. 1987.
- Weissman, A.** Essays upon heredity and kindred biological problems. Oxford University-Claredon (Eds), London-New York. 1891.
- Wells, W.W., Jung, C.** Regeneration of vitamin C. En: *Vitamin C in health and disease*. Packer, L., Fuchs, J., (Eds), Marcel Dekker, Inc. New York, pgs. 109-121. 1997.

- Welsh, O.** Study of a family with atypic progeria. *Mod. Probl. Pediatr.*, 17:44-58. 1975.
- Wendel, A.** Glutathione peroxidasa. En: *Enzymatic basis of detoxication*. Jacoby, W.B., Bend, J.R., Caldwell, J. (eds), Academic Press, New York. 1980.
- Wharton, D.C., Griffith, D.E.** Studies of the electron transport system. Assay of cytochrome oxidase. Effect of phospholipids and other factors. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96:103-114. 1965.
- Wharton, D.C., Tzagaloff, A.** Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods in enzymology*, 10:245-250. 1967.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A., et al.** Alzheimer disease and senile dementia: loss of neurons in basal forebrain. *Science*, 215:1237-1239. 1982.
- Williams, A.J., Coakley, J., Christodoulou, J.** Automated analysis of mitochondrial enzymes in cultured skin fibroblasts. *Anal. Biochem.*, 259:2176-2180. 1998.
- Williams, D.L.H.** Nitrosation. *Cambridge University Press*. Cambridge, 1.988.
- Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D., Sternberg, P.** Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.*, 3:32-38. 1999.
- Winkler, B.S.** Glycolytic and oxidative metabolism in relation to retinal function. *J. Gen. Physiol.*, 77:667-692. 1981.
- Winkler, B.S.** Relative inhibitory effects of ATP depletion, ouabain and calcium on retinal photoreceptors. *Exp. Eye Res.*, 36:581-594. 1983.
- Wislocki, G.B., Ladman, A.J.** The demonstration of a blood-ocular barrier in the albino rat by means of the intravitam deposition of silver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1:501-510. 1955.
- Wolff, S. P., Dean R. T.** Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.*, 2234:399-403. 1986.
- Wolpp, S. P., Garner A., Dean, R. T.** Free radicals lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.*, 11:27-31. 1986.

Bibliografía

- Wong, K.K., Chang, S., Weiler, S.R., Ganesan, S., et al.** Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionising radiation. *Nat. Genet.*, 1:85-88. 2000.
- Wood, J.P., Osborne, N.N.** Induction of apoptosis in cultured human retinal pigmented epithelial cells: the effect of protein kinase C activation and inhibition. *Neurochem. Int.*, 31:261-. 1997.
- Wullner, U., Kornhuber, J., Weller, M., Schulz, J.B., et al.** Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease-a cautionary note. *Acta Neuropathol.*, 97:408-412. 1999.
- Yagi, T., Hatefi, Y.** Thiols in oxidative phosphorylation: inhibition and energy-potentiated uncoupling by monothiol and dithiol modifiers. *Biochemistry*, 23:2449-2455. 1984.
- Yan, C.Y.I., Greene, L.A.** Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway. *J. Neurosci.*, 18:4042-4049. 1998.
- Yen, T.C., Chen, Y.S., King, K.L., Yeh, S.H., Wei, Y.H.** Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:944-1003. 1989.
- Young, R.W., Bok, D.** Metabolism of the retinal pigment epithelium. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Zinn, K.M., Marmor, M.F., (Eds), Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, pgs. 103-123. 1979.
- Yu, B.P., Yang, R.** Critical evaluation of the free radical theory of aging: A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 786:1-11. 1996.
- Yu, B.P.** Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mech. Ageing Dev.*, 111:279-285. 1999.
- Zarbin, M.A.** Age-related macular degeneration: review of pathogenesis. *Eur. J. Ophthalmol.*, 8:199-206. 1998.
- Zhang, L., Kokkonen, G., Roth, G.S.** Identification of programmed cell death in situ in the striatum of normal adult rat brain and its relationship to neuronal death during aging. *Brain Res.*, 677:177-179. 1995.

-Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., Davies, K.J.A. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.*, 265:16330-16336. 1990.

-Zigler, J.S., Jernigan, H.M. Jr., Garland, D., Reddy, V.N. The effects of "oxygen radicals" generated in the medium on lenses in organ culture: inhibition of damage by chelated iron. *Arch. Biochem. Biophys.*, 241:163-172. 1985.