

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

EFECTO DEL ESTRADIOL Y OTROS COMPUESTOS
ESTROGÉNICOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES
ASOCIADOS A LA LONGEVIDAD

JUAN GAMBINI BUCHON

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 19 de juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Antonio Pellicer Martínez
- D. Klotz Lars-Oliver
- D. Federico Pallardó Calatayud
- D^a. Mónica de la Fuente del Rey
- D. Ángel Nadal Navajas

Va ser dirigida per:

D. José Viña Ribes

D^a. Consuelo Borrás Blasco

©Copyright: Servei de Publicacions
Juan Gambini Buchon

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7112-1

Edita: Universitat de València

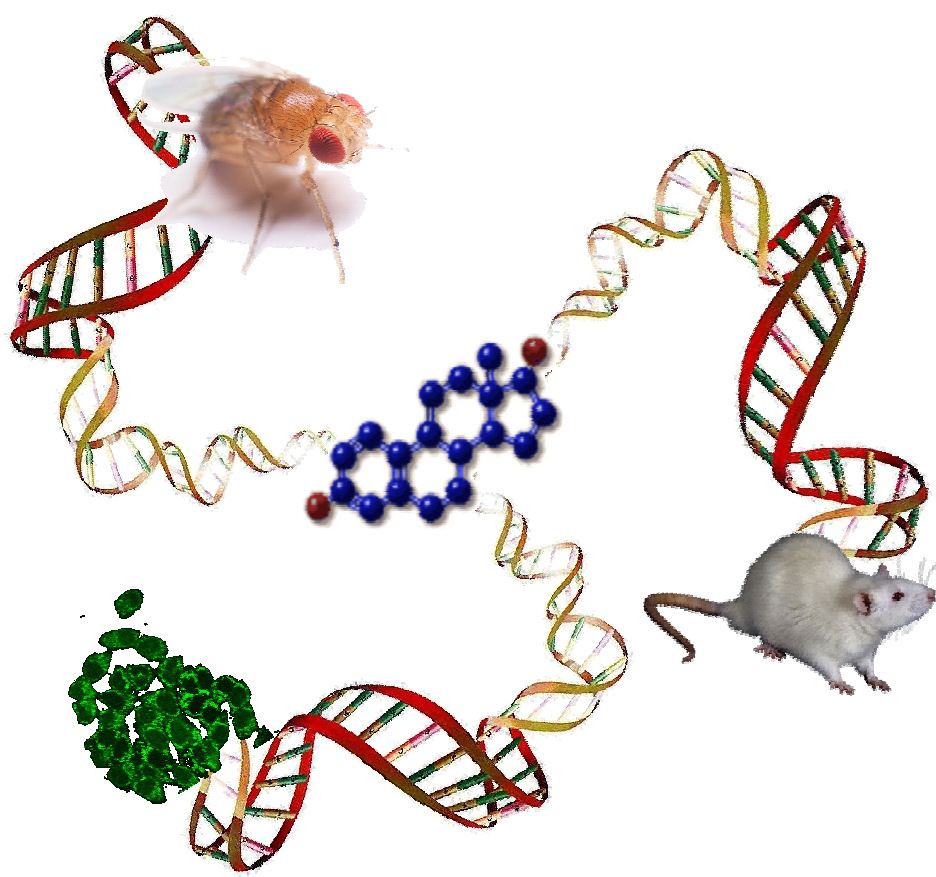
Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA



**EFECTO DEL ESTRADIOL Y OTROS
COMPUESTOS ESTROGÉNICOS SOBRE LA
EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA
LONGEVIDAD**

Presentada por:

Juan Gambini Buchón

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

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

Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco, profesora de la Universidad Católica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. Juan Gambini Buchón, Licenciado en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada

“EFECTO DEL ESTRADIOL Y OTROS COMPUESTOS ESTROGÉNICOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA LONGEVIDAD”

Para la obtención del título de Doctor.

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

Valencia, a 02 de mayo de 2007

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes Fdo. Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco

**Dedicada a Alex,
Juanito y Marquitos**

AGRADECIMIENTOS

Una de las cosas que se aprende en la vida es, **de hombres bien nacidos es ser agradecidos**, por ello y por y no por obligación.....sea dicho...

A mis Directores.

El Dr. Jose Viña, “el Padrino”, por sus grandes ideas y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo, gracias.

A Chelo Borrás “la Chole” “Desdichas y caminos hacen amigos”, por tanto que le costó crear un orden en mí, y no sé si lo consiguió, gracias. Ah! Y por las risas que nos hemos pegado juntos que valen más que NA.

A los jefes.

Fede y Juan, por lo que nos aguantan. ¡Qué paciencia!

A mi familia.

Alejandra. Amor no es quien enciende la llama en el corazón, sino la pareja que mutuamente la mantiene viva. Gracias Alex.

A mis dos peques, que son lo más grande de esta vida.

A mis padres, mi hermana, el Benni y David por su apoyo siempre incondicional

A mis colegas

A “Chaume” y a Rafa, a Eva, “al lenteja”, “al legio”, a Julito y Ester. ¡Qué peña!

A los del “labo”

A mi primer grupo Jose, “Enyel”, “Juli”, Salvita, Maris. Menudos festivos nos hemos pegado, y esa gran amiga que no se me olvida, Paula, qué tiempos....

Y qué decir de nuestro gran pequeño grupo, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. Los papeos en casa del Javi (como mola el tomate), con “Killo”, Rubén y esos viajes, con Soraya, qué risas. A Marquitos, cuidado por Bilbao, a “la Pain”, Javi, Alessandro, Ana, Jelena y Nancy, gracias.

A Diana, por su gran apoyo. Gracias

Gracias también por todos esos buenos momentos a M^a Carmen, mi colega, a Lele, Vladi, Ana y Fabián. A Teresa nuestra invitada especial.

No podría terminar sin agradecer a las secretarias su gran eficiencia y a Asun por esos filtros y conversaciones, ¡pero no por los capones!

Más vale una palabra a tiempo, que cien a destiempo.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1-91
1.1 RADICALES LIBRES	3-15
1.1.1 CONCEPTO DE RADICAL LIBRE.....	3-5
1.1.2 EL OXÍGENO.....	5-6
1.1.3. CLASES DE RADICALES LIBRES.....	6
1.1.3.1. ANIÓN SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$).....	6-7
1.1.3.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2).....	7-8
1.1.3.3. RADICAL HIDROXILO ($OH\bullet$).....	8-9
1.1.3.4. RADICAL PEROXILO ($ROO\bullet$).....	9
1.1.3.5. OXÍGENO SINGLETE (1O_2).....	9
1.1.3.6. ÓXIDO NÍTRICO ($NO\bullet$).....	9-10
1.1.3.7. DIÓXIDO DE NITRÓGENO ($NO_2\bullet$).....	10
1.1.3.8. RADICALES DE ÁTOMOS DERIVADOS DE CARBONO ($R\bullet$).....	10
1.1.3.9. RADICALES DE ÁTOMOS DERIVADOS DE AZUFRE ($RS\bullet$).....	10-11
1.1.4. GÉNESIS DE ROS.....	11-15
1.1.4.1 FUENTES EXÓGENAS.....	11-12
1.1.4.2. FUENTES ENDÓGENAS.....	12-15
1.1.4.2.1. LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL.	
1.1.4.2.2. REACCIÓN DE FENTON-HABER-WEISS	
1.1.4.2.3. LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.	
1.1.4.2.4. FAGOCITOS ACTIVADOS	
1.1.4.2.5. MICROSOMAS O PEROXISOMAS	
1.1.4.2.6. AUTOOXIDACIÓN DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS	
1.1.4.2.7. ENZIMAS SOLUBLES Y PROTEÍNAS	
1.1.4.2.8. MEMBRANA PLASMÁTICA	
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO	16-22
1.2.1. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	16

1.2.2. ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO A BIOMOLÉCULAS...	16-22
1.2.2.1. DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS.....	17-18
1.2.2.2. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS.....	18-19
1.2.2.3. DAÑO OXIDATIVO AL ADN.....	20-21
1.2.2.4. DAÑO OXIDATIVO A GLÚCIDOS.....	21-22
1.2.3. INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	22
1.3. ANTIOXIDANTES.....	22-37
1.3.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	24-28
1.3.1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	24-27
1.3.1.1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE COBRE Y ZINC (Cu,Zn-SOD).	
1.3.1.1.2. SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE MANGANESO (Mn-SOD)	
1.3.1.1.3. SUPERÓXIDO DISMUTASAS DEPENDIENTES DE OTROS METALES	
1.3.1.2. GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	27
1.3.1.3. CATALASA.....	28
1.3.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS.....	29-37
1.3.2.1. EL GLUTATIÓN.....	29-31
1.3.2.1.1. PAPEL ANTIOXIDANTE DEL GLUTATIÓN: CICLO REDOX.	
1.3.2.2. VITAMINA C.....	31-32
1.3.2.3. VITAMINA E.....	32-33
1.3.2.4. FLAVONOIDES.....	34-35
1.3.2.5. ESTILBENOS.....	35
1.3.3. ALIMENTOS RICOS EN COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.....	35-37
1.3.3.1 VINO.....	35-37
1.4. ESTRÓGENOS.....	37-66
1.4. BIOSÍNTESIS.....	37-38
1.4.2 PROPIEDADES QUÍMICAS.....	38
1.4.3. METABOLISMO DEL ESTRADIOL.....	38-39

1.4.4. ACCIONES DE LOS ESTRÓGENOS.....	39
1.4.4.1. EFECTOS METABÓLICOS DE LOS ESTRÓGENOS	39-40
1.4.4.2. EFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LOS MINERALES.....	40-41
1.4.4.3. EFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LOS LÍPIDOS.....	41-42
1.4.4.4. EFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LOS CARBOHIDRATOS.....	42
1.4.4.5. EFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LAS PROTEÍNAS.....	42
1.4.5. MECANISMO DE ACCIÓN	42-52
1.4.5.1. RECEPTORES ESTROGÉNICOS.....	43-52
1.4.5.1.1. RECEPTORES ESTROGÉNICOS NUCLEARES	
1.4.5.1.2. RECEPTORES ESTROGÉNICOS DE MEMBRANA	
1.4.5.1.2.1. EFECTOS “NO-GENÓMICOS” MEDIADOS POR EL RECEPTOR DE ESTRÓGENO DE MEMBRANA	
1.4.6. LA DOBLE CARA DE LOS ESTRÓGENOS: EFECTOS BENEFICIOSOS Y PERJUDICIALES.....	52-56
1.4.7 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.....	56-57
1.4.8. ESTRÓGENOS Y MAPquinasas	57-66
1.4.8.1 FAMILIA DE MAPquinasas ERK 1/2.....	60-61
1.4.9. SERMS-MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO.....	60-64
1.4.10. CONCLUSIONES.....	66-67
1.5. FITOESTRÓGENOS.....	67-69
1.5.1 GENERALIDADES.....	67-68
1.5.2 FITOESTRÓGENOS COMO ANTIOXIDANTES.....	68-69
1.6. LA MITOCONDRIA Y COMPUESTOS ESTROGÉNICOS.....	70-79
1.6.1. LA MITOCONDRIA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	70-79
1.6.1.1. FUNCIONES.....	72-73

1.6.1.2. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN LOS DISTINTOS ESTADOS MITOCONDRIALES.....	74-77
1.6.1.3. OTRAS ACCIONES DE LAS MITOCONDRIAS.....	77
1.6.1.4. ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LAS MITOCONDRIAS.....	78
1.6.1.5. LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN LA MITOCONDRIA.....	78-79
1.7. LA MOSCA DROSOPHILA MELANOGESTER COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO.....	80-82
1.7.1 CICLO VITAL.....	80-81
1.7.2. CURVAS DE SUPERVIVENCIA.....	81-82
1.8. ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD.....	82-91
1.8.1 LONGEVIDAD.....	83-85
1.8.2 TEORÍAS DE ENVEJECIMIENTO.....	85
1.8.3 TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES.....	85-90
1.8.4 PAPEL DE LOS ANTIOXIDANTES EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.....	90-91
2. <u>OBJETIVOS</u>	95-96
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	95
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	95-96
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	100-154
3.1. APARATOS.....	100-102
3.2. REACTIVOS.....	102
3.3. CULTIVOS CELULARES.....	103-105
3.3.1. CONDICIONES DE CULTIVO.....	104-105
3.3.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	105
3.3.2.1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CÉLULAS MCF-7.....	105-109
3.3.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL.....	109-113
3.3.2.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING EN CÉLULAS MCF-7.....	113-114

3.3.2.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	114-115
3.3.2.4.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. MÉTODO LOWRY.	
3.3.2.5. WESTERN BLOTTING.....	116-119
3.3.2.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUBUNIDAD P50 DE NFκB EN NÚCLEOS AISLADOS DE CÉLULAS MCF-7.....	119-121
3.3.2.6.1. AISLAMIENTO DE NÚCLEOS EN CÉLULAS MCF-7.	
3.3.2.6.2. ACTIVIDAD DE NFκB EN NÚCLEOS AISLADOS DE CÉLULAS MCF-7.	
3.3.2.7. AISLAMIENTO DE RNA.....	121-125
3.3.2.7.1. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA.	
3.1.2.7.2. ELECTROFORESIS DE RNA EN GEL DE AGAROSA.	
3.3.2.8. RETROTRANSCRIPCIÓN-AMPLIFICACIÓN DEL RNA (RT-PCR) EN TIEMPO REAL.....	125-135
3.4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	135-140
3.4.1. RATAS WISTAR.....	135
3.4.2. SACRIFICIO DE ANIMALES.....	135
3.4.3. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS DE RATAS AISLADAS	135
3.4.3.1. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATA.....	135
3.4.1.2.2. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	
3.4.4. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	139

3.4.4.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO Y COMPLEJIDAD MITOCONDRIAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	141-142
3.4.5. OBTENCIÓN DEL VINO SIN ALCOHOL. MÉTODOS Y CARACTERÍSTICAS.....	142
3.4.5.1. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	142-143
3.4.6.2. EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS TEJIDOS.....	143
3.4.7. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.....	144
3.4.7.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	143
3.4.7.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA.....	44-145
3.4.7.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATION REDUCTASA.....	145-147
3.4.7.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATION PEROXIDASA.....	14-149
3.4.7.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA.....	149-150
3.4.8. MOSCAS <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	151
3.4.8.1. CULTIVO.....	151-152
3.4.8.2.OBTENCIÓN DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN.....	152-153
3.4.8.3. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	153
3.4.8.4. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES.....	153
3.4.8.5. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE LONGEVIDAD.....	153
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	153-154
4. <u>RESULTADOS</u>	157-196
4.1 MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA MAMARIA (MCF7).....	157

4.1.1. PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS SOBRE EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA MAMARIA (MCF-7).....	157-158
4.1.2 PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS DE MEMBRANA SOBRE EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS MCF-7.....	158-159
4.1.3. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2 EN CÉLULAS MCF-7. PAPEL DE MEK 1/2.....	160-162
4.1.4. PAPEL DE ERK1/2 EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS MCF-7.....	162-163
4.1.5. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE NFKB AL NÚCLEO EN CÉLULAS MCF-7. PAPEL DE ERK1/2.....	163-164
4.1.6. PAPEL DE NFKB EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS MCF-7.....	165
4.1.7 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE LONGEVIDAD EN CÉLULAS MCF-7. PAPEL DE ERK1/2 Y NFKB.....	166-167
4.1.8. PROPUESTA DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS MCF-7	168
4.2 GENISTEÍNA.....	169-168
4.2.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GENISTEÍNA SOBRE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CÉLULAS MCF-7.....	169-170
4.2.2. VALORACIÓN DEL EFECTO DE LA GENISTEÍNA, A CONCENTRACIONES NUTRICIONALMENTE RELEVANTES, COMO ANTIOXIDANTE QUÍMICO.....	170-171
4.2.3. PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS SOBRE EL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA	

GENISTEÍNA EN CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA MAMARIA (MCF-7).....	171-172
4.2.4. EFECTO DE LA GENISTEÍNA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1 1/2 EN CÉLULAS MCF-7. PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS.....	172-174
4.2.5. EFECTO DE LA GENISTEÍNA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE NFKB AL NÚCLEO EN CÉLULAS MCF-7, PAPEL DE ERK1/2.....	175
4.2.6. EFECTO DE LA GENISTEÍNA SOBRE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE LONGEVIDAD EN CÉLULAS MCF-7. PAPEL DE ERK1/2 Y DE NFKB.....	176
4.2.7. PAPEL DE ERK1/2 EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS MCF-7.....	176-178
4.2.8. PROPUESTA DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE LA GENISTEÍNA EN CÉLULAS MCF-7.....	178-179
4.3. EFECTO ANTIOXIDANTE DIRECTO DEL ESTRADIOL O LA GENISTEÍNA EN MITOCONDRIAS AISLADAS HÍGADO DE RATAS MACHO.....	179-188
4.3.1. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDOS POR MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS MACHO.....	179-180
4.3.2. PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS DE MEMBRANA EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL.....	180-182
4.3.3. EL ESTRADIOL PRODUCE UN AUMENTO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATAS MACHO.....	182-183
4.3.4. EL ESTRADIOL IMPIDE LA SALIDA DE CITODROMO C EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATAS MACHO.....	182-185

4.3.5. LA GENISTEÍNA REPRODUCE LOS EFECTOS DEL ESTRADIOL. ACTÚA DIRECTAMENTE COMO ANTIOXIDANTE EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATAS MACHO.....	186-188
4.4. EFECTO DEL CONSUMO DE VINO TINTO SOBRE LA LONGEVIDAD Y SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE GENES ASOCIADOS A ELLA.....	188-196
4.4.1. EFECTO DEL VINO Y DEL VINO SIN ALCOHOL SOBRE LA LONGEVIDAD EN MOSCAS <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	190-191
4.4.2. EFECTO DEL VINO Y DEL VINO SIN ALCOHOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE RNAMENSAJERO DE DOS ENZIMAS RELACIONADOS CON LA LONGEVIDAD, EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	190-192
4.4.3. EFECTO DEL CONSUMO DE VINO Y VINO SIN ALCOHOL, EN RATAS MACHO, SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN DISTINTOS TEJIDOS.....	192-194
4.4.4. CANTIDADES DE CONSUMO DE AGUA, VINO, VINO SIN ALCOHOL Y COMIDA ESTÁNDAR. EFECTO SOBRE EL PESO.....	194-198
5. <u>DISCUSIÓN</u>	199-227
5.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	199-208
5.1.1. LONGEVIDAD Y ENVEJECIMIENTO.....	199-204
5.1.2. SEÑALIZACIÓN CELULAR Y ACTIVACIÓN DE GENES.....	205-205
5.1.3. DIFERENCIAS DE LONGEVIDAD ENTRE SEXOS.....	205-207
5.1.4. LA SOJA INDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES.....	207-208
5.2. MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA MAMARIA (MCF-7).....	208

5.3 PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS SOBRE EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL....	209-210
5.4 IMPLICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE ERK12 EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL.....	210
5.5. IMPLICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN NF-KB EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL.....	211-212
5.6 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES.....	212
5.7 MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO.....	213-216
5.8 LA GENISTEÍNA MIMETIZA LOS EFECTOS ANTIOXIDANTES DEL ESTRADIOL.....	216-217
5.9 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GENISTEÍNA SOBRE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	217-218
5.10 MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO.....	218-220
5.11 POSIBLE APLICACIÓN PRÁCTICA.....	211
5.12 EFECTO ANTIOXIDANTE DIRECTO DEL ESTRADIOL O LA GENISTEÍNA EN MITOCONDRIAS AISLADAS HÍGADO DE RATAS MACHO.....	222-223
5.13 EFECTO DEL CONSUMO DE VINO TINTO SOBRE LA LONGEVIDAD Y SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE GENES ASOCIADOS A ELLA.....	223-226
5.14 EFECTO DEL CONSUMO DE VINO Y VINO SIN ALCOHOL, EN RATAS MACHO, SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN DISTINTOS TEJIDOS.....	226-227
6. <u>SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION</u>.....	231-263
6.1 SUMMARY.....	231
6.2 INTRODUCTION: MITOCHONDRIAL OXIDANT FUNCTION IN AGING.....	232-234
6.3 FEMALES PRODUCE LESS MITOCHONDRIAL OXIDANTS THAN MALES.....	234-235

6.4 MITOCHONDRIA ARE LESS DAMAGED IN FEMALES THAN IN MALES.....	235-236
6.5 ESTROGENS UP-REGULATE THE EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT DEFENCES.....	236-237
6.6 SIGNALLING PATHWAYS INVOLVED IN THE ANTIOXIDANT EFFECT OF ESTROGENS.....	237-247
6.7 PHYTOESTROGENS MIMIC THE BENEFICIAL ACTION OF ESTROGENS IN PROMOTING MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT DEFENCES.....	248-254
6.8 PERSPECTIVES.....	255
6.9 EFFECT OF RED WINE ON THE LONGEVITY OF MALE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.....	256-263
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	267-297
8. <u>CONCLUSIONES</u>.....	301

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Vida media de radicales libres.....	3
Tabla 1.2. Especies activadas del oxígeno y nitrógeno.....	6
Tabla 1.3. Sistemas generadores de oxidación de proteínas in vivo.....	19
Tabla 1.4 Tipos de SOD y localización celular mayoritaria.....	25
Tabla 1.5 Efecto antioxidante del Estradiol.....	57
Tabla 1.6 Resumen de algunas acciones antioxidantes de los fitoestrógenos existentes en la bibliografía.....	69

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1 Reactivos empleados en los medios de cultivo.....	104
Tabla 3.2 Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.....	107
Tabla 3.3. Mezcla de reactivos empleadas para el ensayo.	111
Tabla 3.4 Reactivos empleados en los tratamientos.	113
Tabla 3.5 Descripción de los anticuerpos utilizados para Western Blotting.....	117

RESULTADOS

Tabla 4.1 Medida de los niveles de peróxido de hidrogeno en células MCF-7 mediante citometría de flujo.....	178
Tabla 4.2 actividad enzimática de la catalasa en distintos órganos de ratas.	192
Tabla 4.3 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en distintos órganos de ratas.....	193
Tabla 4.4 Actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hígado de ratas.....	194
Tabla 4.5 Actividad enzimática de la glutatión reductahígado de ratas.....	194
Tabla 4.6 Medias de los consumos de bebida y comida en ratas macho de tres meses durante dos semanas.....	195

Tabla 4.7 Pesos y sus variaciones en ratas machos que consumieron vino y vino sin alcohol frente al control.	196
Tabla 4.8 Pesos y sus variaciones en ratas machos que consumieron vino y vino sin alcohol frente al control.....	196

SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Table 6.1 Values of intake and drink in young rats treated with red wine, dealcoholized red wine and control.....	260
Table 6.2 Initial and final weight in young rats treated with red wine, dealcoholized red wine and its control.....	261
Table 6.3 Increments of weight in young rats treated with red wine, dealcoholized red wine and its control.....	261
Table 6.4 Catalase Activity in different tissues of young male rats.....	262
Table 6.5 Glutathione peroxidase Activity in different tissues of young male rats.....	262
Table 6.6 Glutathione reductase Activity in different tissues of young male rats.....	263
Table 6.7 Glucose-6-phosphate deshydrogenase Activity in different tissues of young male rats.....	263

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Mecanismo de peroxidación lipídica.....	18
Figura 1.2 Sistemas antioxidantes celulares.....	27
Figura 1.3 Ciclo redox del glutatión.....	31
Figura 1.4 Estructura de la Vitamina C.....	32
Figura 1.5 Estructura de la Vitamina E.....	35
Figura 1.6 Estructura básica de los flavonoides.....	33
Figura 1.7 Estructura química del 17β-estradiol.....	38
Figura 1.8 Distribución de receptores estrogénicos.....	44
Figura 1.9 Activación génica por los dímeros de receptor de estrógenos.....	46
Figura 1.10 Receptor de estrógeno de membrana en células MCF-7.....	49
Figura 1.11.- Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos.....	54
Figura 1.12 Efectos “no genómicos” del receptor de estrógeno de membrana.....	58
Figura 1.13 Vía de señalización de ERK.....	61
Figura 1.14 Mecanismo de acción del Tamoxifeno.....	64
Figura 1.15 Similitud entre las estructuras del 17β-estradiol y la genisteína.....	69
Figura 1.16 Estructura básica de las mitocondria.....	70
Figura 1.17 Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	72
Figura 1.18 Control respiratorio mitocondrial.....	75
Figura 1.19 Ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i>.....	81

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1- Expresión de receptores estrogénicos en células tumorales de glándula mamaria MCF-7.....	103
Figura 3.2 Esquema de detección de peróxido de hidrógeno.....	105

Figura 3.3 Curvas de amplificación obtenidas mediante PCR en tiempo real.....	127
Figura 3.4. Curvas de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico.....	128

RESULTADOS

Figura 4.1 Papel del estradiol y los receptores estrogénicos sobre los niveles de H ₂ O ₂ en células tumorales de glándula mamaria (MCF7).....	158
Figura 4. 2. Papel de los receptores estrogénicos de membrana sobre el efecto antioxidante del estradiol en células MCF-7.....	159
Figura 4.3 (a) Efecto del estradiol a 0,2 y 0,02 nM sobre la fosforilación de ERK 1/2.....	161
Figura 4.3 (b) Papel de MEK 1/2 en la activación de ERK1/2 por el estradiol.....	162
Figura 4.4 Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7. Papel de ERK 1/2.....	163
Figura 4. 5 Actividad de la subunidad p50 de NF-κB en núcleos aislados de células MCF-7. Papel de ERK 1/2.....	164
Figura 4. 6. Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 Papel de NFκB en el efecto antioxidante del estradiol.....	165
Figura 4. 7. Niveles de RNA mensajero de Mn-SOD (a) y Glutación peroxidasa (b) en células MCF-7 tratadas con estradiol e inhibidores durante 48 horas.....	167
Figura 4.8. Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 tratadas con genisteína a distintas concentraciones.....	170
Figura 4.9. Capacidad antioxidante, de medios de cultivo con distintas concentraciones de genisteína, frente a trolox.....	171

Figura 4.10. Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 tratadas con genisteína a concentraciones nutricionales. Papel de los receptores estrogénicos.....	172
Figura 4.11. Efecto de la genisteína sobre la fosforilación de ERK1/2 en células MCF-7 (a). Papel de los receptores estrogénicos (b).	173-174
Figura 4.12. Actividad de la subunidad p50 de NF-κB en núcleos aislados de células MCF-7. Papel de ERK1/2.....	175
Figura 4.13 Expresión de Mn-SOD en células MCF-7 incubadas con genisteína y un inhibidor de la fosforilación de ERK ½ (U0126).....	176
Figura 4.14 Niveles de peróxido de hidrogeno en células MCF-7. Papel de ERK1/2.....	177
Figura 4.15. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho.....	180
Figura 4.16. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho.....	181
Figura 4.17. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho incubadas con concentraciones crecientes de estradiol.....	182
Figura 4.18. Potencial de membrana en mitocondrias hepáticas de ratas macho.....	183
Figura 4.19. Cantidad mitocondrial de citocromo c.....	184
Figura 4.20. Cantidad de citocromo c en el sobrenadante mitocondrial.....	185
Figura 4.21. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho.....	186
Figura 4.22. Cantidad mitocondrial de citocromo c.....	187
Figura 4.23. Cantidad de citocromo c en el sobrenadante mitocondrial.....	188
Figura 4.24. Curva de longevidad. Efecto del vino y vino sin alcohol sobre la longevidad de <i>Drosophila melanogaster</i>	190

Figura 4.25 Niveles de RNA mensajero de la enzima catalasa en <i>Drosophila melanogaster</i>.....	191
Figura 4.26 Niveles de RNA mensajero de la enzima 16s rRNA en <i>Drosophila melanogaster</i>.....	191
DISCUSIÓN	
Figura 5.1 Modificada de CUTLER RG (1990).....	199
Figura 5.2. Perfil de supervivencia en distintas especies.....	201
Figura 5.3 Tasas de mortalidad por enfermedad coronaria en el mundo.....	202
Figura 5.4 Genes relacionados con la longevidad.....	203
Figura 5.5 Esquema del mecanismo propuesto. Tomado de (Borras, Gambini et al., 2005).....	214
Figura 5.6 Esperanza de vida en España.....	215
Figura 5.7 Mecanismo de acción propuesto. Tomado de (Borras, Gambini et al., 2006).....	220
SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION	
Figure 6.1 Antioxidant effect of estradiol is estrogen receptor-mediated.....	238
Figure 6.2 Antioxidant effect of estradiol is estrogen membrane receptor-mediated.....	239
Figure 6.3 (A) Estradiol induces phosphorylation of ERK1/2....	240
Figure 6.3 (B) Estradiol induces phosphorylation of ERK1/2....	241
Figure 6.4 MAPK mediate the antioxidant effect of estradiol....	242
Figure 6.5 Estradiol induces NF-κB translocation, mediated by MAPK.....	243
Figure 6.6 NF-κB mediate the antioxidant effect of estradiol. ...	244
Figure 6.7 Estradiol up-regulates antioxidant enzyme expression, mediated by MAPK and NFκB.....	245-246
Figure 6.8 summarizes the proposed mechanism.....	247
Figure 6.9 Genistein diminishes peroxide levels in MCF-7 cells.	249

Figure 6.10 Antioxidant effects of genistein involve estrogen receptor(s).....	250
Figure 6.11 Genistein activates extracellular-signal regulated kinase pathway.....	250-251
Figure 6.12 Genistein activates the NF-κB signalling pathway in MCF-7 cells.....	252
Figure 6.13 Genistein up-regulates the expression of MnSOD in MCF-7 cells.....	253
Figure 6.14 summarizes the proposed mechanism.....	254
Figure 6.15. Effect of red wine and dealcoholized red wine in <i>Drosophila melanogaster</i> longevity curve.....	257
Figure 6.16 Dealcoholized red wine up-regulates antioxidant enzyme expression of catalase.....	258
Figure 6.17 Red wine up-regulates antioxidant enzyme expression, of 16S Rrna.....	259

ABREVIATURAS

1O₂: Oxígeno singlete.
ADP: Adenosín difosfato
ATP: Adenosín trifosfato.
BSA: Suero bovino albúmina
Cu,Zn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.
DES: Dietilestilbestrol
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido ácido
E2: 17β-estradiol
EDTA: Ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético.
EGTA: Etileno glicol-bis (aminoetil eter)- N,N,N',N'- ácido tetracético.
ERE: Elementos de reacción a estrógenos (Estrogen Responsive Elements)
Erk1/2MAPK: Kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2.
etanosulfónico).
FAD: Flavín adenín dinocluótido.
FSH: Hormona estimulante del folículo
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfatodeshidrogenasa
GCS: γ-glutamilcisteína sintetasa
GGT: γ-Glutamil-transpeptidasa.
GNRH: Hormona liberadora de gonadotropina
GPx: Glutación peroxidasa
GSH: Glutación reducido.
GSSG: Glutación oxidado
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
GSSG: Glutación oxidado.
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HCl: Ácido clorhídrico
HEPES: N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HSP90: Heat shock protein 90
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico.
IL-2: Interleukina 2

JNKMAPK: c-Jun NH₂-Terminal Kinasa.
KOH: Hidróxido potásico.
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LH: Hormona luteinizante
MAPK: Proteín kinasas activadas por mitógenos.
MDA: Malondialdehido
Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MOPS: Ácido propano sulfónico.
NAD: Nictotinamida adenín dinucleótido
NADH: Nicotiamida adenín dinucleótido
NADPH: Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato
NF-κB: Factor Nuclear kappa B.
NO•: Óxido nítrico.
NO₂Cl: Cloro nitrilo.
NOS: Óxido nítrico sintasa (e-NOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal)
O₂•⁻: Anión superóxido.
OH•: Radical hidroxilo.
ONOO⁻: Peroxinitrito.
Oxo8dG: 8-hidroxi-2'-desoxi guanosina
p38 MAPK: Proteín kinasa activada por estrés.
PBS: Fosfato tampón salino.
PCA: Ácido perclórico
RE: Receptor de estrógenos
RNA: Ácido ribonucleico
RNS: Especies reactivas del nitrógeno
ROO•: Radical peroxilo.
ROS: Especies reactivas del oxígeno
RT-PCR: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS: Dodecil sulfato sódico
SERM: Modulador de los receptores de estrógenos
SOD: Superóxido dismutasa

TBARS: Especies reactivas del tiobarbitúrico
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
TSH: Terapia de sustitución hormonal
UI: Unidades internacionales.
UV: Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1.1 RADICALES LIBRES

1.1.1. Concepto de radical libre

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

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

Tabla 1.1 Vida media de radicales libres

Estas especies químicas son abundantes en los sistemas vivos. Es más, algunos autores como Denham Harman en su estudio sobre el origen y evolución de la vida (Harman, 2001) proponen a los radicales libres como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta. Hace 3.500 millones de años las reacciones ionizantes provocadas por el sol, que

formaban radicales libres, empezaron a producir reacciones espontáneas entre átomos y moléculas originando la formación de una serie de moléculas capaces de transmitirse información química entre sí. Un momento culminante en el origen de la vida se produjo con la aparición de los procesos de recombinación y de escisión de moléculas, llegando al origen de la algas verdes hace 2.600 millones de años. A partir de este momento los organismos procariotas anaerobios evolucionaron a eucariotas, dominando la tierra. Otro salto evolutivo se produjo, hace 1.300 millones de años, con la simbiosis de una célula eucariota con una procariota con capacidad de reducir O_2 a H_2O_2 . Es entonces cuando el oxígeno empezó a acumularse en la tierra formando la capa de ozono, permitiendo la evolución de las futuras especies fuera del mar. El oxígeno se convirtió entonces en la molécula que proporcionaba la fuente primaria energética en los organismos aerobios, que son los que evolucionaron hasta los seres humanos entre los miles de especies actuales. Por una parte da origen a la vida y por otra, por su capacidad de formar distintos radicales libres es capaz de dañar estructuras esenciales para el desarrollo de ésta, tales como DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos (Sies, 1983) (Halliwell and Gutteridge, 1985). Además los radicales libres intervienen en procesos fisiopatológicos como la diabetes y algunos tipos de cáncer (Takada et al., 1982; Okamoto, 1985). También intervienen en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Pacifi and Davis, 1991) y el ejercicio físico agotador (Davies et al., 1982; Sastre et al., 1992). El papel de los radicales en el envejecimiento es un tema que se comentará mas adelante, debido a su relación con la tesis.

En la naturaleza los radicales libres son mayoritariamente compuestos derivados del oxígeno y se denominan especies reactivas del

oxígeno (ROS). La base química por la cual el oxígeno se comporta de tal forma viene detallada en el siguiente apartado.

1.1.2 El oxígeno

El oxígeno se encuentra en la naturaleza mayoritariamente en forma molecular o diatómica (O_2), contiene 16 electrones distribuidos correspondientemente en sus distintos orbitales según la teoría de los orbitales moleculares (TOM),(Whitten et al., 1992). La estructura termodinámicamente más estable de la molécula forma una distribución electrónica de forma que deja desapareados dos electrones en la capa de valencia, por lo que le capacita para reaccionar eficazmente con radicales libres, aunque su velocidad de reacción con especies radicalarias suele ser baja. (Cheeseman and Slater, 1993). Esta configuración está considerada por algunos autores como un radical libre.

El oxígeno diatómico es una forma muy abundante en la naturaleza debido a que es una molécula estable. Sin embargo, existe un gran número de especies derivadas del oxígeno que, o bien son muy reactivas, o bien son capaces de dar lugar a especies reactivas (ver Tabla 1.2). Algunas de estas especies son auténticos radicales libres derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo. Otras como el peróxido de hidrógeno, no son en realidad radicales en el sentido estricto de su definición.

Además existen otras especies radicalarias no derivadas del oxígeno que están tomando interés en los últimos años, como las derivadas del nitrógeno (RNS).

ESPECIE	SÍMBOLO
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$
Radical hidropéroxido	HO_2^{\cdot}
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^{\cdot}
Radical alcóxido	RO^{\cdot}
Radical péroxido	ROO^{\cdot}
Óxido nítrico	NO^{\cdot}
Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}

Tabla 1.2. Especies activadas del oxígeno y nitrógeno

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

1.1.3. Clases de Radicales libres

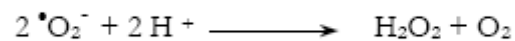
Existen muchas clases de radicales libres, tanto especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) como las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Algunos de los radicales libres más importantes son:

1.1.3.1. Anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

Estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en reacciones catalizadas enzimáticamente, como producto en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa,

purina oxidasa, etc. (Korycka-Dahi and Richardson, 1981), en las oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.), también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña et al., 1983) o la riboflavina (Barton and Parker, 1970). Asimismo en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris et al., 1972), siendo potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos.

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

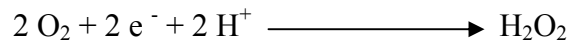


1.1.3.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos activa de las especies reactivas del oxígeno. Su importancia recae en el hecho de que atraviesa fácilmente las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción.

Se puede originar a partir de diversas fuentes:

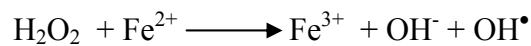
- Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997).



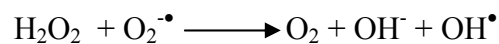
- Por dismutación del $\bullet\text{O}_2^-$ (Cheeseman and Slater, 1993; Frei, 1994).
- Como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) (Fridovich, 1986).
- Por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahi and Richardson, 1981)

1.1.3.3. Radical hidroxilo (OH^\bullet)

Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} s (Liochev and Fridovich, 1994). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton (Fenton, 1894).



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



Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre.

1.1.3.4. Radical peroxilo (ROO[•])

Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga, del orden de segundos, ver tabla 1.1.

1.1.3.5. Oxígeno singlete (¹O₂)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre como tal. Se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10⁻⁶ segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas o en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (Kanofsky and Sima, 1993).

1.1.3.6. Óxido nítrico (NO[•])

El óxido nítrico es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina, dando como subproducto NO[•] en numerosos tipos celulares

(Moncada et al., 1991). Además lo producen los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria.

Interviene en numerosos procesos fisiológicos, actuando como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotransmisor, etc. siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa (Czapski and Goldstein, 1995)

1.1.3.7. Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet)

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

1.1.3.8. Radicales de átomos derivados de carbono (R^\bullet)

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

1.1.3.9. Radicales de átomos derivados de azufre (RS^\bullet)

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre (RS^\bullet) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida

con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo (Estrela et al., 1983; Sparrow and Olszewski, 1993).

1.1.4. Génesis de ROS

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), el ozono, el humo del tabaco, la polución ambiental, etc. (Ames, 1983). Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman and Crapo, 1982; Frei, 1994). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Halliwell, 1991).

1.1.4.1 Fuentes exógenas.

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

- Muchos agentes **antineoplásicos** tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos **antibióticos** (Doroshov and Hochstein, 1982) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las **radiaciones electromagnéticas** (rayos X, γ) o debido a **radiaciones de**

partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielsky and Gebieki, 1977).

- **Factores ambientales**, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación. (Mason, 1982).

1.1.4.2. Fuentes endógenas

1.1.4.2.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial.

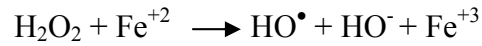
La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en interior de la célula. Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada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

Este sistema enzimático se comentará detalladamente en el capítulo 5.1 de la introducción de la presente tesis.

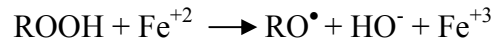
1.1.4.2.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss

Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones. El agua oxigenada (H_2O_2) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton, 1894) descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar

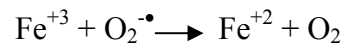
moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss los que posteriormente comprobaron cómo el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en radical hidroxilo e ión hidroxilo (Haber and Weiss, 1932).



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell and Gutteridge, 1986). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Rawley and Halliwell, 1983; Sawyer, 1988) y por el radical superóxido (Frei, 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



1.1.4.2.3. Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico.

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila et al., 1981) y xenobióticos. Bajo la denominación de citocromos P450 se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente

distribuidos entre los seres vivos. Son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster and Estabrook, 1993).

1.1.4.2.4. Fagocitos activados

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 como mecanismo de defensa frente a microorganismos (Babior, 1978).

1.1.4.2.5. Microsomas o peroxisomas

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris, Oshino et al., 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos (Freeman and Crapo, 1982; Krinsky, 1994). Por otro lado, el citocromo P450 tiene un papel importante en los microsomas que detoxifican xenobióticos (Philpot, 1991).

1.1.4.2.6. Autooxidación de pequeñas moléculas

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos

estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dioxígeno por estas moléculas (Baccarini, 1978). Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido, bien espontánea, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD).

1.1.4.2.7. Enzimas solubles y proteínas

Enzimas como xantina oxidoreductasa, óxido nítrico sintasa, aldehído oxidasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman and Handler, 1967).

1.1.4.2.8. Membrana plasmática.

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio (Jones et al., 1994).

Cabe destacar el papel de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White, 1990).

1.2. ESTRÉS OXIDATIVO

1.2.1. Concepto de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986).

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

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

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

Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

1.2.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.

1.2.2.1. Daño oxidativo a lípidos.

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman and Slater, 1993) siendo el radical hidroxilo (HO•), el peróxido (ROO•), el alcoxilo (RO•) y el alquílico (R•) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos

El proceso de ataque oxidativo a lípidos (Figura 1.1), denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell, 1994; Krinsky, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonanal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Cheeseman and Slater, 1993) (Freeman and Crapo, 1982; Halliwell, 1991; Halliwell, 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Krinsky, 1994). La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de

células aeróbicas (Lippman, 1985). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga et al., 1994).

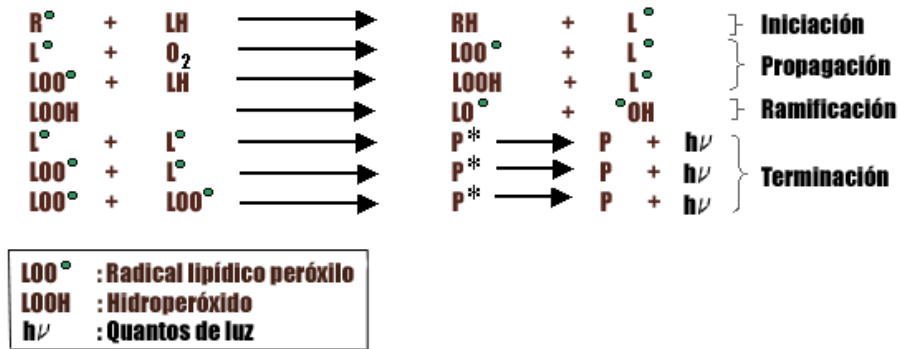


Figura 1.1. Mecanismo de peroxidación lipídica.

1.2.2.2. Daño oxidativo a proteínas.

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadman, 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies et al., 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica (Stadman, 1992).

En la Tabla 1.3 se resumen los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS
<ul style="list-style-type: none">• NADPHoxidasas/NADPH/Fe(III)/O₂• Xantina Oxidasa/Hipoxantina/Fe(III)/O₂• CitocromoP450 reductasa/CitocromoP450 /NADPH/Fe(III)/O₂• CitocromoP450reductasa/redoxina/ CitocromoP450/ NADH/Fe(III)/O₂• Nicotinato hidroxilasa/NADPH/Fe(III)/O₂	<ul style="list-style-type: none">• Ascorato/Fe(III)/O₂• RSH/Fe(III)/O₂• Fe(II)/O₂• Fe(II)/H₂O₂ (reactivo de Fenton)

Tabla 1.3. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas.

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

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (Stadman, 1992).

1.2.2.3. Daño oxidativo al ADN

El ADN también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. El oxígeno es capaz de atacar tanto a las bases como al azúcar.

Podemos encontrar más de veinte subproductos tras un ataque oxidativo al ADN. Entre ellos, la oxidación de la 2-desoxiguanosina a 8-hidroxi 2-desoxiguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones de purinas (Kasai and Nishimura, 1984; Shibutani et al., 1992).

El daño oxidativo asociado a proteínas y ADN no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el ADN, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell and Auroma, 1991; Breen and Murphy, 1995). Por ello, las lesiones oxidativas al ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Viguie et al., 1993). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Viguie, Shigenaga et al., 1993).

El ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter et al., 1988), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de

histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN (Donald and Johns, 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Shen et al., 1995; Suter and Richter, 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi and Davies, 1993). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de ADN codificante (Linnane et al., 1989; Ames, Shigenaga et al., 1993) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

1.2.2.4. Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan con facilidad con el radical hidroxilo. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini et al., 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel et al., 1988) dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide. Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de

proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (McCord, 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald and Moy, 1980).

1.2.3. Indicadores de estrés oxidativo.

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, uno de los más relevantes es el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) característico de estrés oxidativo, de modo que un aumento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración del estado redox celular (Sies, 1986).

Además como indicadores de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído y el hidroxinonenal son los más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano. La 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina es un indicador de daño oxidativo al ADN, los grupos carbonilo y la 2-oxohistidina se utilizan como marcadores de daño en oxidativo en proteínas (Hageman et al., 1992), etc.

1.3. ANTIOXIDANTES

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

disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Sies, 1993; Halliwell and Gutteridge, 1995; Halliwell, 1996)

De modo que pueden actuar de las siguientes formas:

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

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

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

Los *antioxidantes secundarios* son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados,

previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell and Gutteridge, 1990).

Los *antioxidantes terciarios* reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies, Delsignore et al., 1987; Pacifi and Davis, 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian et al., 1985).

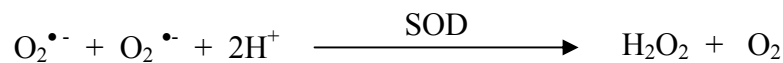
Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

1.3.1.1. Superóxido dismutasa

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

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



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

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

ENZIMA	GRUPO PROSTÉTICO	LOCALIZACIÓN CELULAR
Cu,Zn-SOD	Cu,Zn	Citosol y Núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial y Citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

Tabla 1.4 Tipos de SOD y localización celular mayoritaria.

1.3.1.1.1. Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD).

La superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu, Zn-SOD) aparece en la mayoría de las células eucariotas. Es una proteína soluble que contiene como cofactores iones de cobre y de zinc. Existe en muchas formas isoméricas que se distinguen por el contenido en iones metálicos (Ischiropoulos, 1990). La más abundante de las formas isoméricas se localiza mayoritariamente en el citosol, y en menor cantidad en el núcleo

(ver Tabla 1.4) (Chang, 1988) aunque también tiene otras localizaciones. Su transcripción se lleva a cabo a partir del ADN nuclear. A escala tisular, esta isoforma se encuentra a elevadas concentraciones en hígado, cerebro y testículos, y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas.

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

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

Hay dos tipos de superóxido dismutasas que contienen manganeso. Una de ellas se encuentra mayoritariamente en la matriz mitocondrial (Weisger and Fridovich, 1973) y en menor medida en el citosol (Fridovich, 1974). Su transcripción tiene lugar a partir del ADN mitocondrial, y su presencia en la mitocondria es de gran importancia puesto que como se ha señalado con anterioridad, la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en las células (Boveris and Chance, 1973), de modo que constituye una de las barreras frente al daño oxidativo originado por los radicales libres.

La otra SOD dependiente de manganeso, se encuentra en bacterias tales como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* (Vance et al., 1972).

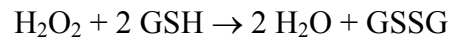
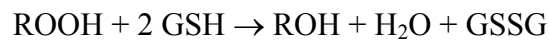
1.3.1.1.3. Superóxido dismutasas dependientes de otros metales

Otras enzimas superóxido dismutasa contienen hierro, como la que se halla en *Escherichia coli* (Yost and Fridovich, 1973). Más recientemente,

se han descubierto algunas superóxido dismutasas denominadas atípicas que contienen como cofactores en su grupo prostético diferentes combinaciones de los metales mencionados anteriormente u otros metales (Ciriolo et al., 1991).

1.3.1.2. Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es también un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance et al., 1979).

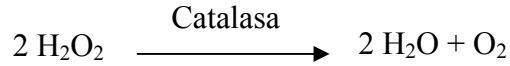


Hay dos tipos de glutación peroxidasa, y ambas requieren glutación reducido como dador de equivalentes reductores: *Glutación peroxidasa selenio dependiente*: es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986), además de intervenir en otros procesos como eliminación de xenobióticos (Sohn et al., 1999). Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom et al., 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).

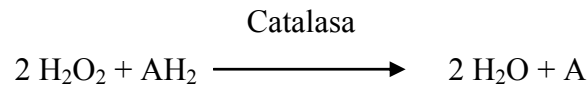
Glutación peroxidasa no selenio dependiente: sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

1.3.1.3. Catalasa

La catalasa participa en la eliminación de peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance, Sies et al., 1979).



También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Chance, Sies et al., 1979).



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Tolbert and Essner, 1981), si bien en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y citosol (Rodríguez et al., 2000).

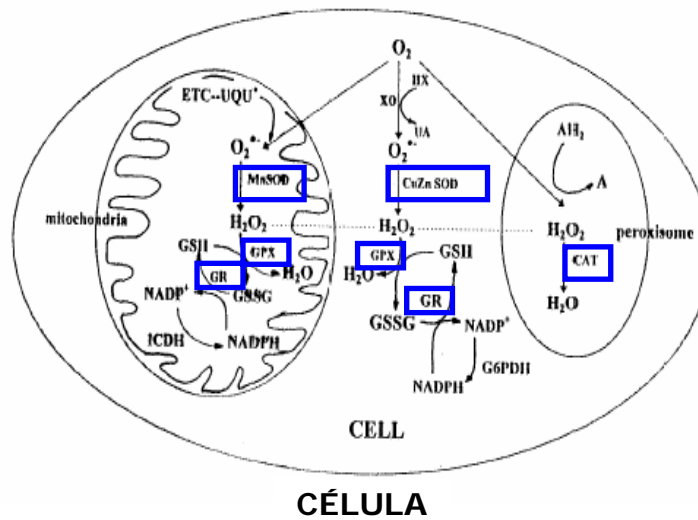


Figura 1.2. Sistemas antioxidantes celulares.

1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

1.3.2.1. El glutatión

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 (Hopkins, 1921) y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutatión tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula.

Se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas.

El GSH participa en gran cantidad de procesos fisiológicos:

1. Papel en la síntesis del ADN. En este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar deoxirribonucleótidos, reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. En esta reacción debe intervenir un donante de hidrógeno que puede ser la tiorredoxina, o la glutarredoxina (Holmgren, 1979) dependiente de GSH.
2. Papel protector frente al estrés oxidativo. Dado que el GSH es uno de los antioxidantes principales de la célula, constituye una importante barrera de protección frente al estrés oxidativo (Sies, 1986). El GSH protege a la membrana celular contra el daño oxidativo ya que mantiene el estatus tiólico de la misma (Kosower and Kosower, 1983). El GSH puede excretarse también de las células y actuar como mecanismo de emergencia

frente al daño que un exceso de GSSG puede causar, puesto que el GSSG reacciona con los grupos tioles de proteínas formando disulfuros mixtos.

3. Papel en la regulación de la síntesis de proteínas. Cuando el GSH se oxida los procesos de iniciación y elongación de la traducción se inhiben (Ochoa, 1983). Cuando el GSSG se reduce la elongación se reanuda y parece que es un aumento en la concentración de GSSG lo que hace que la síntesis proteica se inhiba.
4. Colabora en la detoxificación de xenobióticos (Orrenius and Moldeus, 1984)
5. Contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Vina, 1990.).
6. Constituye un reservorio de cisteína (Tateishi et al., 1974)
7. Modula actividades enzimáticas (Pajares et al., 1992).
8. Juega un papel en la homeostasis del calcio (Bellomo et al., 1982)
9. Participa en la regulación de la proliferación celular (Bellomo, Jewel et al., 1982).

1.3.2.1.1. Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa.

Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será

suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria.

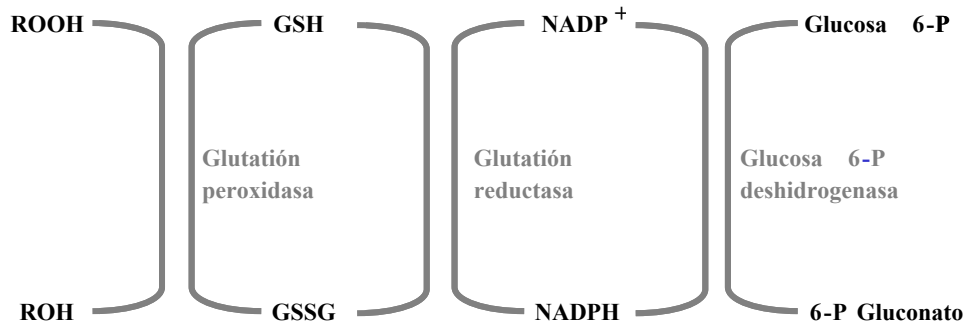


Figura 1.3 Ciclo redox del glutatión.

1.3.2.2. Vitamina C

Se considera uno de los más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales (Bendich et al., 1986). Es soluble en agua y se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos, el plasma contiene alrededor de 60 $\mu\text{mol/L}$. Las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, pero los humanos, otros primates superiores y los cobayas no poseen uno de los enzimas imprescindibles para su síntesis, teniendo que ser incorporada con la dieta.

Cuando reacciona con ROS se oxida a dihidroascorbato que será reciclado a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa. Por ello, el dihidroascorbato se encuentra en concentraciones mucho más bajas que el ascorbato.

Esta vitamina es efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. En

solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana.

La vitamina C es una molécula que posee tanto propiedades antioxidantes como prooxidantes, dependiendo de la concentración de hierro tisular (Frei, 1994), aunque no ha podido demostrarse su efecto prooxidante *in vivo*. Cuando la cantidad es baja, ejerce un efecto antioxidante, uniéndose al radical superóxido o hidroxilo y formando radical semihidroascorbato, que posteriormente es reducido por el glutatión. Sin embargo, en condiciones de alta concentración tisular de hierro, el ácido ascórbico es capaz de catalizar la reacción de Fenton y por lo tanto, generar ion ferroso, que a su vez facilita la producción de radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss.

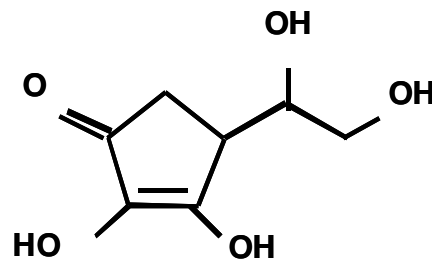


Figura 1.4 Estructura de la Vitamina C.

1.3.2.3. Vitamina E

Bajo esta denominación se incluye una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. En el organismo existen 4 tipos principales de tocoferoles: alfa, beta, gamma y delta tocoferol. Estos grupos de compuestos altamente lipofílicos, tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas.

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

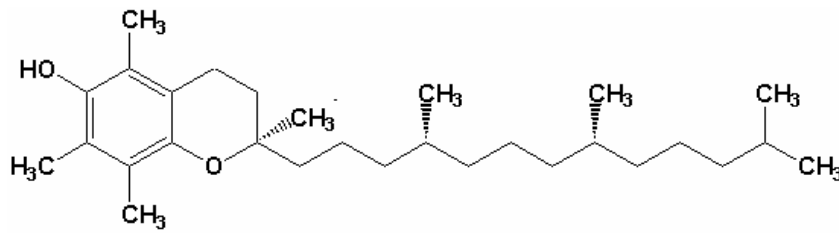


Figura 1.5 Estructura de la Vitamina E.

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

El alfa-tocoferol es el antioxidante más eficiente de la fase lipídica (Niki, 1987). Contiene grupos metilo adyacentes a los grupos hidroxilo fenólicos y están óptimamente posicionados en las membranas. Los tocoferoles además tienen capacidad de captar energía del oxígeno singlete y de interaccionar con peroxinitritos.

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

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

1.3.2.4. Flavonoides

Son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que además de encontrarse en el vino también se hallan en muchas frutas, vegetales y bebidas como el té y la cerveza principalmente como O-glicósidos. Son eficientes antioxidantes capaces de reaccionar con radicales como los radicales peroxilos, el radical hidroxilo, y el O_2^- , formando el radical fenoxi (Rice-Evans et al., 1995).

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

Son muchas las propiedades que se les atribuye a los flavonoides a la hora de interactuar con radicales libres. Éstas incluyen la presencia de una estructura 3',4'-hidroxi en el anillo B, la presencia de un doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo en el anillo C, y la presencia de un grupo 5-hidroxilo en el anillo A con un grupo 3-hidroxilo y una función 4-oxo en el anillo C. Las propiedades antioxidantes de los flavonoides han sido investigadas tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Podría mencionarse que, sin embargo, la biodisponibilidad de estos compuestos es bastante pobre. Se conjuga rápidamente en las reacciones de detoxificación de fase II y los niveles de flavonoides libres en plasma humano son bastante bajos. Muchos compuestos fenólicos con actividad antioxidante son derivados del ácido cinámico, como por ejemplo el ácido cafeínico, el ácido clorogénico o el ácido ferúlico (Rice-Evans and Miller, 1996).

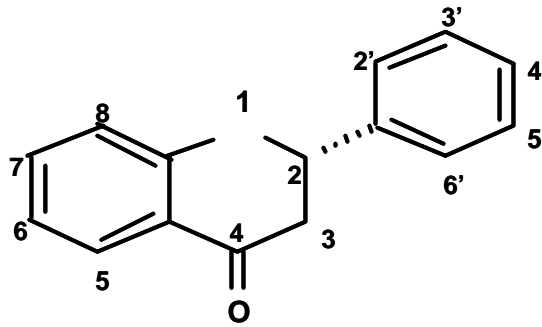


Figura 1.6 Estructura básica de los flavonoides.

1.3.2.5 Estilbenos

Entre los más destacados podemos encontrar el resveratrol, uno de los polifenoles del vino más estudiado, sus concentraciones pueden variar entre 0,003 y 3,0 uM en vino tinto. Debido a que el resveratrol es un compuesto que actúa como fungicida y es inducido por infecciones, su presencia y niveles pueden ser muy variables.

Entre las múltiples propiedades que se le atribuyen en la bibliografía a este compuesto cabe destacar su actividad estrogénica (Basly et al., 2000).

1.3.3 Alimentos ricos en compuestos antioxidantes

Por su relación con la presente tesis señalaremos únicamente el vino.

1.3.3.1 Vino

El vino tinto es sin duda la sustancia natural de consumo humano con más capacidad antioxidante que existe, ello es debido a la materia prima empleada y su proceso de formación. Forma parte de nuestra cultura desde hace más de 6.000 años.

El vino tinto se obtiene a partir de las uvas negras, a grandes rasgos después de la recolección se tritura el fruto completo: la piel, el hollejo y las

pepitas. Esta pasta se deja fermentar en presencia de levaduras, presentes en la propia piel del fruto, que transforman los azúcares del mosto (glucosa y fructosa) en alcohol, ácido carbónico y aromas. Una vez terminada la fase de fermentación alcohólica tiene lugar la fermentación maloláctica. En este caso van a actuar bacterias que transforman el ácido málico formado en la fermentación alcohólica, en ácido láctico. Una vez terminados estos dos procesos obtenemos el vino, que puede seguir distintos tratamientos para mejorar su palatividad, tales como estabilizaciones físico-químicas y biológicas, esterificación de ácidos con alcoholes, oxido-reducción de compuestos aromáticos y polifenoles, etc.

La composición del vino es compleja. El número de compuestos identificados se ha incrementado enormemente gracias al desarrollo de nuevas tecnologías analíticas. Existen aproximadamente 500 compuestos conocidos presentes en el vino, de los cuales 160 son ésteres. La mayoría de sus componentes provienen de la uva y del proceso fermentativo.

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las pepitas; su concentración es baja en la pulpa, siendo la distribución de los polifenoles en un grano de uva negra de *Vitis vinífera* como Cabernet Sauvignon: un 10% en el jugo, 30% en la piel y 60% en las pepitas.

La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo. Los principales constituyentes fenólicos del vino con capacidad antioxidante son: derivados de ácidos fenólicos, ácidos cinámicos y tirosina; estilbenos, flavonoides y procianidinas.

Sin duda la capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido en polifenoles. El tipo de polifenoles

determina en último término su capacidad antioxidante y su concentración cambia según variedad, área de producción, técnicas agrarias, proceso de vinificación, vendimia, año, edad, etc. La contribución de cada compuesto en particular depende no sólo de su concentración y de su calidad antioxidante sino también de su interacción con otros componentes. Numerosos estudios *in vitro* demuestran el efecto protector del vino sobre la oxidación de las LDL, lo que podría explicar su efecto *in vivo*. Los estudios de ingestión aguda demuestran que la ingestión de vino tinto esta asociada a un aumento de la capacidad antioxidante del plasma. (Alberti-Fidanza et al., 2003).

1.4. ESTRÓGENOS

1.4.1 Biosíntesis

Los estrógenos son moléculas pertenecientes a la familia de las hormonas esteroideas, su precursor es el colesterol. A partir de éste y mediante una serie de reacciones enzimáticas en las que se rompen anillos y se hidroxilan carbonos se llega al estradiol.

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes en mujeres premenopáusicas. En varones y en mujeres postmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de deshidroepiandrosterona, secretada por la corteza suprarrenal. De este modo, la concentración de estrógenos está regulada en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos (Mendelson et al., 1987).

Las concentraciones de estradiol en plasma en el hombre son bajas, siendo variable en el caso de la mujer. En concreto, los niveles plasmáticos

aumentan en las niñas en la pubertad alcanzando valores de 30 pg/ml al llegar a las fases II y III de desarrollo mamario y niveles de tipo adulto que oscilan entre los 10 y 200 pg/ml al llegar la menarquía o poco después.

1.4.2 Propiedades químicas

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17β -estradiol (Figura 1.7), seguido de la estrona y el estriol. Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos (Wawrzak et al., 1988).

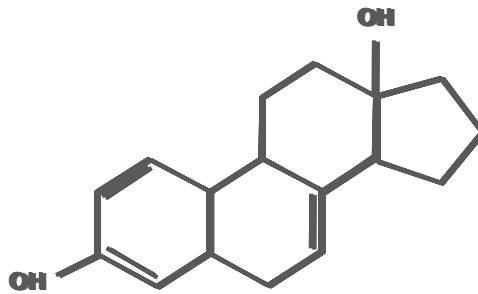


Figura 1.7 Estructura química del 17β -estradiol

1.4.3. Metabolismo del estradiol

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

oxidación reversible a estrona y una hidroxilación irreversible en C-2 y C-16.

Los metabolitos se conjugan con ácido sulfúrico o glucurónico y se excretan por orina o bilis. Los metabolitos biliares pueden sufrir más transformaciones metabólicas por acción de la flora intestinal siendo reabsorbidos en la circulación portal.

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

1.4.4. Acciones de los estrógenos.

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

Dada la relación con el trabajo únicamente hablaremos de algunos de los efectos de los estrógenos a nivel metabólico.

1.4.4.1. Efectos metabólicos de los estrógenos.

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

afectados.

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

1.4.4.2. Efectos de los estrógenos sobre los minerales

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

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

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

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

Así mismo, los estrógenos alteran la secreción de la hormona paratiroidea, y la deficiencia durante y después de la menopausia conduce a un volumen negativo de hueso.

La disminución en los niveles de estrógenos está vinculada a aumentar el riesgo de factores de pérdida de dientes. Se están realizando estudios para determinar el efecto que las dosis de estrógenos o de otras hormonas tienen sobre la preservación del hueso oral después de la menopausia.

Por todo ello, la terapia hormonal de reemplazo THR tiene una influencia positiva en la masa ósea del esqueleto en la mujer postmenopáusica.

1.4.4.3. Efectos de los estrógenos sobre los lípidos

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

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

La presencia de receptores de estrógenos en hígado sugiere que los

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

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

1.4.4.4. Efectos de los estrógenos sobre los carbohidratos

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

1.4.4.5. Efectos de los estrógenos sobre las proteínas

Los estrógenos tienen acciones sobre muchas proteínas plasmáticas, en particular, en aquellas que participan en la unión a hormonas y las cascadas de coagulación. En general, los estrógenos tienden a incrementar las cifras plasmáticas de globulina de unión a cortisol (CBG o transcortina), globulina de unión a tiroxina (TBG), y globulina de unión a esteroides sexuales (SSBG), que se unen tanto a andrógenos como a estrógenos. Se han efectuado muchos estudios bioquímicos y epidemiológicos acerca de los efectos de los estrógenos solos o en combinación con progestágenos sobre factores comprendidos en la coagulación.

1.4.5. Mecanismo de acción

Se cree que los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroides,

actúan principalmente por medio de regulación de la expresión de genes. Los receptores de estrógenos se encuentran en las vías reproductoras femeninas, mamas, la hipófisis, el hipotálamo, hueso, hígado y otros órganos, así como en diversos tejidos en varones.

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

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

1.4.5.1. Receptores estrogénicos

Los receptores estrogénicos (RE) juegan un papel central en el proceso de activación de la transcripción génica por los estrógenos (Osborne et al., 2001). Existen dos tipos de RE, alfa y beta, que se diferencian tanto en sus propiedades como en su distribución tisular (Gruber et al., 2002) (ver Figura 1.8). La estructura de ambos en cuanto a sus propiedades de reconocimiento de los estrógenos, unión al ADN y activación de la expresión génica permite suponer que actúan de manera similar ((Palmieri et al., 2002).

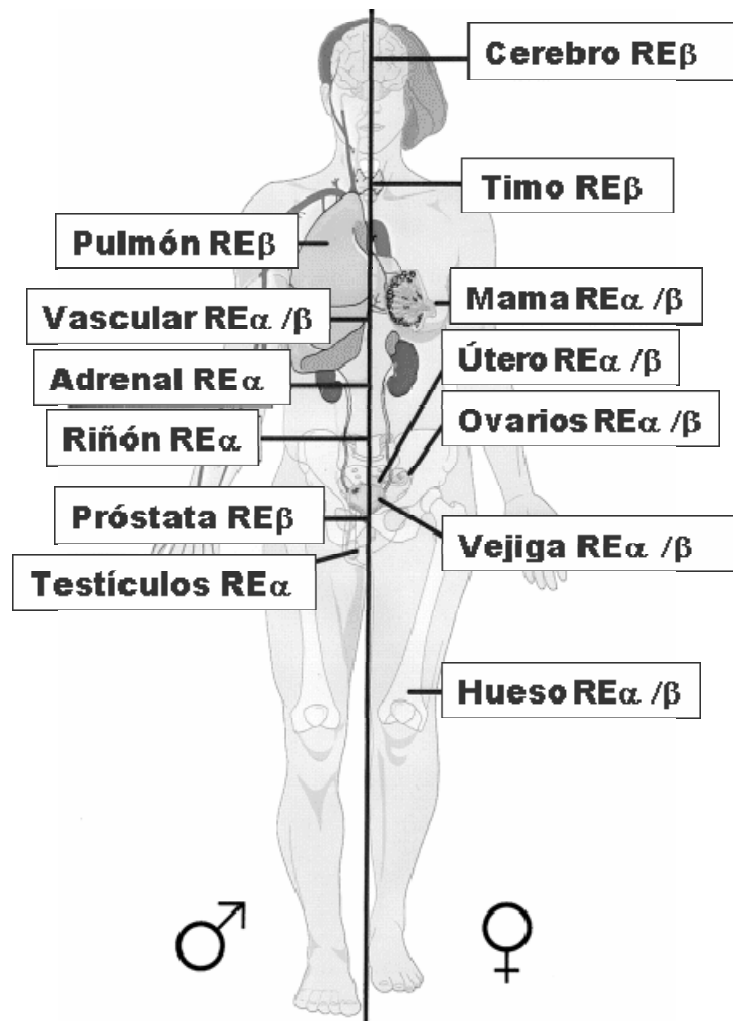


Figura 1.8 Distribución de receptores estrogénicos. (Setchell and Cassidy, 1999).

1.4.5.1.1. Receptores estrogénicos nucleares

El RE es una proteína monocatenaria, que en su estado nativo está unida a otras proteínas, como HSP90, que actúan como chaperonas y la mantienen en estado inactivo. La llegada del estradiol al dominio de unión a

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

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

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

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

Por otro lado, cabe destacar que aunque el receptor alfa y el receptor beta guarden homología en su dominio de unión al DNA, tienen diferencias importantes en el sitio de unión a la hormona. Esto hace que posean afinidad de unión diferente por los diversos compuestos esteroideos, por ejemplo, el receptor β tiene mayor afinidad por el dietilestilbestrol (DES) que por el 17β -estradiol y a su vez por un modulador de receptores de estrógenos como

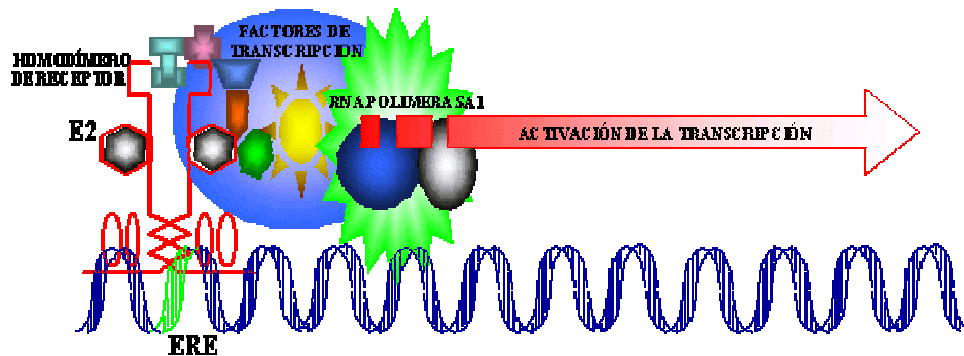


Figura 1.9 Activación génica por los dimeros de receptor de estrógenos.

es el tamoxifeno. El receptor β es más afín por el fitoestrógeno genisteína que por el tamoxifeno. Esto implica que de acuerdo a la distribución de los receptores en los tejidos, su acción será diferente (Kuiper et al., 1998).

Como hemos señalado anteriormente, los estrógenos ejercen

acciones a través de la unión con receptores localizados en el interior del núcleo. El efecto final de la unión de la hormona con el receptor es la transcripción de RNA mensajero y por lo tanto, la síntesis proteica. Hoy se sabe que entre estos dos extremos hay una serie de pasos intermedios que explican por qué un compuesto esteroideo puede tener diferentes acciones en diversos tejidos. Al unirse la hormona a su receptor se produce un cambio importante en la conformación espacial del mismo. A su vez, para que se logre la acción, deberá formarse un dímero de complejos hormona - receptor (ver Figura 1.9). Este dímero se une a un péptido llamado proteína adaptadora (represora o activadora) y todo este complejo se fijará al DNA para iniciar la transcripción. Si el esteroide que se ha unido al receptor es diferente, la conformación espacial que adquiera el complejo hormona - receptor será distinta y, por lo tanto, se unirá a otra proteína adaptadora; el resultado es que se fijará de manera diferente al DNA de modo que la acción biológica resultante no será la misma.

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

1.4.5.1.2. Receptores estrogénicos de membrana

Algunos de los efectos que ejercen los estrógenos sobre el aparato cardiovascular y sobre la activación del sistema nervioso son muy rápidos y

no pueden ser explicados por su acción a través de receptores nucleares. Se ha postulado que existe otra vía por la cual pueden actuar los estrógenos, la "no genómica"; en este caso la presencia de canales de calcio en la superficie celular medió el efecto de los estrógenos (Chaban et al., 2004; Lobaton et al., 2005).

El modo de acción "no-genómico" del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es pues un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario, por esta razón debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana. Entre estos efectos rápidos se encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas kinasas asociadas a la membrana, todos estos procesos ocurren en unos pocos segundos o minutos (Nemere and Farach-Carson, 1998) (Watson et al., 1999; Schmidt et al., 2000).

Este fenómeno de respuesta fisiológica rápida ante un esteroide fue descrito por primera vez en 1942 cuando el Dr. Hans Seyle observó en pacientes efectos anestésicos casi inmediatos después de la administración de progesterona. En 1967 Szego y Davis describieron por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos rápidos, "no-genómicos", al demostrar el aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) *in vivo*, pocos segundos después del tratamiento con estradiol (Szego and Davis, 1967). En 1977 Pietras y Szego demostraron la presencia de sitios específicos de unión a estrógeno en la superficie de células endometriales y más tarde lograron purificar receptores de estrógeno de membranas celulares provenientes de hepatocitos (Pietras and Szego, 1977; Pietras and Szego, 1979; Pietras and Szego, 1980). Sin embargo, a pesar que estos

efectos rápidos mediados por esteroides fueron descritos hace ya algún tiempo, la mayor atención en los últimos 30 años ha sido dedicada a estudiar los efectos genómicos mediados por estos receptores, parte de esto se debe al hecho de no haberse podido aislar hasta el momento y de esta manera caracterizar tanto estructural como funcionalmente estos receptores de membrana que median los efectos rápidos debidos a hormonas esteroideas.

Hasta el momento, utilizando diferentes procedimientos se ha demostrado la presencia de receptores estrogénicos de membrana (REm) en distintos tejidos y líneas celulares. En la bibliografía existen trabajos publicados, utilizando E2-BSA-FITC (17 β -estradiol acoplado a albúmina y a fluoresceína), un compuesto impermeable, incapaz de penetrar la membrana, que demuestran la presencia de receptores de membrana estrogénicos en una línea celular de adenocarcinoma de mama, MCF-7 (ver Figura 1.10) (Berthois et al., 1986; Marquez and Pietras, 2001).

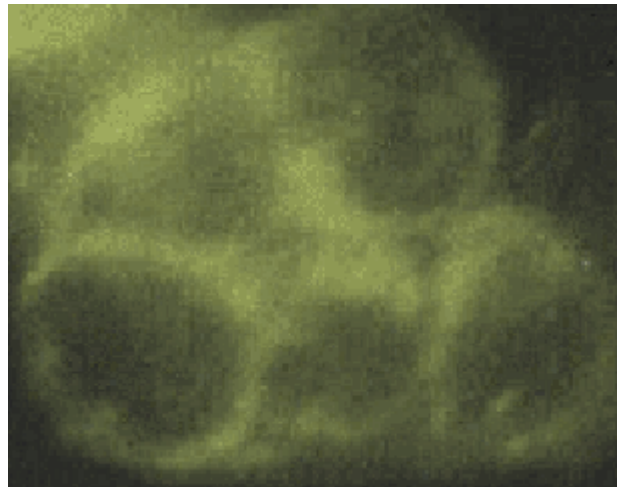


Figura 1.10 Receptor de estrógeno de membrana en células MCF-7

También, utilizando el mismo compuesto se demostró la presencia

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

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

Útero: La primera demostración de sitios específicos de unión a estrógeno fue hecha en células uterinas aisladas de rata en 1977 (Pietras and Szego, 1977). Entre las funciones principales del RE de membrana en el útero están la activación de una o más cascadas de señales que puedan facilitar la absorción de compuestos mediada por hormonas, y la posibilidad de que la unión de la hormona a la membrana represente una manera de transportar el E₂ en vesículas endocíticas hasta el núcleo para que ejerza su función nuclear (Pietras and Szego, 1984).

Estimulación en la producción de corrientes de Calcio y nucleótidos cíclicos: En células beta pancreáticas el E₂ puede estimular el incremento en Ca²⁺ intracelular inducido por glucosa y los niveles de GMP cíclico (cGMP), esto sucede pocos segundos después de estimular con E₂ y es un mecanismo que ocurre por asociación del RE con la guanilato ciclasa (GC) de la membrana celular. En monocitos, la producción de una corriente de Ca²⁺ después de estimular con E₂, induce la producción de óxido nítrico (NO). Ambos eventos ocurren en 40 segundos (Prevot et al., 1999). En células endoteliales el estrógeno o el compuesto impermeable a la membrana celular E₂-BSA (17 β -estradiol acoplado a albúmina) puede

estimular la producción de cGMP y NO y activar además kinasas celulares (Chen et al., 1999; Stefano et al., 2000). Aumentos en cAMP han sido descritos también en células de cáncer de mama, células uterinas y músculo liso (Aronica et al., 1994; Farhat et al., 1996).

Sistema Cardiovascular: Los mecanismos protectores de los estrógenos en el sistema cardiovascular son mediados por ambos receptores estrogénicos, tanto el nuclear como el de membrana (Mendelsohn and Karas, 1999) (Chen et al., 1999). E₂ tiene efectos rápidos que ayudan a preservar el flujo coronario, incluyendo la estimulación de la óxido nítrico sintetasa y la consecuente producción de NO y cGMP. E₂ además inhibe canales de Ca²⁺ en músculo liso vascular (Nakajima et al., 1995), reduciendo de esa manera la acción de ciertos vasoconstrictores que actúan a través de este mecanismo. Todo esto resulta en vasodilatación y mejor perfusión del corazón.

Sistema Óseo: La deficiencia de estrógeno está asociada a una pérdida de hueso significativa. Existe evidencia de la presencia de sitios de unión y efectos agudos a estrógeno en osteoblastos y osteoclastos, entre ellos están, aumentos de Ca²⁺ intracelular, inositol (Davis et al., 1994) (Mendelsohn and Karas, 1999), trifosfato y diacilglicerol, cAMP, cGMP, así como la activación de la Kinasa de Proteínas Activadora de Mitogénesis o MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Endoh et al., 1997; Nemere and Farach-Carson, 1998).

Sistema Nervioso Central: Utilizando diferentes modelos de isquemia cerebral tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado que el E₂ es capaz de preservar tanto las neuronas como el endotelio neurovascular, además de limitar la extensión de la lesión y disminuir la mortalidad (Simpkins et al., 1997). El uso de estrógeno después de la menopausia

resulta en mejoría de funciones cognitivas y en una reducción de la incidencia de enfermedad de Alzheimer. En pacientes con síndrome de Turner mejora funciones motoras. En las células de pituitaria GH3/B6, es capaz de estimular la secreción de prolactina a través de la inducción de potenciales de acción (Zyzek et al., 1981). Todos estos procesos antes mencionados son debidos a efectos rápidos, mediados por receptores de membrana capaces de activar cascadas de señales que si bien producen efectos que pueden ser medidos en pocos segundos o minutos, estos efectos rápidos muchas veces terminan en la activación de procesos “genómicos” y la inducción o inhibición de la expresión de ciertos genes.

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

La Figura 1.11 resume los efectos de los estrógenos sobre la mayoría de los tejidos sobre los que actúa.

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

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

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

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

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

La terapia hormonal persigue los siguientes objetivos:

- 1- Tratar los síntomas vasomotores.
- 2- Evitar o revertir la atrofia urogenital y de piel.
- 3- Tratar y prevenir los síntomas de la esfera psíquica atribuibles al hipoestrogenismo.
- 4- Mejorar la disfunción sexual .
- 5- Prevenir la pérdida acelerada de masa ósea, reducir el riesgo de fracturas y osteoporosis.
- 6- Disminuir la morbimortalidad cardiovascular (prevención primaria y secundaria).

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

Efectos Positivos del Estrógeno

Efectos Negativos del Estrógeno

En el Cerebro

- El estrógeno ayuda a mantener la temperatura corporal.
- El estrógeno puede retrasar la pérdida de la memoria.
- El estrógeno ayuda a regular las partes del cerebro que preparan el cuerpo para su desarrollo sexual y reproductivo.

En el Hueso

- El estrógeno ayuda a preservar la densidad del hueso.

En el Seno

- El estrógeno estimula el desarrollo de los senos en la pubertad y prepara las glándulas para la producción de leche en el futuro.

En el Corazón y el Hígado

- El estrógeno ayuda a regular la producción de colesterol del hígado, de este modo, disminuyendo la acumulación de placa en las arterias coronarias y rebajando el riesgo de un ataque cardíaco.

En el Ovario

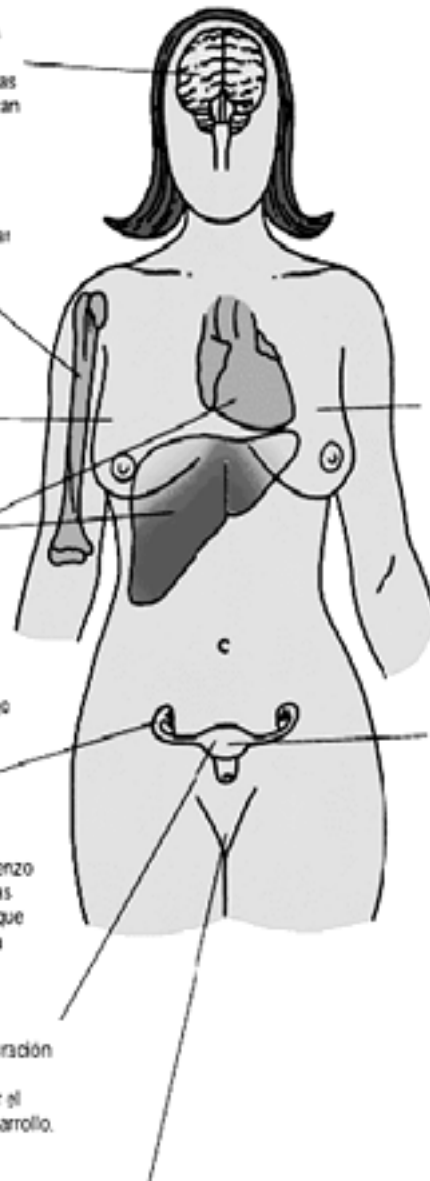
- El estrógeno estimula la maduración de los ovarios.
- El estrógeno estimula el comienzo de los ciclos menstruales de las mujeres - una indicación de que el sistema reproductivo de una niña a madurado.

En el Útero

- El estrógeno estimula la maduración del útero.
- El estrógeno ayuda a preparar el útero para nutrir el feto en desarrollo.

En la Vagina

- El estrógeno estimula la maduración de la vagina.
- El estrógeno ayuda a mantener el revestimiento de la vagina lubricado y grueso.



En el Seno

- Algunas investigaciones han indicado que la exposición prolongada al estrógeno puede aumentar el riesgo de una mujer del cáncer del seno.

En el Útero

- Algunas investigaciones han indicado que la exposición prolongada al estrógeno puede aumentar el riesgo de una mujer de cáncer uterino.

Figura 1.11.- Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos

Hemos señalado algunos de los efectos beneficiosos de los estrógenos a diferentes niveles. No obstante, como puede observarse en la Figura 1.11, los estrógenos también ejercen algunos efectos no deseables en el organismo.

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

Efectos sobre la coagulación: aumento de factores VII y X, aumento del fibrinógeno, disminución de la antitrombina III, y aumento de agregación plaquetaria, dichos fenómenos traerían un mayor aumento de la enfermedad trombo-embólica. Las pacientes con antecedentes de enfermedad trombo-embólica tendrían una contraindicación para uso de estrógenos, aunque existen estudios contradictorios al respecto.

Efecto sobre el sistema renina/angiotensina, los cuales causarían un discreto aumento de la hipertensión.

Efecto mineralocorticoide asociado con retención hídrica y aumento de peso. Al normalizarse el equilibrio hidrosalino se normaliza el peso ganado. Los estrógenos vuelven la mujer más activa y rápidamente el peso vuelve a lo normal.

Efecto oncogénico (riesgo de cáncer endometrial y cáncer de mama). En este sentido cabe destacar el estudio publicado en JAMA “Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial”, en el que concluyen que los riesgos de la terapia hormonal sustitutiva exceden a los beneficios de la misma en mujeres postmenopáusicas, si bien es de destacar, que la terapia hormonal sustitutiva suele incluir además de estrógenos, progesterona (Rossouw et al., 2002).

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

Hemorragias uterinas: es la más frecuente, aparece habitualmente en el período de descamación del tratamiento cíclico y más raramente durante el curso del mismo. La intensidad de la hemorragia disminuye al avanzar la edad y disminuye con el uso de la terapia continua.

Aumento en la frecuencia de la histerectomía: se ha calculado una frecuencia mayor de histerectomía en mujeres con terapia frente a mujeres postmenopáusicas sin terapia.

Colelitiasis: Estudios recientes no han demostrado aumento en incidencia de colelitiasis. Se ha dicho que los estrógenos se eliminan por la bilis, lo que unido a cierto grado de colestasis puede predisponer a litiasis.

1.4.7. Propiedades antioxidantes

Uno de los primeros trabajos que relaciona el estradiol directamente como una molécula con actividad antioxidante se publicó en 1994 (Ruiz-Larrea et al., 1993), los resultados mostraron una disminución, causada por el estradiol, de la lipoperoxidación en microsomas hepáticos de rata.

Sin embargo estudios aún anteriores a este, muestran diferentes actividades en enzimas relacionadas con el estrés oxidativo. Concretamente Pinto y Bartley vieron como las actividades de Glutation peroxidasa y Glutation reductasa eran distintas entre ratas de distinto sexo.

Además según Deroo et al. (Deroo et al., 2004) el estradiol regula la expresión de ciertas tioredoxinas, enzimas que juegan un importante papel en la protección contra el estrés oxidativo, en la regulación de la actividad de factores de transcripción y proliferación. Esta regulación fue mediada por receptores estrogénicos alfa.

Además en determinados órganos, como el cerebro, se ha comprobado la protección de los estrógenos frente a daños causados por el estrés oxidativo (Behl et al., 1997). La siguiente tabla muestra algunas de las publicaciones más relevantes en este tema.

Efecto del 17β-estradiol	Referencia
Efecto favorable sobre la lipoperoxidacion en microsomas de higado de ratas.	Ruiz-Larrea MB et. al. 1994.
Aumento de la actividad de la glutatation peroxidasa en eritrocitos.	Massafra C et. al. 1996 (Gyneco Endocrinol)
Efecto antioxidante in vino e in Vitro	Ayres S, el. al. 1996. (J Lab Clin Med)
Proteccion neuronal	Dulzen, et al 1996 (Brain research)
Proteccion frente a la oxidación de las LDL	Shwaery GT et. al. 1997(Ciculation)
Regulación de tioreduxinas	Deroo BJ et. al. 2004(Endocrinology)

Tabla 1.5 Efecto antioxidante del Estradiol

1.4.8. Estrógenos y MAPquinasas

Esta descrito en la bibliografía que los estrógenos son capaces de activar la via de señalización de las MAPquinasas por medio de receptores de membrana, que han sido descritos anteriormente (ver Figura 1.12).

Las MAPquinasas constituyen una familia de proteínas enzimáticas, que forman una red integrada, con el fin de controlar funciones como diferenciación, proliferación y muerte celular (Kyriakis and Avruch, 2001). La transmisión de señales tiene lugar mediante fosforilación y desfosforilación en los aminoácidos de serina y treonina. El hecho de presentar una doble fosforilación implica la presencia de una enzima en la transmisión de la señal. Estas enzimas se conocen como MAPquinasas quinasas (MAPKK o MEK)

Las MAPquinasas son las más antiguas y mejor conservadas vías de señalización y son cruciales en la respuesta inmune. Son una familia de

enzimas que forman una red integrada para llevar a cabo funciones celulares de control de diferenciación, proliferación y muerte celular. Estas proteínas citoplasmáticas pueden modular las actividades de otras proteínas intracelulares por medio de la adición de grupos fosfato a sus aminoácidos de serina y treonina. Hasta el día de hoy, se han identificado más de 20 isoformas de MAPquinasas. La activación de las enzimas MAPquinasas por ellas mismas es inusual puesto que requieren de la fosforilación de ambos residuos de treonina y tirosina y por tanto requieren de la actividad de quinasas específicas duales conocidas como MAPquinasas quinasas (MAPKK o MEK). El potencial fosforilador de las demás familias de quinasas de mamífero se restringe bien a fosforilar residuos de serina/treonina o a fosforilar residuos de tirosina.

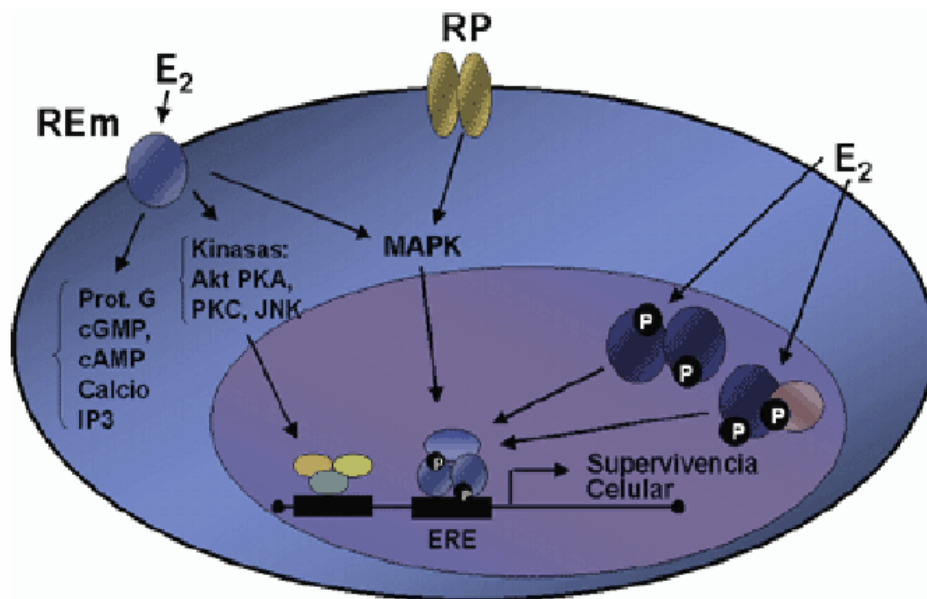


Figura 1.12 Efectos “no genómicos” del receptor de estrógeno de membrana.

La especificidad de la fosforilación que realizan las MAPquinasas quininas es dependiente del motivo de la proteína que fosforilan. Todas ellas fosforilan residuos Thr-Xxx-Tyr, pero el aminoácido que se encuentra en la posición X es el que confiere la especificidad, de forma que según sea un aminoácido o sea otro, será susceptible de ser sustrato de determinada MAPquinasas quininas o no. Por tanto, la activación de las MAPquinasas quininas tendrán implicaciones específicas al reconocer y fosforilar motivos específicos.

Por otro lado, las MAPquinasas quininas para ser activas han de ser fosforiladas por otras enzimas que controlan su actividad y que se denominan MAPquinasas quininas quininas (MAPKKK o MEKK), una familia de proteínas entre las que se encuentra el protooncogen c-RAF como miembro más prominente. El control de esta familia de enzimas y su especificidad con el sustrato es en la actualidad parcialmente desconocido.

Cuando las MAPquinasas se activan, los factores transcripcionales presentes en el citoplasma o en el núcleo son fosforilados y activados, produciendo la expresión de ciertos genes diana provocando una respuesta celular. Las interacciones múltiples entre las diferentes cascadas de MAPquinasas sirven para integrar y moderar respuestas celulares. De hecho, se ha demostrado que las MAPquinasas comparten especificidad de sustratos y fosforilación de sitios de regulación con múltiples protein quininas (Lewis and Schwartz, 1998);(Fukunaga and Hunter, 1997; Waskiewicz et al., 1997)

Se distinguen tres grandes grupos de cascadas reguladoras de MAPquinasas en humanos que conducen a modificar la expresión génica. Estas tres familias son la familia de ERK 1/2, la familia de JNK y la de p38.

1.4.8.1. Familia de MAPquinasas ERK 1/2

La familia de ERK 1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares) fue la primera en ser caracterizada, siendo un mediador vital de un número importante de transformaciones celulares que incluyen el crecimiento, la proliferación y la supervivencia. Hay dos isoformas de ERK que se expresan ubicuamente, y son ERK 1 y ERK 2. En ocasiones se las denomina MAPquinasas p42/p44 (Tanner and Mueckler, 1993). En esta cascada, MEK 1 y MEK 2 son las enzimas que fosforilan en un nivel superior a ERK 1 y ERK 2, actuando como MAPKK, y la proteína RAF actúa como MAPKKK. La duración de la activación de ERK 1/2 es debida a dos mecanismos: a la eliminación de uno o de los dos grupos fosfato que se encuentran en los residuos tirosina o serina/treonina o a la acción de fosfatasas, que depende de la localización intracelular puesto que ERK no solo fosforila en el núcleo sino también en la membrana y en el citoplasma (Todd et al., 1999). Experimentos con ratones knockout han puesto en evidencia la importancia de esta familia de MAPquinasas (Pearson et al., 2001). La alteración de una de las tres proteínas Raf resulta fatal para los ratones, y si la diana es MEK 1, se observa muerte embrionaria con signos de necrosis tisular. El papel que desempeña ERK 1/2 es por el contrario bastante desconocido hasta la fecha, pero se sabe que regula la activación de la familia de la proteína activadora 1 (AP-1). Miembros de esta familia que son fosforilados por ERK 1/2 incluyen a c-Jun, c-Fos, y el factor de activación de la transcripción 2 (ATF-2), pero la relevancia *in vivo* de esta fosforilación no está clara aún (Gupta et al., 1995). Elk-1, que activa c-Fos, es otra proteína que es fosforilada por ERK 1/2.

Aunque primeramente se pensó que el papel de ERK 1/2 se

restringía al crecimiento celular y a la proliferación, parece claro que muchos procesos inflamatorios están relacionados con la activación de ERK 1/2. Ratones deficientes en ERK 1 son normales y fértiles pero muestran una maduración deficitaria en timocitos y tienen reducida la expresión de las cadenas α y β del receptor celular T, indicando que la activación de ERK es crucial para la activación de células T y se ha descrito que se produce a través de la familia de AP-1.

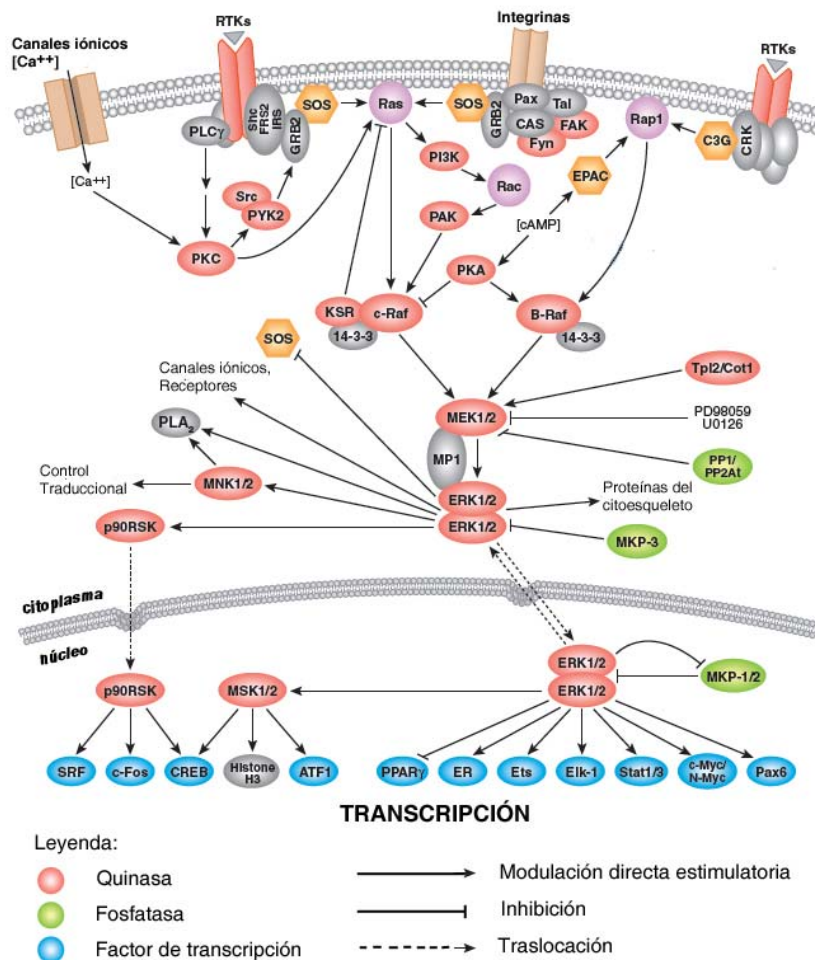


Figura 1.13 Vía de señalización de ERK.

1.4.9. SERMs-Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógeno

En el tratamiento de los síntomas asociados con la menopausia se han utilizado medicinas que contienen estrógenos desde hace más de 50 años. Actualmente, es sorprendente que a pesar de los beneficios que ofrece la terapia hormonal sustitutiva, es relativamente bajo el número de mujeres que inicia esta terapia y la que la inicia, usualmente no permanece en ella por más de un año, esto es en gran parte debido a que los estrógenos incrementan significativamente el riesgo a desarrollar cáncer de mama y útero. En consecuencia, nació la necesidad de crear drogas que conserven la función beneficiosa del estrógeno en los sistemas cardiovascular, nervioso y hueso, pero sin la función negativa que ejercen sobre la mama y útero, a estos compuestos se les llamó SERMS (Selective Estrogen Receptor Modulators) o moduladores selectivos de los receptores de estrógeno. El entendimiento de las bases moleculares del funcionamiento de los receptores esteroideos, en este caso del receptor de estrógeno, fue lo que permitió el desarrollo de este concepto. Desdichadamente no se ha encontrado el SERM ideal, pero algunos están siendo utilizados actualmente para el tratamiento de distintas patologías tales como el cáncer de mama y la osteoporosis.

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

El tamoxifeno, al igual que la mayoría de los SERMs, ejerce su acción primariamente al competir con el estradiol en la unión al RE y alterar su conformación (ver Figura 1.14). *In vitro*, causa estancamiento de células de cáncer de mama que expresan RE, en la fase G1 del ciclo celular (Sutherland y cols., 1983) y disminuye los niveles de la ciclina D1 (Watts et al., 1994). También, disminuye la expresión del factor de crecimiento tumoral alfa (TGF- α) y aumenta la expresión de TGF- α 1 y TGF- α 2 (Salomon et al., 1999). En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, el tamoxifeno inhibe la fosforilación del receptor de crecimiento del factor semejante a la insulina (Insuline-like growth factor receptor) IGF-I (Guvakova and Surmacz, 1997), pero en una línea celular endometrial (Ishikawa) produce el efecto contrario, es decir, induce la fosforilación del receptor, actuando de manera similar al estrógeno (Kleinman et al., 1996). *In vivo*, inhibe el crecimiento de tumores de células MCF-7 implantados en ratones y previene el desarrollo de tumores mamarios en los modelos de ratones NMU y DMBA (Gottardis and Jordan, 1987; Jordan et al., 1987). Similar al estradiol, en el útero, estimula la síntesis de IGF-I y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Huynh et al., 1993; Hyder et al., 1996).

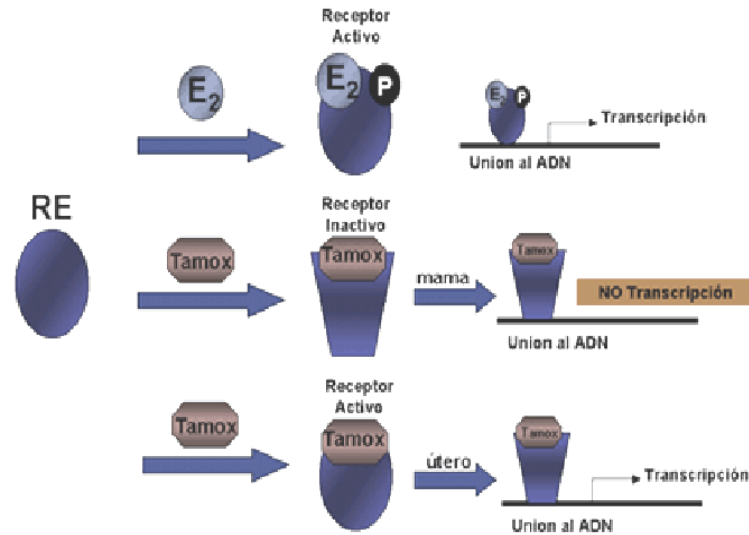


Figura 1.14 Mecanismo de acción del Tamoxifeno

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

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

Entre los efectos secundarios del tamoxifeno al que mayor importancia se le ha dado es el aumento en la incidencia de cáncer endometrial, debido al efecto agonista, tipo estrógeno que tiene el tamoxifeno en el útero (Fisher et al., 1999). Otros efectos son los sofocos, pólipos endometriales, quistes, procesos tromboembólicos, etc. A pesar de

los efectos secundarios de esta droga, entre ellos el más importante ha sido el del riesgo a desarrollar cáncer de útero, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (perteneciente a la OMS) recomendó que las mujeres recibiendo tamoxifeno no deben parar su tratamiento por este efecto secundario, ya que los beneficios en la sobrevida que esta droga ofrece son mucho mayores al riesgo a desarrollar cáncer de endometrio.

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

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

Fitoestrógenos: son compuestos de origen vegetal con actividad estrogénica. Debido a su inocuidad hoy en día es aconsejable el tratamiento sustitutivo en la menopausia. En el siguiente capítulo se detallará más concretamente esta familia de moléculas.

1.4.10. Conclusiones

Los estrógenos juegan un papel central en la fisiología del organismo. El modelo clásico o “genómico” de acción del RE sugiere que el receptor al unir la hormona es capaz de activar la transcripción de genes que participan en el control del crecimiento y proliferación celular. Dos receptores de estrógeno que cumplen esta función han sido identificados, el RE α y el RE β , en conjunto con una serie de proteínas activadoras y represoras. Además han sido descritos efectos rápidos mediados por esteroides, que estimulan señales intracelulares. Estos efectos “no genómicos” son mediados por receptores de membrana, sin embargo la identidad de estos receptores no ha sido descrita aún. La existencia de los receptores tanto nucleares como de membrana al mismo tiempo, es común en diversos tipos celulares y muy probablemente estas dos vías de señalización convergen para ejercer el control de distintos procesos celulares. El entendimiento de la fisiología tan compleja del RE a nivel molecular y el rol que cumple en distintas patologías lo hace una herramienta farmacológica invaluable. Esto ha hecho que las opciones terapéuticas que repercuten en la obtención de mejor salud para la mujer hayan evolucionado dramáticamente en los últimos 30 años. El conocimiento detallado del RE desde el punto de vista de su estructura, subtipos, distribución e interacción con otras proteínas que determinan su función va a permitir el desarrollo de nuevos SERMs que puedan tener el efecto deseado en un tejido determinado y con muy poco o ningún efecto secundario. Algún día, en un futuro no muy lejano, muy probablemente la paciente y su médico tendrán a su alcance la posibilidad de elegir cuál es el compuesto más adecuado para tratar y/o prevenir una o varias patologías sin tener que sufrir las consecuencias o riesgos de efectos no deseados.

1.5. FITOESTRÓGENOS

1.5.1 Generalidades

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de las plantas que poseen una débil actividad estrogénica, debido a su estructura molecular, ver figura 1.15. Comprenden 4 grupos químicos: lignanos, isoflavonas, cumestanos y lactonas del ácido resorcílico, siendo el grupo más estudiado las isoflavonas, principalmente las derivadas de la soja como son: Genisteína y Daidzeína.

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el alto contenido de soja en la dieta está asociado a una menor incidencia de ciertas patologías, como son la enfermedad cardiovascular, algunos cánceres hormonodependientes, como el de mama, endometrio, próstata y colon, la sintomatología climatérica, la osteoporosis, y las alteraciones del ciclo menstrual (Cassidy, 2003; Cassidy et al., 2006; Messina et al., 2006; Reinwald and Weaver, 2006; Sacks et al., 2006)

Dado que estos compuestos exhiben una acción agonista o antagonista estrogénica que es tejido-específica, han sido agrupados dentro de los SERMs. También se ha postulado como responsable de su acción agonista estrogénica, su unión específica al receptor estrogénico β , además de la activación de otro tipo receptores que estarían vinculados con su potencial anticancerígeno.

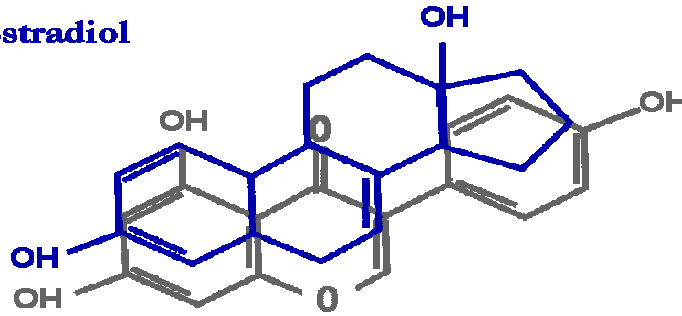
Numerosos estudios han demostrado su potencial para disminuir los sofocos, mejorar los parámetros de riesgo cardiovascular, prevenir la pérdida mineral ósea asociada a la menopausia, y mejorar la atrofia genitourinaria posmenopáusica (Cassidy, Albertazzi et al., 2006). Por otra parte, varios estudios han encontrado que estas moléculas inhiben ciertas

enzimas implicadas en la diferenciación y crecimiento tumoral, así como bloquean la proliferación *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama (Adlercreutz, 2002).

1.5.2 Fitoestrógenos como antioxidantes

Además cabe destacar que la soja y algunos de sus componentes presentan actividad antioxidante. Por ejemplo el consumo de soja y de algunos de sus derivados como la leche de soja produjo efectos favorables frente al daño oxidativo. Kanazawa comprobó como los individuos que habían consumido soja presentaban menores niveles de LDL oxidadas en sangre que los que no consumieron (Kanazawa et al., 1995). Un estudio realizado por Mitchell y colaboradores determinó un menor daño oxidativo al DNA en personas sanas que consumieron leche de soja durante 4 semanas (Mitchell et al., 2000).

En lo que respecta a moléculas concretas de la soja se han determinado acciones antioxidantes directas de moléculas como equol, enterolactona y genisteína. Esta última es además una de las moléculas más estudiadas de la soja, a la que se le atribuye múltiples propiedades, entre ellas algunas antioxidantes como: responsable de la disminución de los niveles de anión superóxido y de LDL oxidadas (Patel et al., 2001; Wilson et al., 2002).

17 β -Estradiol**Genisteína**Figura 1.15 Similitud entre las estructuras del 17 β -estradiol y la genisteína.

La Tabla 1.6 resume algunas de las acciones antioxidantes mencionadas anteriormente y las referencias bibliográficas donde pueden encontrarse.

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

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

Tabla 1.6 Resumen de algunas acciones antioxidantes de los fitoestrógenos existentes en la bibliografía.

1.6. LA MITOCONDRIA Y COMPUESTOS ESTROGÉNICOS

1.6.1. La mitocondria: estructura y función

Las mitocondrias son orgánulos celulares de forma ovalada, con una longitud de unas 2 μm y un diámetro de 0,5 μm , el tamaño aproximado de una bacteria.

Estudios de microscopía electrónica revelan la existencia de dos membranas, una externa y una interna muy extensa y con numerosos pliegues, llamados crestas. Por lo tanto existen dos compartimentos: (1) el espacio intermembranal, situado entre la membrana externa e interna y (2) la matriz que está rodeado de la membrana interna ver figura 1.16

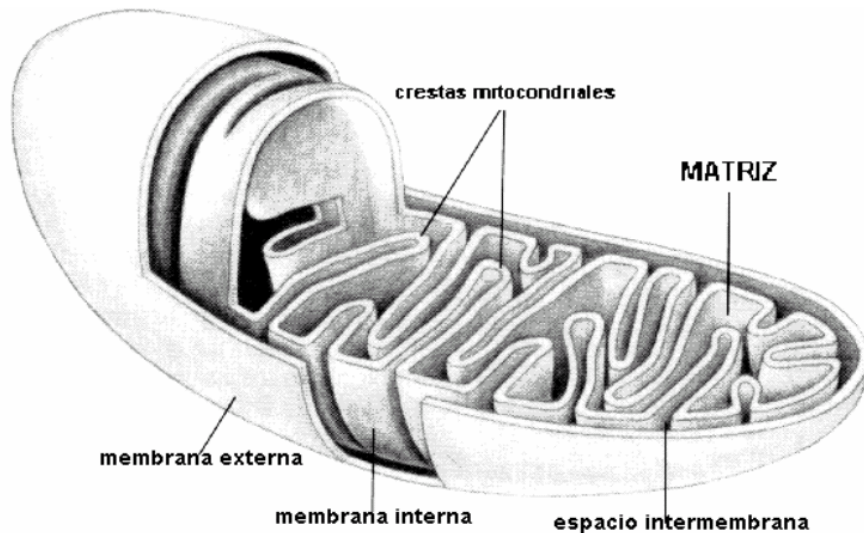


Figura 1.16 Estructura básica de las mitocondrias

En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial, los ribosomas y numerosos complejos enzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas, como para la expresión y la replicación

de genes. En concreto el genoma mitocondrial humano contiene 16.569 pares de bases (pb) y codifica 13 proteínas de la cadena respiratoria así como los RNAs ribosómicos grande y pequeño y suficientes tRNAs como para traducir todos los codones. Sin embargo las mitocondrias también contienen muchas proteínas codificadas por el DNA nuclear.

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

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

A pesar de la existencia de estos compartimentos, que a primera vista parecen estancos, la estructura mitocondrial permite el paso regulado de proteínas mediante procesos controlados por unos complejos proteicos

transmembranales –TIM (del inglés, translocase of the inner membrane) en la membrana interna y TOM (del inglés, translocase of the outer membrane) en la externa– que son capaces de discriminar entre aquellas proteínas que deben dirigirse a la matriz y las que lo harán hasta el espacio intermembranal; en este proceso intervienen algunos miembros de la familia de las chaperonas que se inducen por calor (HSP, del inglés heat shock proteins), como la HSP 70 y la HSP 60 (Hood et al., 2003).

Existen zonas de contacto entre las membranas mitocondriales, las denominadas ‘zonas densas’, cuyos componentes proteicos son capaces de interaccionar y dar lugar a la formación de un canal, el PPTM (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial), del que también forman parte proteínas del citoplasma y de la matriz mitocondrial.

1.6.1.1. Funciones

Entre las funciones que se realizan en la mitocondria cabe destacar, según la relación con el tema, la fosforilación oxidativa. La cual tiene lugar en la cadena de transporte electrónico, que es llevada a cabo por un complejo enzimático en el que se genera poder reductor en forma de NADH y FADH_2^- , que se utiliza en la cadena respiratoria. Acoplado al transporte de los electrones por diferentes niveles redox, y gracias a la energía liberada, tiene lugar la salida de tres protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal, lo que origina un gradiente electroquímico entre los dos compartimentos; ello se traduce en una diferencia de pH de una unidad y en una diferencia de potencial eléctrico de 140 mV, lo que supone un incremento de energía libre (ΔG) de aproximadamente -5 Kcal. Esta energía la utiliza la ATP sintasa (complejo V), localizada en la membrana interna, para fosforilar moléculas de ADP, dando lugar a ATP, a

la vez que los protones vuelven a la matriz a favor de gradiente. El funcionamiento correcto de este complejo enzimático es esencial para la vida de la célula, de forma que cualquier alteración en las enzimas que lo componen se puede traducir en enfermedades degenerativas. Son muchos los inhibidores que se conocen de los distintos componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEM), los cuales se utilizan en estudios sobre su funcionamiento.

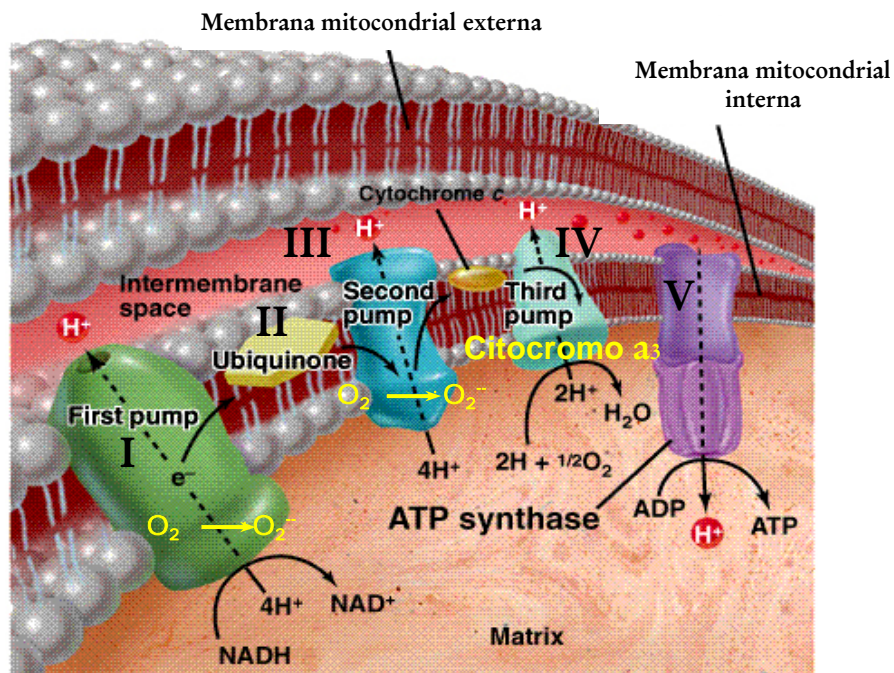


Figura 1.17 Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

1.6.1.2 Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales.

Se calcula que entre el 2 y el 5 % de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas y cols., 1977; Frei y cols., 1994). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

El citocromo a₃ del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O₂ y con ello la formación de H₂O (Benzi and Moretti, 1995). Por tanto, la citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O₂, pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi and Moretti, 1995). Así pues, se produce $\bullet\text{O}_2^-$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris, Oshino et al., 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen, 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris, Oshino et al., 1972).

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

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

Utilizando mitocondrias aisladas se puede determinar experimentalmente el consumo de oxígeno por la mitocondria, fenómeno denominado Control Respiratorio (Ver Figura 1.18). En ausencia de sustrato o de ADP, el consumo de oxígeno causado por la oxidación de sustratos endógenos es bajo. Este estado respiratorio se define como estado 1. Añadiendo un sustrato oxidable, como glutamato o malato, este consumo aumenta levemente (estado 2).

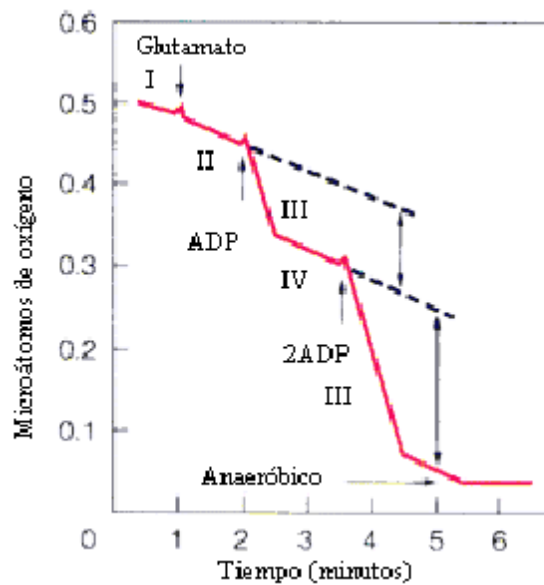


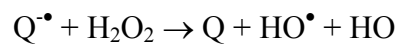
Figura 1.18 Control respiratorio mitocondrial.

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

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

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir O₂^{-•} por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas et al., 1977). Sin embargo,

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



1.6.1.1.1. Otras acciones de las mitocondrias

Se sabe que la mitocondria desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis (Nilsen et al., 2006) modulando la homeostasia del calcio intracelular, por ejemplo, además de ser la central metabólica para la vía de los ácidos grasos, ciclo de los ácidos tricarbónicos y la urea, biosíntesis de aminoácidos, purinas, esteroides, etc.

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

1.6.1.1.2 Acción de los estrógenos sobre las mitocondrias

Como hemos visto en capítulo 4 el estradiol desencadena numerosos efectos, mediados tanto por receptores estrogénicos genómicos como de membrana (Nilsen, Chen et al., 2006). Además de estos efectos ya conocidos, hoy en día existen numerosas líneas de investigación que presentan a la mitocondria como una nueva diana para los estrógenos, regulando factores como la apoptosis y crecimiento, entre otros (Nilsen, Chen et al., 2006). Se ha visto cómo en ratas ovacteriomizadas la estructura y función de las mitocondrias del corazón se encontraba alterada, siendo revertido el efecto por la adición de estrógenos y fitoestrógenos (Zhai et al., 2000; Zhai et al., 2001). Estos hechos sugieren que el estradiol y sus receptores están directamente implicados en la conservación y regulación de la estructura de la mitocondria y de la cadena de transporte mitocondrial.

1.6.1.1.2 Localización de receptores estrogénicos en la mitocondrial

Recientes estudios demuestran la existencia de la unión de estrógenos a proteínas mitocondriales (Chen et al., 2004). Moats y Ramirez investigando la estereoespecificidad de unión de estrógenos en úteros de ratas, mediante fraccionamientos celulares, comprobaron que la fracción subcelular de las mitocondrias contenía estrógenos unidos (Moats and Ramirez, 2000).

Además Grossman (Grossman and Traish, 1992) corroboró los mismos resultados, encontrando la presencia de proteínas unidas a estrógenos (BEPs) dentro de las mitocondrias de células acinares pancreáticas y vieron cómo un anticuerpo anti-BPS reaccionó específicamente con una doble banda de proteínas de 66 y 64 KD, similar a

los receptores estrogénicos alfa y beta. Ese parecido entre los receptores estrogénicos y las BEPs sugieren la existencia en la mitocondria de unas proteínas que se comportarían como los clásicos receptores estrogénicos.

Otra demostración de la presencia de receptores estrogénicos en la mitocondria fue realizada por Chen et al. Mediante técnicas de fraccionamiento subcelular y western blott demostraron la presencia de éstos y mediante inmunohistoquímica y microscopia confocal localizaron los receptores en la matriz mitocondrial (Chen, Eshete et al., 2004).

Además se ha demostrado la existencia en otros tipos celulares, como en neuronas, células murinas del hipocampo y en células de corazón humano, confirmando que se encuentran entre 50 y 65 kD de peso molecular (Yang et al., 2004).

Hasta la fecha no se conocen efectos directos del E₂ sobre la estructura y función de las mitocondrias, sin embargo si que hay evidencias que sugieren que el estradiol actúa de forma directa sobre las mitocondrias.

Estudios en ratones knock-out del REbeta muestran disfunciones en los canales de iones K⁺ voltaje dependientes de Ca²⁺ y anomalías en la contracción vascular (Korte et al., 2005). Existen asimismo evidencias en las que se relaciona efectos sobre la cadena de transporte mitocondrial (Chen et al., 2005).

Según los datos existentes en la bibliografía podemos concluir que existen unas proteínas presentes en las mitocondrias con capacidad de unirse específicamente a compuestos estrogénicos. Éstas tendrían acciones directas y rápidas sobre funciones mitocondriales.

1.7. LA MOSCA *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO

La mosca *Drosophila melanogaster*, que hoy en día es el modelo por excelencia para el estudio de la genética del desarrollo principalmente, se emplea desde hace muchos años para estudios de longevidad. Se está comprobando además que se pueden extrapolar los resultados obtenidos en ellas a sistemas superiores como los mamíferos.

En el año 2000 se produjo un importante avance con la publicación de la secuencia completa del genoma, que podemos encontrar en bases de datos específicas para este animal como en <http://flybase.bio.indiana.edu>, entre otras.

Las principales ventajas como organismo modelo se centran en su fácil manejo, debido a sus reducidas dimensiones, su abundante descendencia y su relativo corto período de vida.

1.7.1 Ciclo vital

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, es decir, presenta unas etapas larvarias y una etapa adulta separadas por una etapa pupal, durante la cual tiene lugar una metamorfosis completa (Figura 1.19). El ciclo vital de *Drosophila* dura unos 10 días a 25°C. El huevo de *Drosophila* se forma durante un período de aproximadamente 3 días y medio. Una vez fecundado, la madre lo deposita en el exterior, iniciándose la embriogénesis. Después de unas 24 horas, el embrión eclosiona dando lugar a una larva de vida libre que pasará por 3 etapas larvarias (LI, LII y LIII). A los 5 días la larva entra en pupación y se inicia la metamorfosis,

eclosionando aproximadamente 5 días después. A las pocas horas de vida, la mosca adulta es fértil y se inicia de nuevo el ciclo vital.

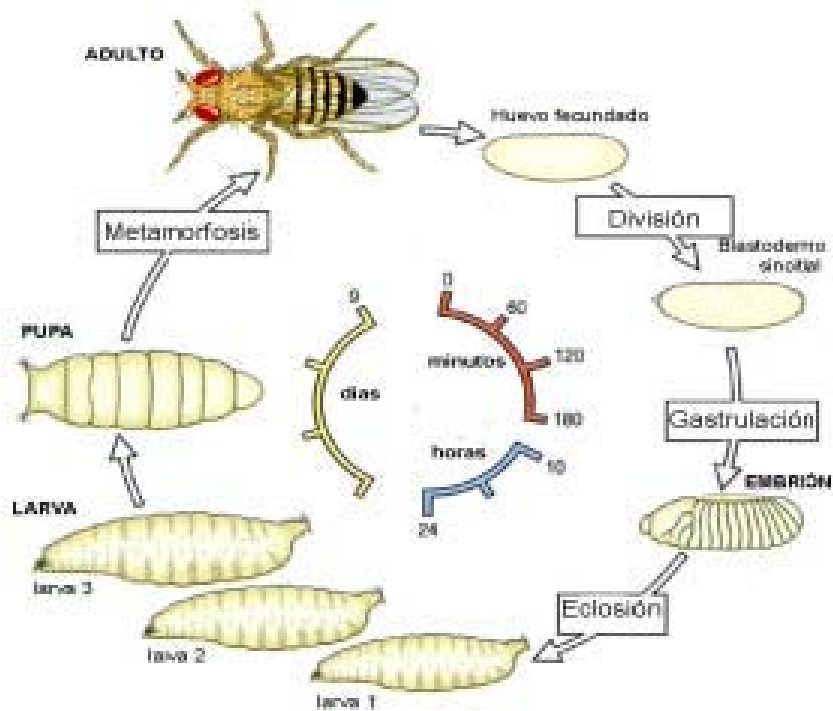


Figura 1.19 Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*

Una vez obtenida la progenie, se pueden separar los machos de las hembras e iniciar una curva de supervivencia.

1.7.2. Curvas de supervivencia

Entre los animales que se usan para estudios de longevidad en investigación podemos encontrar, de menor a mayor complejidad biológica: levaduras, gusanos (*Caenorhabditis elegans*), moscas (*Drosophila melanogaster*), ratones, ratas, primates. Cada uno de estos individuos presenta unas ventajas y desventajas para este tipo de estudios.

Por ejemplo, si comparamos los dos extremos de la lista podemos ver lo siguiente. Un estudio de longevidad en levaduras puede dar resultados en cuestión de pocas semanas, aunque la relevancia biológica aplicada a los humanos en principio es muy baja. En el otro extremo, un estudio de supervivencia en primates tiene una relevancia para la aplicación en humanos muy alta, no obstante el tiempo que se tarda en obtener resultados es también muy alto, de modo que durante el periodo experimental la probabilidad de que un suceso externo afecte al experimento, como por ejemplo una infección, es grande; lo que podría enmascarar los resultados.

Las ventajas de los estudios de longevidad en moscas *Drosophila melanogaster* son: por una parte la duración del experimento, ya que alrededor de tres-cuatro meses puedes obtener resultados. Puedes usar un número alto de individuos para hacer las curvas, por ejemplo, se pueden realizar poblaciones de 1000 moscas sin ningún problema y estar bien controladas. La homología genética de la mosca en comparación con los humanos es de aproximadamente un 70 %. Un hecho evidente es que no es un mamífero, pero las ventajas y la homología genética hacen que las posibles extrapolaciones a sistemas superiores no sean tan remotas.

1.8. ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD

El término envejecimiento hace referencia a los procesos post-madurativos que conducen a una disminución de la eficacia de la homeostasia y a un incremento en la vulnerabilidad del organismo. No puede ser considerado propiamente como una enfermedad por lo que hay

que distinguirlo de la muerte en edad avanzada, causada por enfermedades tales como aquéllas de tipo cardiovascular, cáncer, etc.

Hasta el momento no existe una definición única ampliamente aceptada para este término. Harman (Harman, 2001), lo define como la acumulación progresiva de cambios con el tiempo, que provocan el aumento de probabilidad de enfermedad y muerte del individuo. Además, según Strehler (Strehler, 1985) este proceso debe de ser, universal, intrínseco, progresivo, y deletéreo. Ya que debe afectar en la misma medida a todos los individuos de una misma especie, siendo el causante el propio organismo, teniendo lugar de forma paulatina durante el tiempo y finalmente desencadenando en daños irreversibles que conducen a la muerte.

No cabe duda de que la alteración de la homeostasia en el organismo envejecido es una consecuencia genética. Ésta determina la respuesta del individuo frente a las influencias exógenas, conduciendo a una mayor predisposición frente a patologías y finalmente la muerte (Ginaldi et al., 2000) determinando así la longevidad del individuo.

Un estudio llevado a cabo en los países Escandinavos, en el cual se determinó la longevidad en gemelos, ha demostrado que la base genética es el causante de la diferencia de longevidad entre individuos (Begun et al., 2000).

1.8.1 Longevidad

Dentro del término “longevidad” se incluyen 2 conceptos diferentes: longevidad máxima y longevidad media. La longevidad media se define como la media de la esperanza de vida al nacer de los individuos de una determinada especie (Lopez-Torres et al., 1991). Y la longevidad máxima es

la edad máxima que un individuo de una determinada especie puede alcanzar.

De este modo, sabemos que la longevidad media de la especie humana ha aumentado considerablemente a lo largo de la Historia. Esto ha tenido lugar debido al descenso de la mortalidad infantil y de las madres, al descubrimiento de los antibióticos, de las vacunas y en general a la mejora del control de las enfermedades infecciosas, así como a una nutrición más elaborada, mejores condiciones higiénicas y mejora en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes, etc.

Sin embargo, no se ha demostrado que exista un aumento en la longevidad máxima. En la antigüedad también había personas que alcanzaban edades avanzadas de 80-90 años o más, aunque el porcentaje era mucho más bajo que en nuestros días. El aumento en longevidad media ha producido un crecimiento del segmento poblacional entre los 60 y 100 años. Por ello, cobran gran importancia enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, los cánceres, la aterosclerosis y en general, todas aquellas que afectan con más probabilidad a este grupo de edad avanzada.

Los avances en investigación acerca de la longevidad han tenido idénticos resultados, es decir, se ha conseguido aumentar la longevidad media en varias líneas de investigación, pero son pocos los avances en el aumento de la longevidad máxima. La longevidad media ha podido modificarse mediante antioxidantes dietéticos, nivel de actividad, etc. pero la única terapia que parece concluyente para aumentar la longevidad máxima es la restricción calórica. Ya en 1934 McCay y colaboradores (revisado en (Swan, 1997) describen este fenómeno y más recientemente Walford y Weindruch (Walford et al., 1995; Weindruch, 1996) descubren

que se puede aumentar la longevidad máxima con una restricción calórica que no necesariamente debe darse desde el nacimiento, sino que puede comenzar tardíamente en la vida, siempre y cuando se mantengan unos niveles adecuados de vitaminas, minerales y proteínas. Esto aún no ha podido ser demostrado en humanos, pero está en marcha un experimento en simios que aportará datos en pocos años (Weindruch, 1996).

1.8.2 Teorías de envejecimiento

Son muchas las teorías acerca del envejecimiento. Al igual que la definición de este concepto, no existe una única aceptada, sino que cada una aporta una explicación teóricamente lógica del proceso.

Podemos clasificarlas en:

- Teorías Orgánicas: Inmunológica, Neuroendocrina.
- Teorías Celulares: Límite de la Duplicación Celular.
- Teorías de Envejecimiento Programado: Programa Genético de Envejecimiento
- Teorías Evolutivas.
- Teorías Moleculares: Acumulación de Productos de Desecho, Entrecruzamientos, Mutaciones Somáticas, “Errores Catastróficos”, Teoría de los Radicales libres

1.8.3 Teoría de los Radicales libres

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

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

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

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

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

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

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

La generación continua de ROS por la mitocondria a lo largo de la vida celular, produce un estrés oxidativo mitocondrial “crónico” relacionado con la edad, que juega un papel clave en el envejecimiento. Más aún, la mitocondria de especies que viven periodos de tiempos más cortos produce relativamente cantidades más elevadas de ROS que aquella procedente de especies que viven más (Sohal, Svensson et al., 1990; Sohal and Sohal, 1991; Barja, Cadenas et al., 1994). De este modo, la velocidad de producción de ROS aparece como determinante en el potencial de vida máxima (Perez-Campo et al., 1998).

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

Así mismo, se ha encontrado una disminución en la actividad de algunas proteínas transportadoras aniónicas con la edad, como los transportadores de fosfato y dicarboxilatos en mitocondrias de hígado (Sastre, Pallardo et al., 1996) y los transportadores acilcarnitina-carnitina, de Ca^{2+} , de nucleótidos de adenina y de piruvato en mitocondrias de corazón. Sin embargo, otros autores han estudiado la tasa de producción de radicales libres en diversos tejidos de rata, sin encontrar un incremento con la edad o bien, han encontrado un pico en edades intermedias, pero no en edades avanzadas. De este modo, sería más acertado estudiar marcadores de estrés oxidativo en lugar de producción de radicales libres. Este sería el caso de marcadores de peroxidación lipídica, como el etano y pentano del aire espirado, ya que se considera como un factor esencial en el envejecimiento de células aerobias (Lippman, 1985) y se sabe que forma parte de la etiología y patogenia de enfermedades asociadas con la edad avanzada (Vladimirov, 1986). De este modo, ha sido comprobado que los animales viejos presentaban un incremento de la oxidación en sus tejidos.

Otro marcador de estrés oxidativo utilizado para estudiar el envejecimiento, ha sido la oxidación proteica. Muchas modificaciones post-traduccionales acumuladas en el viejo se deben a la acción de radicales libres (Stadman, 1992). En este proceso, aminoácidos tales como la prolina, la arginina y la lisina se oxidan para dar derivados carbonilos, es decir, aldehídos.

El daño oxidativo asociado al DNA puede ser el más importante de todos los mencionados. El grupo de Bruce Ames en California ha calculado que los radicales libres del oxígeno modifican cada día aproximadamente diez mil bases de DNA por célula (Ames, Shigenaga et al., 1993). Las enzimas reparadoras del DNA son capaces de eliminar la mayoría de estas

lesiones, pero no todas. Por tanto, las lesiones no reparadas del DNA, como la 8-oxodG se acumulan con la edad y se sabe que es el DNA mitocondrial el que mayor cantidad de oxidación presenta, no el nuclear ((Richter, Park et al., 1988). Nuestro grupo demostró que la oxidación del DNA mitocondrial se correlaciona con la del glutatión mitocondrial (de la Asuncion et al., 1996). La teoría del envejecimiento por Radicales Libres y la teoría Mitocondrial de Envejecimiento resultan especialmente atractivas debido a que permiten una intervención racional, por ejemplo, la administración de antioxidantes podría retardar el daño que acompaña al proceso de envejecer. Además, se tratan de dos teorías que podrían explicar prácticamente todos los fenómenos descritos en las teorías anteriores: la pérdida de capacidad del sistema inmunitario y neuroendocrino con la edad, el límite de la duplicación celular de Hayflick, la acumulación de lipofucsina, la formación de puentes cruzados intermoleculares, las mutaciones somáticas, o los errores de Orgel.

1.8.4 Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento

Cutler observó que diversos antioxidantes tales como la vitamina E, el urato, la ceruloplasmina y la actividad superóxido dismutasa en diferentes organismos muestran una correlación con la tasa metabólica multiplicada por la longevidad máxima de cada especie (Cutler, 1984). Consecuentemente, propuso que la duración de la vida se debería correlacionar con la capacidad de protección antioxidante. En esta línea, Orr y Sohal consiguieron moscas *Drosophila melanogaster* doblemente transgénicas, que sobre expresaban superóxido dismutasa Cu, Zn-dependiente y catalasa, y vieron que la disminución del estrés oxidativo se correlaciona con el aumento de la longevidad media y máxima de las

moscas (Orr and Sohal, 1994). Además, se enlentece el proceso de envejecimiento ya que las moscas transgénicas presentan un retraso en la pérdida de la capacidad física y niveles inferiores de daño oxidativo a proteínas. Sin embargo, no se observó efecto en la elongación de la vida con la sobreexpresión de estas enzimas por separado (Orr and Sohal, 1993).

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

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es determinar el mecanismo por el cual los estrógenos y compuestos estrogénicos como la genisteína modulan genes antioxidantes asociados a la longevidad.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Determinar los niveles de peróxido de hidrógeno en células de mama incubadas con estradiol o genisteína.
2. Determinar el papel de los receptores estrogénicos en el efecto antioxidante del estradiol y la genisteína.
3. Determinar si la vía de señalización de las MAP kinasas está implicada en el papel antioxidante del estradiol y la genisteína.
4. Determinar si el factor de transcripción NFkappaB está implicado en el efecto antioxidante del estradiol y la genisteína.
5. Determinar si el estradiol o la genisteína inducen la expresión de genes antioxidantes asociados a la longevidad.

6. Determinar si los fitoestrógenos del vino aumentan la longevidad de las moscas *Drosophila melanogaster*.
7. Determinar si los fitoestrógenos del vino tienen efectos antioxidantes en la rata Wistar.

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



MATERIALES Y MÉTODOS



Materiales

3.1 APARATOS

- **Balanzas**

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

- **Centrífugas**

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

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

- **Espectrofotómetro**

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

- **Sistema de purificación de agua**

Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.

- **pHmetro**

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

- **Fluorímetro**

Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.

- **Homogeneizador**

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

- **Autoclave**

Marca Selecta, modelo Autester-G.

- **Termociclador**

Marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp® PCR System 9700.

Marca Perkin Elmer, modelo GeneAmp® PCR System 9600.

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

- **Cubetas de electroforesis**

Cubeta de la casa SIGMA- ALDRICH.

- **Fuentes de alimentación de electroforesis**

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

- **Transiluminador ultravioleta**

Marca Vilverlourmat, modelo TFX-35M.

- **Dispositivo fotográfico**

Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.

- **Equipo de Cromatografía líquida de alta eficacia**

Cromatógrafo de la marca Kontron, compuesto por:

Bomba Kontron, modelo 422, Detector electroquímico ESA Coulochem II, modelo 5200, con una célula analítica modelo 5011 y una célula acondicionadora modelo 5021, Columna Spherisorb ODS 2, de 0.46 cm de diámetro por 25 cm de longitud y 5 µm de diámetro de partícula.

- **Campana de flujo laminar vertical**

Marca CULTAIR modelo B100

- **Estufa termostaticada de cultivos**

Marca NAPCO modelo 5415IR, CO₂ System

- **Microscopios**

Microscopio óptico NIKON SE.

Microscopio óptico invertido ZEISS Modelo ID03

3.2 REACTIVOS

- **Determinación de proteínas**

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

- **Aislamiento de RNA total**

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

- **Retrotranscripción y amplificación.**

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

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

- **Enzimas**

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

- **Otros reactivos**

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

Métodos

3.3 CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares son el producto de la colección de células animales de diferentes órganos, mantenidas en condiciones especiales propicias para su supervivencia y multiplicación, con lo que conservan todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido obtenidas a partir de un animal recién sacrificado, recibe el nombre de cultivo primario.

Las Líneas Celulares continuas o cultivos secundarios están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores, o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo.

En nuestro estudio, empleamos la línea celular MCF-7, proveniente de células tumorales de glándula mamaria humana.

La razón por la cual escogimos esta línea celular es porque contiene receptores estrogénicos, como podemos ver en la figura 3.1, en la que se muestra la respuesta positiva de las células MCF-7 ante anticuerpos frente a receptores estrogénicos.

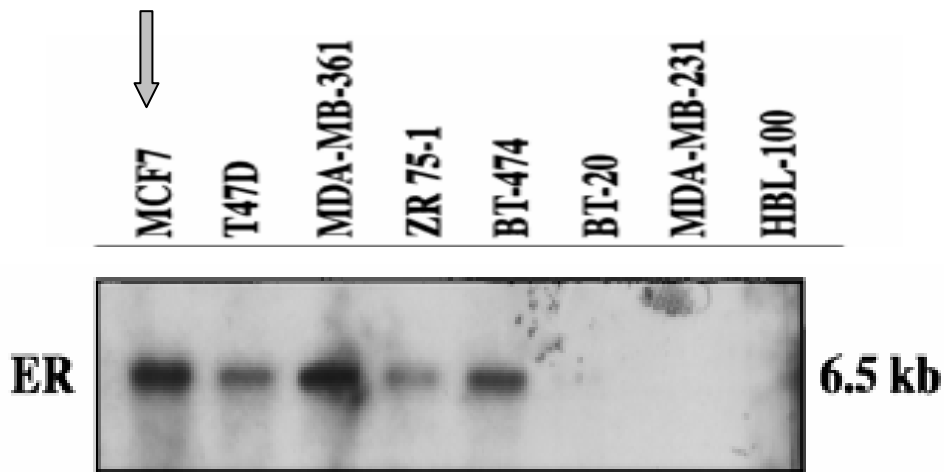


Figura.3.1- Expresión de receptores estrogénicos en células tumorales de glándula mamaria MCF-7.

3.3.1 Condiciones de cultivo

Las células MCF-7 se cultivaron según indicaciones de la AMERICAN TYPE CELL CULTURE (ATCC).

El procedimiento es el siguiente: se prepara el medio de cultivo en frascos de poliestireno de 75 y 25 cm², suministrados por Falcon Labware, USA, para un volumen final de 15 y 5 mL respectivamente, la composición del medio de cultivo es la siguiente:

- Iscove's Modified Dulbecco's Médium without phenol red (GIBCO Lab. USA), pH 7.4..... 90% (v/v)
- Suero bovino fetal..... 10% (v/v)

Una vez preparado el medio de cultivo, se añaden las células en una proporción de 2×10^5 células / cm^2 y se introduce la mezcla en los diferentes frascos. Se incuban a 37°C en una estufa incubadora bajo una atmósfera con un 5 % de CO_2 .

3.3.2 Métodos experimentales

Para todos los experimentos, se dejó crecer el cultivo hasta un 80 % de confluencia, obtenido a los tres días después de la siembra, en frascos de poliestireno de 75 y 25 cm^2 . Una vez alcanzada la confluencia deseada, se procedió a la incubación de las células según las diferentes condiciones experimentales.

3.3.2.1 Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7.

Para la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno las células se sembraron en frascos de 75 cm^2 , una vez alcanzada la confluencia se le añadió los reactivos descritos en la tabla 3.1 y se incubaron durante 48 horas más. Los reactivos usados se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo.

	Concentración Madre en DMSO	Dilución empleada	Concentración final
Control		1/1000	
Estradiol	0,2 y 0,02 μM	1/1000	0,2 y 0,02 nM
	0,5 , 5 y 50 μM	1/1000	0,5 , 5 y 50 nM
Genisteína	0,5 , 5 y 15 μM	1/1000	0,5 , 5 y 15 μM
U0126	1 mM	1/1000	1 μM
Tamoxifeno	15 mM	1/1000	15 μM
PDTC	0,2 M	1/1000	0,2 mM

Tabla 3.1 Reactivos empleados en los medios de cultivo

Una vez realizadas las incubaciones, se procedió a la determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en las diferentes condiciones, tal y como se expone a continuación.

Fundamento

Utilizamos un método modificado a partir del desarrollado por Barja y cols. en 1999 (Barja de Quiroga, 1999). Esta técnica se fundamenta en la medida de la fluorescencia emitida por el dímero formado entre el peróxido de hidrógeno, producido por las células, y ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético). Este dímero al ser excitado por un haz de luz de una longitud de onda de 312 nm, es capaz de emitir a un máximo de fluorescencia a 420 nm, detectado por un fluorímetro. La catálisis de la reacción de dimerización la lleva a cabo la enzima peroxidasa que utiliza el peróxido de hidrógeno como sustrato para producir la dimerización, ver figura 3.2.

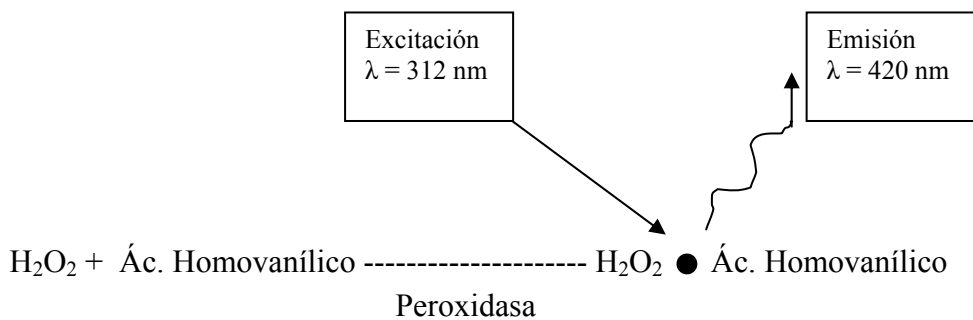


Figura 3.2 Esquema de detección de peróxido de hidrógeno

Reactivos

- Solución PBS. Tampón fosfato sódico 5 mM pH 7.4, NaCl 9 g. por litro
- Solución Glicina-EDTA: Glicina 2 mM, EDTA 50 mM, NaOH 2.2 mM. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta $\text{pH} \geq 11$.
- Ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético) 0.1 mM (concentración final en el tubo) disuelto en PBS.
- Peroxidasa de rábano 6 U/mL.

Procedimiento

Realizamos la mezcla de reactivos que contiene las siguientes cantidades de reactivo por cada determinación: 5 μL de peroxidasa de rábano 6 U/mL, 20 μL de ácido homovanílico 1 mM, y hasta 2 mL de PBS. Dicha mezcla se añade a cada uno de los frascos, que previamente han sido lavados dos veces con PBS a temperatura (37°C), y se deja durante 5 minutos a 37°C en la estufa de incubación. Transcurrido ese tiempo, se sacan los frascos y se para la reacción por medio de la adición de 1 mL de tampón Glicina-EDTA $\text{pH} \geq 11$.

Una vez detenida la reacción, se procede al raspado de las células, y se recoge todo el contenido (células y mezcla de reacción) en tubos de propileno para su posterior centrifugación a 15000 g durante 15 minutos. Una vez centrifugados los tubos, se toma el sobrenadante y se determinan los niveles del dímero H_2O_2 -homovanílico. Para ello medimos con un fluorímetro la fluorescencia que emite a 420 nm de longitud de onda tras excitación con un haz de luz de 312 nm.

El precipitado celular se disuelve en NaOH 1N, para determinar la cantidad de proteínas de las células, que nos servirá para normalizar el resultado.

Cálculos

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

Peroxidasa (μL)	Ác. Homovanílico (μL)	Tampón Peróxidos (μL)	H₂O₂ (nmol/mL)
5	20	1975	0
5	20	1970	1
5	20	1965	1,5
5	20	1960	2

Tabla 3.2 Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.

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

Los patrones de H₂O₂ se realizan a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno al 33,3 % p/v. Primero se realiza una dilución 1/10³ del peróxido de hidrógeno comercial en el mismo tampón que utilizamos para las muestras, y, a partir de ésta se obtiene una dilución 1/10⁵

de la comercial (también en este tampón). Esta será la solución que se utilizará para realizar los patrones de H₂O₂.

Para calcular con exactitud la concentración de la solución comercial de peróxido de hidrógeno debe medirse la absorbancia de la dilución 1/10³ a una longitud de onda de 230 nm (A₂₃₀), utilizando el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a esa longitud de onda ($\epsilon_{230}=72,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), mediante la siguiente ecuación, puede conocerse la concentración de H₂O₂ en cada tubo de la recta patrón:

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

Extrapolando en la curva patrón, obtenemos el valor de H₂O₂ en nmol/mL de cada una de nuestras muestras. Éste se divide por la cantidad de proteínas en mg/mL, obteniendo así el resultado final en nmol de H₂O₂/mg de proteínas.

3.3.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante total.

Para poder determinar si la genisteína y el estradiol presentan actividad antioxidante *per se*, en los medios de cultivo, a las concentraciones empleadas en los experimentos, utilizamos el método TRAP (total reaction antioxidant potencial). Éste nos permite determinar la capacidad de neutralizar radicales libres en un medio acuoso, es decir, podemos determinar el poder antioxidante de líquidos hidrófilos.

Fundamento

El método se basa en la reacción del peróxido de hidrógeno con la metamioglobina para formar el radical ferrilmioglobina, el cual reacciona con el ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato diamónico)] para formar el radical ABTS⁺ (grupo cromógeno que presenta un pico de absorción a 734 nm). En presencia de antioxidantes se produce una inhibición de la absorbancia a 734 nm y este hecho es el que se utiliza para la determinación de la capacidad antioxidante total. Como curva de calibración se utiliza diferentes concentraciones de TROLOX, un derivado de la vitamina E, soluble en agua y con potente poder antioxidante.

Reactivos

- PBS pH 7.4.
- TROLOX (Aldrich). Como solución madre se utiliza una solución de TROLOX 2.5 mM en PBS. A este pH y concentración el TROLOX presenta su límite máximo de solubilidad. .

La curva de calibración se prepara con las siguientes concentraciones de TROLOX: 2.5 mM, 2.0 mM, 1.5 mM, 1.0 mM y 0.5 mM.

- Peróxido de hidrógeno. Las soluciones de trabajo se preparan a partir de una solución comercial al 33.3 %. Se prepara inicialmente una solución 500 mM, diluyendo 515 μ L del H₂O₂ al 33.3 % en 10 mL de PBS. De esta solución se toman 100 μ L y se llevan a 50 mL de PBS, con lo que nos queda una concentración de alrededor de 1mM. La concentración final se

comprueba espectrofotométricamente a 230 nm ($\epsilon_{230} = 72.4$ mM⁻¹ x cm⁻¹).

- ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato diamónico)]. Se prepara una solución mM de ABTS en PBS (27.4 mg en 10 mL).
- Metamioglobina. Se purifica sobre una columna de 35 x 2.5 cm de Sephadex G15-120 equilibrada con PBS. Para esto se procede de la siguiente forma: se prepara por una parte una solución de 400 μ M de mioglobina (75.2 mg en 10 mL de PBS) y por otra una solución de hexacínoferrato [III] potásico (24.4 mg en 100 mL de PBS). A los 10 mL de la solución de mioglobina se añaden 10 mL de la solución de hexacínoferrato y se deja reaccionar durante al menos 20 minutos. A continuación se coloca sobre la columna y se eluye con PBS, recogiendo el eluato marrón. Las concentraciones de las distintas formas de mioglobina se determinan según las siguientes fórmulas (Whitburn y cols., 1982):

$$[\text{Met Mb}] = 146 A_{490} - 108 A_{560} + 2.1 A_{580}$$

$$[\text{Ferril Mb}] = -62 A_{490} + 242 A_{560} - 123 A_{580}$$

$$[\text{MbO}_2] = 2.8 A_{490} - 127 A_{560} + 153 A_{580}$$

La metamioglobina preparada por este método solamente se podrá utilizar si tiene una pureza superior al 94 %.

Preparación de las muestras

Las muestras empleadas para el ensayo se obtuvieron de los medios de cultivo con los diferentes reactivos disueltos en él. La mezcla de reacción se muestra en la tabla 3.3.

Reactivos	Blanco	Patrón/Muestra
Muestra (o patrón)	-	15 μ l
PBS	1754 μ l	1739 μ l
metaHB (140 μ M)	36 μ l	36 μ l
ABTS (5 mM)	60 μ l	60 μ l

Tabla 3.3. Mezcla de reactivos empleadas para el ensayo.

Una vez preparadas todas las cubetas se agitan y se incuban a 30 °C. Se lee la absorbancia inicial a 734 nm (leer una cubeta cada minuto). Como autocero se utiliza la absorbancia inicial del blanco. La reacción se dispara en todas las cubetas con 150 μ L de H₂O₂ (t=0 minutos) y a t=6 minutos se vuelve a leer la absorbancia 734 nm. Es muy importante el tiempo transcurrido desde que se dispara la reacción con el H₂O₂ hasta que se lee a los 6 minutos, ya que la reacción no es de punto final, sino que continua hasta que se consume todo el H₂O₂.

También es importante hacer 2 curvas de calibración, una al principio de todas las muestras y otra al final.

Cálculos

Para la construcción de la recta de calibración se procede de la siguiente forma:

1.- Calcular el porcentaje de inhibición para cada uno de los patrones.

$$\% \text{ INHIBICION} = (A_{734} \text{ blanco} - A_{734} \text{ estándar} \times 100) / A_{734} \text{ blanco.}$$

2.- Representar el porcentaje de inhibición de los patrones frente a las concentraciones de TROLOX.

3.- Hacer una regresión lineal.

Una vez construida la recta de calibración, se calcula el porcentaje de inhibición para las muestras de igual forma que se ha calculado para los estándares y se extrapola en la recta de calibración para expresar la capacidad antioxidante total en forma de equivalentes de TROLOX.

3.3.2.3 Determinación de proteínas por Western Blotting en células MCF-7.

Para la determinación de proteínas las células se sembraron en frascos de 25 cm², a los 3 días de siembra se eliminó el medio de cultivo y se puso nuevo medio sin suero, el cual se mantuvo durante al menos 8 horas. La deprivación de suero es necesaria para eliminar los factores de crecimiento que puedan interferir en la medida.

Reactivos

- PBS pH 7.4 + ortovanadato de sodio 200 μM
- Medio Krebs-Henseleit, compuesto de: NaCl 3,82g, KCl 0,215g, Na HCO₃ 1,05g, NaH₂PO₄ 0,081g, HEPES 2,381g, Glucosa 0,452g, CaCl₂ (1M) 1,25mL, MgCl₂ 0,5mL.

Procedimiento

Tras 8 horas de incubación con medio sin suero se procede del siguiente modo con cada placa de células:

1. Eliminamos el medio de cultivo.

2. Lavamos dos veces con tampón Krebs-Henseleit.
3. Preincubamos durante 15 minutos con este mismo tampón.
4. Eliminamos el medio.
5. Añadimos los reactivos (ver tabla 3.4) disueltos en DMSO al medio Krebs-Henseleit e incubamos en la estufa a 37° C durante 3 minutos.
6. Después de la incubación eliminamos el medio
7. Lavamos con PBS al que previamente le hemos añadido ortovanadato de sodio a 200 mM, el cual inhibe las fosforilasas, de modo que durante el lavado y manipulación vamos a evitar posibles desfosforilaciones no deseadas para el experimento.

	Concentración madre en DMSO	Dilución	Concentración
Control		1/1000	
Estradiol	0,2 y 0,02 μ M	1/1000	0,2 y 0,02 nM
Genisteína	5 mM	1/1000	5 μ M
UO126	1 mM	1/1000	1 μ M
Tamoxifeno	15 mM	1/1000	15 μ M

Tabla 3.4 Reactivos empleados en los tratamientos

Una vez realizadas las incubaciones, se procede a la extracción de proteínas.

3.3.2.4 Extracción de proteínas.

Reactivos

Al cultivo celular se le añade el siguiente tampón de lisis:

- 83 mL TRIS (76,5mM)/ 10mL Glicerol / 2g SDS.
- 3,766 mL del tampón anterior + 40 μ L ortovanadato de sodio (200mM) + 40 μ L IP (cóctel inhibidor de proteasas de SIGMA).

Procedimiento

1. Añadir en cada placa, una vez lavada y sin líquido, 237.5 μL del tampón de lisis.
2. Incubar en hielo durante 10 minutos.
3. Despegar las células de la placa con un rascador y recoger el volumen en un tubo eppendorf.
4. Incubar durante 10 minutos a 90°C.
5. Recoger una alícuota para la determinación de la concentración de proteínas y al resto se le añadir 1 μL de azul de bromofenol (2%) y 10,5 μL de β -Mercaptoetanol.
6. Vortear la mezcla y congelar a -20°C.

3.3.2.4.1 Cuantificación de proteínas. Método Lowry

En los extractos citosólicos se utilizó el “Protein ASSAY Kit” de la firma Sigma-Aldrich Química. Este kit contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin (Lowry et al., 1951).

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

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

La concentración de una disolución no conocida se calcula extrapolando en una recta patrón la absorbancia obtenida a $\lambda=660\text{nm}$.

3.3.2.5 Western Blotting

Fundamento

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

En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas unen 1.4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO_4^-), los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme, de forma

que la separación depende de la carga y masa molecular de las distintas proteínas.

Condiciones del gel y transferencia

Para detectar las distintas proteínas de ensayo se cargaron 40 µg de proteínas celulares totales en geles discontinuos al 12,5% de Acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 20 mAmpereos durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel se transfirió (Blotting) a una membrana de Nitrocelulosa o PVDF (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas, por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se mantuvo durante 1 hora, a una temperatura de 4°C y una intensidad constante de 280 mAmpereos, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

Marcaje y revelado

1. Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20 en 1x TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6). (TBS-T).

2. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 mL de TBS-T.

3. Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C con agitación orbital en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1x

TBS) y con las correspondientes diluciones de anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology) (Ver Tabla 3.5)

4. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 mL de TBS-T.
5. Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo (Cell Signaling Technology). El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo a la concentración especificada por la casa
6. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 mL de TBS-T.
7. La membrana se incuba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se revela con una detector quimioluminscente, mediante le programa Image GaugeV4.0 de FUJIFILM.

Anticuerpo	Peso Molecular	Fuente	Dilución
Phospho Anti p44/42MAPK	~42-44kD	Conejo	1:1000
Anti p44/42MAPK	~42-44kD	Conejo	1:1000
Anti α -actina	43 kD	Ratón	1:500
Anti α -tubulina	47 KD	Ratón	1:10000

Tabla 3.5 Descripción de los anticuerpos utilizados para Western Blotting

Cuantificación de los resultados

Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital TIF para poder realizar la densitometría utilizando el software de FIJIFILM Image Gauge V4.0

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función de los valores de expresión de la proteína sin fosforilar o de la α -tubulina en los extractos celulares.

3.3.2.6 Determinación de la actividad de la subunidad p50 de NFκB en núcleos aislados de células MCF-7

Para estudiar la actividad de NFκB usamos un kit de determinación de la actividad de la subunidad p50 proporcionado por Active Motif Europe (TransAM™).

Después de la incubación de las células durante 48 horas con las distintas condiciones señaladas en la tabla 3.1 se extrajeron los núcleos mediante la siguiente técnica.

3.3.2.6.1 Aislamiento de núcleos en células MCF-7

Reactivos

La técnica se basa la utilización de dos tampones:

- Un tampón hipotónico (Tampón A) que rompe las membranas citoplasmáticas compuesto de: HEPES (10mM) pH 7,9, KCl (10mM), MgCl₂ (1,5mM), Ditiotreitól (1mM), IP (SIGMA) 40 μL y H₂O c.s.p 10 mL.
- Un tampón hipertónico (Tampón C) que rompe las membranas nucleares compuesto de: NaCl (0,4M), HEPES (20mM) pH 7,9, EDTA (1mM), EGTA (1mM), Ditiotreitól (1mM), IP 4,88 μL, y H₂O c.s.p. 1mL.

Procedimiento

1. Lavar células con PBS frío.
2. Añadir 200 μL de PBS a cada frasco de cultivo de 75 cm², rascar las células y ponerlas en un tubo eppendorf.
3. Centrifugar a 14000 rpm 30 segundos a 4°C.

4. Resuspender el precipitado en 200 μ L de tampón A por cada 10^6 células y dejar en hielo durante 10 minutos.
5. Añadir 12,5 μ L de tritón NP-40 al 10 %, y vortear durante 10 segundos.
6. Centrifugar 30 segundos a 14000 rpm, a 4°C y eliminar sobrenadante.
7. Resuspender el precipitado (los núcleos) en 25 μ L por cada 2×10^6 células de tampón C previamente frío.
8. Incubar a 4°C 15 minutos en rotor a 800 rpm.
9. Centrifugar 30 segundos a 14000 rpm, a 4°C recoger sobrenadante y guardar una alícuota de 5 μ L para medir proteínas.

3.3.2.6.2 Actividad de NF κ B en núcleos aislados de células

MCF7.

La técnica se basa en un ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Los reactivos son los siguientes: anticuerpo NF κ B p50, anti-rabbit HRP IgG conjugado, oligonucleótido tipo salvaje de NF κ B, oligonucleótido mutado de NF κ B, extractos nucleares jurkat, DTT, cóctel inhibidor de proteasas, ADN de esperma de salmón, tampón de lisis, tampón de unión, tampón de lavado (10x), tampón de unión de anticuerpo (10x), reactivo quimioluminiscente y una placa de 96 pocillos.

Fundamento

Esta técnica esta basada en la presencia de un oligonucleótido de NF κ B pegado a los pocillos de la placa de 96. Éste reconoce la forma activa

de NFκB presente en los extractos nucleares. Al introducir un extracto nuclear, que contiene NFκB, en contacto con el oligonucleótido pegado al pocillo, se produce la unión. Una vez tenemos la unión al pocillo, el paso siguiente es unir a ese complejo una proteína conjugada con una fuente emisora de quimioluminiscencia (anti-rabbit HRP IgG conjugado). En este punto podemos revelar los resultados del mismo modo que explicamos en el apartado de Western Blotting, mediante un detector de quimioluminiscencia.

El procedimiento y los cálculos se realizaron según las instrucciones del kit empleado.

3.3.2.7 Aislamiento de RNA

Fundamento

El aislamiento de RNA se llevó a cabo utilizando un producto registrado llamado Trizol[®], de la casa comercial ROCHE. El método se basa en utilizar las propiedades de solubilidad del RNA en solventes acuosos orgánicos y alcoholes. De este modo podremos separar las proteínas y el DNA, del RNA.

Reactivos

- Tampón de extracción: Trizol[®].
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol 70 %.
- Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Procedimiento

Según las instrucciones del Trizol[®], seguimos los siguientes pasos, para cada una de las muestras:

1.- Pesar 20-50 mg de tejido y añadirlos al homogeneizador con 1mL de Trizol[®]. En el caso de células con 4 millones y 1mL de Trizol[®] es más que suficiente y no hace falta utilizar un método mecánico para romperlas.

2.- Después de incubar durante 2-3 minutos se le añade 200 µL de cloroformo por cada mililitro de Trizol[®] empleado.

3.- Mezclar durante 15 segundos con la mano y dejar incubar 2-3 minutos.

4.-Centrifugar las muestras a menos de 12000g durante 10 minutos. En este punto tenemos en RNA en la fase acuosa.

5.-Recoger el sobrenadante, correspondiente a la fase acuosa en un nuevo tubo y añadir 500 µL de isopropanol, mezclar y esperar 5 minutos.

6.-Centrifugar a menos de 12000g durante 15 minutos para obtener un precipitado de RNA.

7.-Eliminar el sobrenadante y añadir 1mL de etanol 70% para lavar el RNA.

8.-Volvemos a centrifugar durante 5 minutos a 7500g.

9.-Eliminamos el sobrenadante y dejamos secar durante 15 minutos el precipitado obtenido, que corresponde al RNA.

10.- Disolver el RNA en agua libre de RNAsas (agua tratada con dietilpirocarbonato). Agitar con vórtex para favorecer la disolución.

11.- Calentar a 65°C durante 10 minutos.

12.- Agitar con vórtex para asegurarse de que se ha disuelto, alicuotar y guardar a -80°C para su conservación.

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

3.3.2.7.1 Cuantificación de la concentración de RNA

La cuantificación del RNA se realizó mediante medida espectrofotométrica a 260 nm, y la comprobación de la pureza mediante la relación de las medidas 260/280 nm. Para hacer el blanco de la medida de RNA se puso 1 mL de agua libre de RNAsas en la cubeta de cuarzo (Ab) y para la medida se diluyó en esta agua 2 µL del RNA aislado (Am). Con los valores obtenidos se hizo el siguiente cálculo:

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

Siendo:

$$A = A_m - A_b$$

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

$$1000/2 = \text{Dilución del RNA.}$$

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

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

3.3.2.7.2 Electroforesis de RNA en gel de agarosa

Para asegurarse de que el RNA no se ha degradado durante la extracción, es imprescindible realizar esta técnica que nos va a permitir determinar la integridad del mismo. El fundamento se basa en la visualización de las dos subunidades mayoritarias de RNA, que pueden ser

separadas electroforéticamente y que corresponden al 18S y 26S del RNA ribosomal. Para detectar las bandas, se tiñe el gel con bromuro de etidio, el cual se intercala entre los nucleótidos del RNA y al ser excitado con luz ultravioleta emiten fluorescencia

Reactivos

Los reactivos empleados son los siguientes:

- Tampón MOPS 10x que lleva: 41,8g de MOPS, 800mL de H₂O_{DEPC}, acetato sódico (50mM) y EDTA (10mM); luego se ajusta el pH a 7 con NaOH, se enrasa a 1L y se filtra.
- Tampón de carga, compuesto por: 87 µL de MOPS (10x), 0,405 mL de formamida, 0,161 µL de formaldehído y 38 µL de azul de bromofenol.
- Gel de agarosa al 1%: para 50 mL de H₂O_{DEPC} lleva 0,5 g de agarosa D1 baja EEO-GOT, 43,5 mM de H₂O_{DEPC}, 5 mL de MOPS 10x y 1,5 mM de formaldehído.

Procedimiento

Una vez obtenido el gel se diluye la muestra con el tampón de carga en relación de 1:3, se calienta y se carga 1µg de RNA en el gel. Después se conecta la fuente eléctrica a 80 Voltios durante al menos 45 minutos. Debido a la carga eléctrica el RNA migrará hacia el polo positivo, de modo que se separaran las bandas con distintos pesos moleculares. Se extrae el gel y se sumerge en agua con bromuro de etidio, el cual se va a intercalar en la cadena de RNA y va a emitir fluorescencia en presencia de luz ultravioleta.

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

Fundamento

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

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

1. Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT).

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

2. Amplificación del DNAc: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez sintetizado el cDNA, lo amplificamos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de DNA.

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

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

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

Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del DNA.

Unión o “*annealing*”: unión de los “primers” específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de “primers”.

Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del “primer” respectivo.

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

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

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

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

Así, este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia, y nos permite controlar la reacción en todo momento (aumento del nº de ciclos, repetición de ciclos, pausa, etc.). La Figura 3.3 representa las curvas de amplificación que obtenemos mediante este método.

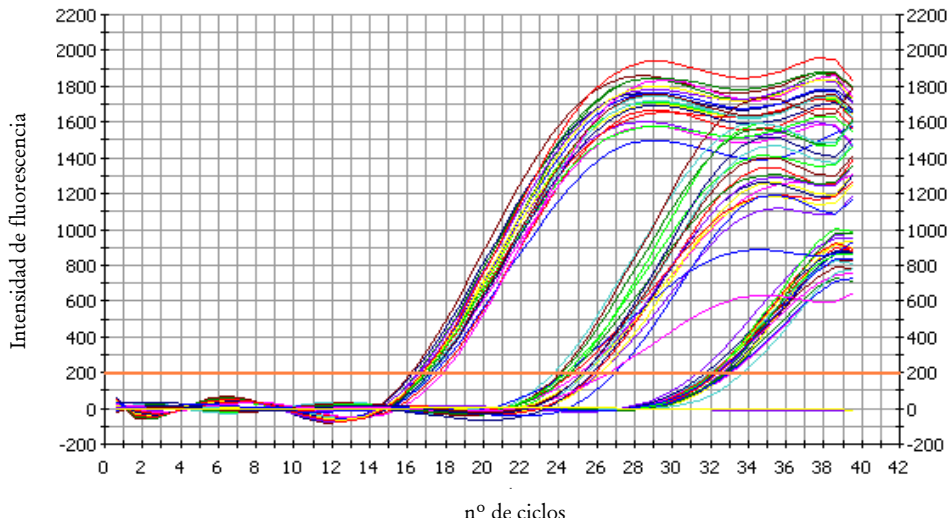


Figura 3.3 Curvas de amplificación obtenidas mediante PCR en tiempo real.

El software del ordenador construye estas curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. Así, al final obtenemos una representación en la que el eje de ordenadas es la fluorescencia y el eje de abscisas es el nº de ciclos transcurridos. Una vez obtenida la representación, el eje de ordenadas se transforma en logarítmico para su mejor interpretación (Figura 3.4).

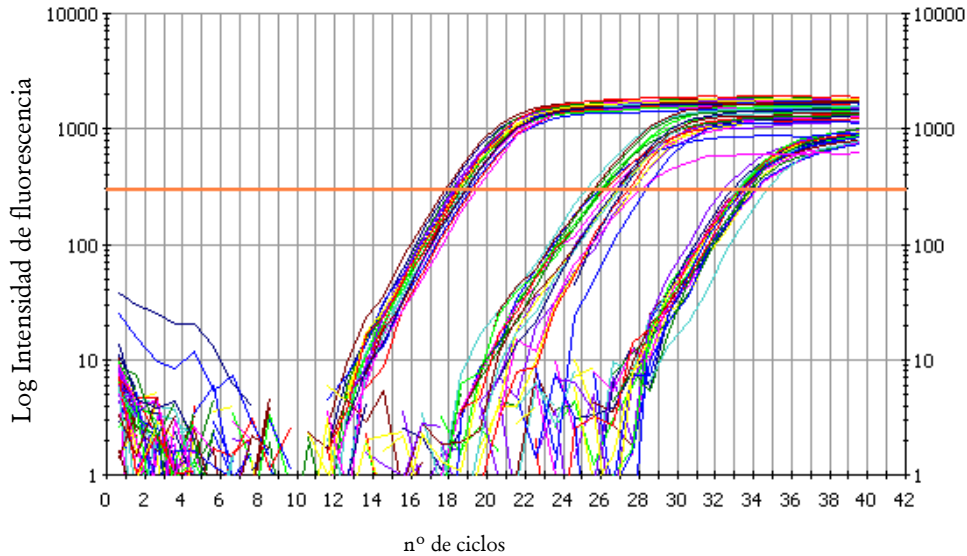


Figura 3.4. Curvas de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico.

En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (“threshold cycle”, Ct), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cDNA (DNA copia) de partida, puesto que cuanto más copias de RNAm (RNA mensajero) de partida del gen estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de RNAm de partida conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de un gen de expresión constitutiva, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La

cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de RNAm de partida empleado para la realización de la curva estándar.

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

“Primers” empleados.

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

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

- “Primers” utilizados en células MCF-7

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

5'-CAT CAC CAA GCC AAT ACC AG

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

Dismutasa 5'-TGA ACG TCA CCG AGG AGA AG

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

- “Primers” utilizados en moscas *Drosophila melanogaster*

Catalasa: 5'- ACT CCC AAA CGG TTT CTC CT

5'- GTC GTG GGT CAC CTC AAA GT

Se tomó como control interno el RNA de la proteína 18S del RNA ribosomal, dado que este RNA se expresa a un nivel constante en la mosca *Drosophila melanogaster*.

Condiciones de amplificación

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

- Glutación Peroxidasa (GPx)
Retrotranscripción: 50°C durante 30'
Desnaturalización previa: 94°C durante 3'
Amplificación: (35 ciclos)
Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos
Unión o “annealing”: 63°C durante 30 segundos
Extensión: 72°C durante 30 segundos
Extensión final: 72°C durante 7 minutos
- Manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD)
Retrotranscripción: 50°C durante 30'
Desnaturalización previa: 94°C durante 3'
Amplificación: (30 ciclos)
Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos
Unión o “annealing”: 64°C durante 30 segundos
Extensión: 72°C durante 30 segundos
Extensión final: 72°C durante 7 minutos
- Catalasa
Retrotranscripción: 50°C durante 30'
Desnaturalización previa: 94°C durante 3'
Amplificación: (20 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o “annealing”: 51°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Procedimiento

La reacción de RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando el kit denominado “Tth DNA Polymerase” de la casa Boehringer Mannheim, que permite realizar en un único paso la transcripción inversa y la amplificación del cDNA sintetizado. La Tth DNA polimerasa posee la propiedad de actuar como retrotranscriptasa (en presencia de iones Mn^{2+}) y como polimerasa al mismo tiempo. Además se utilizó el reactivo SYBR Green I para la detección fluorescente del producto formado.

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

Mezcla 1 (por muestra):

Nucleótidos.....0.3 mM concentración final

“Primers”0.4 μ M cada uno, concentración final

Muestra de RNA.....20 ng de RNA

Agua libre de RNAsas.....c.s.p. 12.5 μ L

Mezcla 2 (por muestra):

Tampón con Mg^{2+} 1.5 mM $MgCl_2$ concentración final

$Mn(OAc)_2$ 2.5 mM concentración final

Tth DNA polimerasa.....5 U/reacción

SYBR Green I.....dilución 1/20000

Agua libre de RNAsas.....c.s.p. 12.5 μ L

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

Cálculos

Para calcular los niveles de RNAm realizamos una cuantificación relativa del gen problema, utilizando el método de comparación de Ct mencionado en el apartado 1.2.6.1

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

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

donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$

siendo $\Delta Ct1 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 1}$

$\Delta Ct2 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 2}$

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. La comprobación de este requisito se comprueba realizando curvas estándar de cantidades de RNA conocidas para cada uno de los genes, el problema y el de referencia. Una vez obtenidas las curvas de amplificación se representa el logaritmo de la concentración frente al Ct, tanto para el gen problema como para el de

referencia, y se calcula la pendiente de la recta para cada una de las representaciones obtenidas. Para que las eficiencias sean similares, las pendientes de ambas rectas deben ser similares, puesto que la eficiencia de la reacción de amplificación viene dada por la siguiente ecuación:

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

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

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

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

Una vez comprobamos que las eficiencias son comparables, realizamos las reacciones de amplificación conjuntamente para ambos genes (problema y referencia) y para cada muestra, triplicado y aplicamos la ecuación de comparación de Ct mencionada anteriormente para el cálculo de la diferencia de expresión del gen estudiado entre las diferentes condiciones propuestas.

3.4 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

3.4.1 Ratas Wistar

Todos los experimentos fueron realizados con ratas Wistar macho de edades comprendidas entre los 4 y 6 meses. Se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz /oscuridad (12 /12 h) constantes. Se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar (que contenía 590 g de carbohidratos, 30 g de lípidos, y 160 g de proteínas por kilogramo de dieta) y agua corriente sin restricción en la ingesta.

3.4.2. Sacrificio de animales

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y 10:00 horas de la mañana del día correspondiente. Por dislocación cervical, sin utilizar ninguna sustancia anestésica y/o tranquilizante.

Una vez muerto el animal, se procedió inmediatamente a la apertura de la cavidad abdominal para extraer los distintos órganos.

3.4.3. Estudio de la producción de los niveles de peróxido de hidrógeno en mitocondrias de ratas aisladas.

La técnica consta de dos partes:

- aislamiento de mitocondrias de hígado de rata y
- determinación de la producción de peróxido de hidrógeno y comprobación de la integridad de las mitocondrias por citometría de flujo

3.4.3.1 Aislamiento de mitocondrias hepáticas de rata

Reactivos

- Solución de lavado: NaCl 0.9%
- Tampón de aislamiento de mitocondrias: Sacarosa 0.3 M, EGTA 1 mM, MOPS 5 mM, BSA 15 μ M, KH₂PO₄ 5 mM, a pH=7.4 (KOH al 20 %).

Procedimiento

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

mitocondrias, pasamos a la segunda parte del aislamiento, que comprende tres centrifugaciones a 10000g durante 10 minutos a 4°C. Esta alta velocidad de centrifugación conlleva la precipitación de las mitocondrias, obteniendo por tanto un precipitado rico en mitocondrias que lavamos en centrifugaciones sucesivas. Tras la tercera centrifugación, el precipitado mitocondrial obtenido se resuspende en tampón de aislamiento o en tampón para la determinación de peróxidos, a razón de 2 µL/mg de precipitado mitocondrial o 20 µL/mg de precipitado mitocondrial respectivamente. De este modo obtenemos una suspensión mitocondrial más o menos diluida en función de la determinación a realizar.

3.4.3.2 Determinación de la tasa producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno

Fundamento

Utilizamos un método modificado a partir del desarrollado por Barja y cols. en 1999 (Barja de Quiroga, 1999). Esta técnica se fundamenta en la medida de la fluorescencia emitida (a 420 nm) por el dímero formado entre el peróxido de hidrógeno producido por las mitocondrias y el ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético), al ser excitado por una haz de luz de una longitud de onda de 312 nm. La catálisis de la reacción de dimerización la lleva a cabo la enzima peroxidasa a medida que se va formando el peróxido de hidrógeno. Las mitocondrias, una vez aisladas del tejido correspondiente, se incuban con sustratos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial: piruvato 5 mM y malato 2.5 mM como sustratos del complejo I, y succinato 10 mM como sustrato del complejo II. Para cada

sustrato ensayado, se realizan determinaciones por duplicado de la cantidad de dímero H₂O₂-ácido homovanílico a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

Reactivos

- Tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno: EGTA 0.1 mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 145 mM, HEPES 30 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta 7.4.
- Solución Glicina-EDTA: Glicina 2 mM, EDTA 50 mM, NaOH 2.2 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20 % hasta pH ≥ 11.
- Succinato potásico 10 mM (concentración final en el tubo): Neutralizar ácido succínico con KOH 20% hasta alcanzar pH=7.4. Enrasar con tampón para la determinación de H₂O₂.
- Piruvato sódico 2.5 mM (concentración final en el tubo) disuelto en tampón para la determinación de H₂O₂.
- Malato potásico 2.5 mM (concentración final en el tubo): Neutralizar ácido málico con KOH 1 M hasta pH=7.4. Enrasar con tampón para la determinación de H₂O₂.
- Ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético) 0.1 mM (concentración final en el tubo) disuelto en tampón para la determinación de H₂O₂.
- Peroxidasa de rábano 6 U/mL.

Procedimiento

Una vez aisladas las mitocondrias, el precipitado mitocondrial se resuspende en tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno a razón de 20 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de precipitado.

Por otro lado, realizamos la mezcla de reactivos que previamente habremos preparado. Dicha mezcla contiene las siguientes cantidades de reactivo por cada determinación: 5 μl de peroxidasa de rábano 6 U/mL, 20 μL de ácido homovanílico 1 mM, 20 μL de succinato 0.1 M pH 7.4 y hasta 1.5 mL del tampón para la determinación de H_2O_2 previamente burbujeado con aire durante 5 minutos. Dicha mezcla se utilizará para medir la producción de peróxido de hidrógeno en la cadena de transporte electrónico mitocondrial aportando como donante de sustancias reductoras el succinato (complejo II). Para la determinación de la tasa de generación de peróxido de hidrógeno aportando sustratos del complejo I, la mezcla contiene los mismos componentes, excepto el succinato que se sustituye por 20 μL de malato 25 mM y 20 μL de piruvato 50 mM.

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

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

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

Recogemos los sobrenadantes que contienen el dímero H_2O_2 -homovanílico y medimos con un fluorímetro la fluorescencia que emite a 420 nm de longitud de onda tras excitación con un haz de luz de 312 nm.

Cálculos

Los cálculos se determinan según el apartado 3.3.2.1 de este capítulo.

3.4.4. Citometría de flujo

Características de la citometría de flujo

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

El citómetro de flujo mide múltiples propiedades de una población celular de forma individual, es decir, analiza célula a célula y además de forma multiparamétrica. Esto va a permitir detectar la heterogeneidad celular además de otras propiedades celulares.

Funcionamiento de un citómetro de flujo:

En el citómetro de flujo, las células pasan por una cámara en la que son sometidas a un movimiento de flujo laminar que las obliga a salir alineadas describiendo siempre la misma trayectoria. Las células al salir de

la cámara de flujo pasan secuencialmente a través de un láser debidamente alineado.

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

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

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

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

Las señales eléctricas se amplifican y se procesan mediante conversión analógico-digital y, en relación directa con su magnitud, se les asigna un determinado número de canal en los histogramas.

3.4.4.1. Determinación del tamaño y complejidad mitocondrial por citometría de flujo

Tamaño mitocondrial:

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

Complejidad mitocondrial:

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

Potencial de membrana mitocondrial:

La estructura vectorial de la cadena de transporte electrónico mantiene un potencial de membrana mitocondrial negativo al interior miles de veces superior al potencial de membrana plasmático.

Los fluorocromos lipofílicos y de naturaleza catiónica se acumulan selectivamente en el interior de las mitocondrias activas, atraídas por el potencial de membrana mitocondrial.

Para determinar este parámetro mitocondrial se utiliza como fluorocromo la Rhodamina 123 que es un catión positivo.

Peróxido de hidrógeno:

Determinación de la actividad peroxidativa intracelular. Se usa la dihidrorhodamina 123, fluorocromo no fluorescente en estado de reposo, que oxidado intracelularmente se transforma en Rhodamina 123, compuesto fluorescente que indica la cantidad de peróxido de hidrógeno formado intracelularmente

3.4.5. Obtención del vino sin alcohol. Método y características

Para todos los experimentos se empleó el vino de la marca MONTE-VANNOS, Rivera del Duero, Crianza 1999, ya que contiene un elevado poder antioxidante, que determinamos mediante el método TRAP descrito anteriormente en el apartado 1.2.2 de la presente tesis

El vino una vez abierto se separó en distintas alícuotas y se congeló a -20°C para su conservación.

El vino sin alcohol se obtuvo por liofilización de la siguiente manera: una vez abierta la botella, se alicuotó en tubo de 50 mL y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, después se introdujo en un aparato de liofilización. Este proceso fisico-químico permite la sublimación del agua y del etanol presente en el vino, al mismo tiempo que conserva sus propiedades. Una vez obtenido el extracto se resuspendió en agua con el mismo volumen de partida, se alicuotó y congeló para su posterior empleo.

3.4.5.1. Grupos experimentales

Para determinar el efecto del consumo de vino y de vino sin alcohol se separaron 12 ratas macho, de edades comprendidas entre los 3 y 4 meses en jaulas individuales con las siguientes condiciones.

Grupo Control: animales que consumieron una dieta estándar de laboratorio y agua de bebida corriente *ad limitum*.

Grupo Vino: animales que consumieron una dieta estándar de laboratorio y vino diluido en agua (1:1 v:v) como bebida *ad limitum* durante 2 semanas.

Grupo Vino sin alcohol: animales que consumieron una dieta estándar de laboratorio y vino desalcoholizado diluido en agua (1:2 v:v) como bebida *ad limitum* durante 2 semanas.

Se pesaron los animales antes y después del estudio, también se controló el consumo de bebida y de pienso que consumieron durante los 14 días de tratamiento.

3.4.6. Extracción y conservación de los tejidos

Las ratas fueron sacrificadas mediante el método descrito anteriormente, la obtención y congelado de los tejidos se realizó lo más rápido posible, utilizando nitrógeno líquido para congelar por “freeze-clamping”. Se conservaron a -80°C para su posterior empleo.

Los tejidos congelados fueron: Cerebro, hígado, riñón y corazón.

3.4.7. Determinaciones enzimáticas

3.7.1. Obtención de la muestra

Pesamos una cantidad de tejido de aproximadamente de 100 mg, se mezcla con su respectivo tampón a una proporción de un 10%, se introduce en un “potter” de 2 mL y se homogeniza en frío. Posteriormente se introduce en tubos eppendorf, se centrifuga a 1500g para eliminar las partes de tejido que no han sido disgregadas y se recoge el sobrenadante.

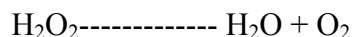
Con este sobrenadante obtenido se mide las distintas actividades enzimáticas.

3.4.7.2. Determinación de la actividad Catalasa

Fundamento

La catalasa cataliza dos tipos de reacciones:

- Descomposición del agua oxigenada:



- Oxidación de dadores de electrones como el metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles con el consiguiente consumo de peróxidos

Para la determinación de la actividad catalasa hemos seguido el método descrito por Aebi (Aebi, 1984). Éste está basado en la descomposición del H_2O_2 catalizada por la catalasa y que puede ser monitorizada en el ultravioleta a 240 nm. Siendo el coeficiente de extinción molar a 240 nm del H_2O_2 de $40 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

Reactivos

- Tampón fosfato 50 mM , pH 7.0
- Agua oxigenada 30 mM

Preparación de la muestra

El homogenado se realiza con el tampón fosfato al que se la añade inhibidor de proteasas (IP Sigma) diluido según especificaciones de la casa.

Procedimiento

La actividad catalasa se determina a temperatura ambiente.

En una cubeta de cuarzo se introducen 1.4 mL de tampón fosfato y 100 μL de una dilución 1/100 del homogenado. Es importante que la dilución sea preparada en el acto, ya que la catalasa no es estable en soluciones diluidas. La reacción se dispara al añadir 750 μL de agua oxigenada a 30 mM y se monitoriza durante 20-30 segundos a $\lambda=240$ nm.

Cálculos

Debido a la anormal cinética de descomposición del agua oxigenada no es posible definir una unidad internacional. Por tanto se prefiere utilizar la constante de velocidad de descomposición como una medida de la actividad enzimática, de forma que durante los 30 primeros segundos sigue una cinética de primer orden, donde:

$$K = (1/\Delta t)(\ln S_1/S_2)$$

K = constante de velocidad

Δt = el intervalo de medida en segundos (t_2-t_1)

S_1 = la concentración de H_2O_2 a t_1

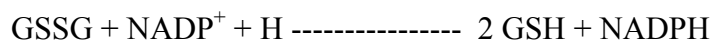
S_2 = la concentración de H_2O_2 a t_2

3.4.7.3. Determinación de la actividad Glutation Reductasa

Fundamento

La enzima glutatión reductasa (GR) es una proteína que cataliza la siguiente reacción:

GR



A 340 nm el NAPH absorbe proporcionalmente a su concentración, de modo que sabiendo su coeficiente de extinción molar podremos calcular la actividad de la enzima, ya que en la reacción por cada mol de NADPH formado se utiliza 1 mol de GSSG.

Reactivos

- Tampón fosfato potásico 0.2 M a pH 7.0, con EDTA 2mM
- NADPH 2 mM disuelto en TRIS-HCl 10 mM pH 7.0
- GSSG 20 mM en agua desionizada.

Procedimiento

En una cubeta se mezcla: 0,5 mL de tampón, 50 μL de NADPH, 50 μL de GSSG, y 350 μL de agua.

Se deja incubar a 30°C durante 5 minutos, se dispara la reacción con 50 μL de homogenado y se monitoriza durante al menos 2 minutos a 340 nm.

Cálculos

Se define una unidad de actividad glutatión reductasa como la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la reacción de un μmol de sustrato en 1 minuto y se expresan en unidades de enzima respecto a los mg de proteínas.

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

V_f = volumen final (mL)

V_m = volumen de muestra (mL)

ε = coeficiente de extinción molar de NADPH = 6.22 mM⁻¹ x cm⁻¹

d = paso de luz de la cubeta

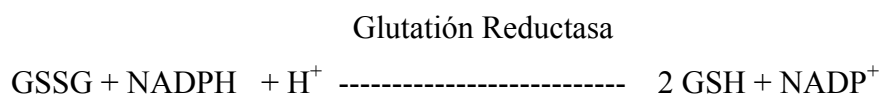
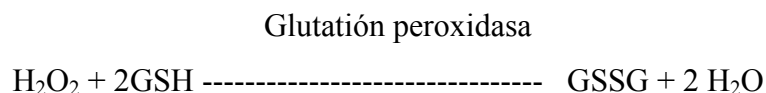
ΔA = incremento de los valores de absorbancia

Δt = incremento de tiempo

3.4.7.4. Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa

Fundamento

La actividad de la glutación peroxidasa (GPx) se determinó según el método propuesto por Flohe y cols. en 1984 (Flohe and Gunzler, 1984). La reacción que permite su análisis es la siguiente:



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

Reactivos

- Tampón fosfato potásico 0.1 M, EDTA 1 mM, azida sódica 1 mM, pH=7
- Glutación disulfuro reductasa 2.4 U/mL
- GSH 10 mM
- NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO₃ 0.1%
- Peróxido de hidrógeno 1.5 mM

Procedimiento

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

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

Después añadimos sucesivamente:

- 100 µL de la solución de glutatión reductasa
- 100 µL de la solución de glutatión

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

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

Cálculos

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

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

Siendo:

V_f = volumen final (mL)

V_m = volumen de muestra (mL)

ε = coeficiente de extinción molar (para el NADPH= 6.22 mM⁻¹ x cm⁻¹)

d = paso de luz de la cubeta

ΔA = incremento de los valores de absorbancia

Δt = incremento de tiempo

3.4.7.5 Determinación de la actividad Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Fundamento

La actividad de la enzima Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) cataliza la reacción:



La actividad de la enzima se determina por la monitorización de la formación de NADPH a 340 nm.

Reactivos

- Tampón trietanolamina 0.1 M pH 7.6
- Glucosa 6 fosfato 10 mM
- NADP⁺ 0.4 mM
- MgCl₂ 0.1 M

Procedimiento

Las concentraciones finales en una cubeta ensayo de 1 mL son las siguientes:

- Tampón trietanolamina 86 mM.
- NADP⁺ a 0.4 mM,
- Glucosa 6 fosfato a 1 mM.
- MgCl₂ 6.9 mM.
- 20 µL de muestra.

La reacción se monitoriza a 340 nm, 25°C durante al menos 1 minuto.

Cálculos

El cálculo de la actividad se realiza con las unidades internacionales de las enzimas respecto a los miligramos de tejido cargados en la cubeta, igual que en el apartado anterior.

4. Moscas *Drosophila melanogaster*.

3.4.1 Cultivo

La cepa utilizada para todos los experimentos es Oregón R, cedida por el Departamento de Genética de la Facultad de ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

Las moscas se incuban a 25°C con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Como alimento las moscas en estado salvaje se alimentan de levaduras que fermentan en jugos de plantas. Para su mantenimiento en el laboratorio se puede preparar una comida a base de harina de maíz, azúcar y levadura, empleando agar como espesante. Para evitar la proliferación de hongos se la añade un antifúngico, normalmente nipagín (metilo de p-oxibenzoato) y un antibacteriano (ácido propiónico).

Para la preparación de 1 litro de cultivo procedemos de la siguiente forma:

1. Poner en una cazuela:
 - 900 mL de agua corriente
 - 10 g de agar
 - 60 g de harina de maíz
 - 50 g de azúcar
2. Hervir durante al menos 5 minutos agitando continuamente
3. Añadir 25 g de levadura disueltos en 100 mL de agua corriente y llevar a ebullición durante 5 minutos más.
4. Retirar del fuego y enfriar durante 2-4 minutos
5. Añadir a la papilla:
 - 3 g de nipagín disueltos en 10 mL de etanol

- 5 mL de ácido propiónico.
6. Homogenizar la mezcla. En este punto la papilla todavía está líquida y puede ser decantada en los distintos viales, tanto para la cría como para los estudios de longevidad.

3.4.2. Obtención de los grupos de experimentación

Para obtener las moscas del experimento se introducen 40 machos y 40 hembras en un frasco de cultivo (botella 250 mL) con papilla, se dejan durante tres días para que las hembras después de ser copuladas pongan los huevos en ella, de ahí van a salir las larvas que tras pasar por los distintos estadios se transformarán en pupas y de ahí en adultos. Estos adultos recién nacidos son recogidos en un periodo de 48 horas después de la primera eclosión y tomados para el experimento de longevidad.

Una vez obtenidos los recién nacidos se duermen colocándolos en frío y se separan los machos para el experimento.

3.4.3. Grupos experimentales

Se colocaron 50 machos en botes de metacrilato especiales para la realización de curvas de longevidad de aproximadamente 2 L de capacidad. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Grupo Control: consumía la papilla estándar
- Grupo Vino: para este grupo se añadió a la papilla 4 mL de vino por cada mL de papilla
- Grupo Vino sin alcohol: la eliminación del etanol se realizó según lo descrito en el apartado 3.6 Del cual se le añadió a la papilla 4 mL por cada mL de papilla.

La comida fue cambiada una vez a la semana y el control de las moscas muertas cada se realizó cada 2 ó 3 días.

3.4.4. Determinación de la expresión de genes

La determinación de la expresión de genes se realizó en los distintos grupos experimentales tras la obtención del RNA total de la mosca siguiendo el mismo procedimiento señalado en los apartados 3.3.2.8 de la presente tesis.

3.4.5. Determinación de la Curva de longevidad

Para la construcción de la curva, se contaron las moscas muertas cada dos días. Los datos se introdujeron en una página “Excel”, en la cual se combinaron los porcentajes de supervivencia con los días de vida correspondientes.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

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

El estadístico utilizado para la valoración de las curvas de supervivencia fue el test de Kaplan-Meier para la determinación de curvas de supervivencia. Para ello se utilizó el programa de estadística SPSS.

Con respecto a los resultados de expresión obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real, en primer lugar se estudió mediante ANOVA si había algún

grupo experimental que presentaba diferencias estadísticamente significativas, y en caso de demostrarse diferencia por parte de alguno de los grupos, se utilizó el test de Tukey de múltiples comparaciones.

RESULTADOS

4.1 Mecanismo de acción antioxidante del estradiol en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7).

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que el 17 β -estradiol, a concentraciones fisiológicas, disminuye los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7) (Borras, 2003). El efecto antioxidante ocurre tras 48 horas de incubación con estradiol, descartando una acción química antioxidante directa, puesto que a tiempos más cortos de incubación no ejerce ningún efecto sobre los peróxidos. Por ello nos planteamos el estudio del mecanismo por el cual el estradiol ejerce su efecto antioxidante.

4.1.1 Papel de los receptores estrogénicos sobre el efecto antioxidante del estradiol en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7)

La figura 4.1 muestra el efecto del estradiol sobre los niveles de peróxido de hidrógeno, cuando incubamos las células MCF-7 durante 48 horas con:

- **17 β -estradiol 0,2 nM:** los niveles de peróxidos disminuyen significativamente frente al control.
- **tamoxifeno 15 μ M:** un modulador de receptores estrogénicos, que en estas células actúa como antagonista competitivo. No afecta a los niveles de peróxido de hidrógeno.
- **estradiol y tamoxifeno conjuntamente,** no se ven afectados los niveles de peróxidos frente al control.

Por lo tanto el 17β -estradiol, a concentraciones fisiológicas, disminuye los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 tratadas durante 48 horas. Este efecto está mediado por receptores estrogénicos ya que al incubar conjuntamente estradiol con tamoxifeno el efecto antioxidante de éste se revierte.

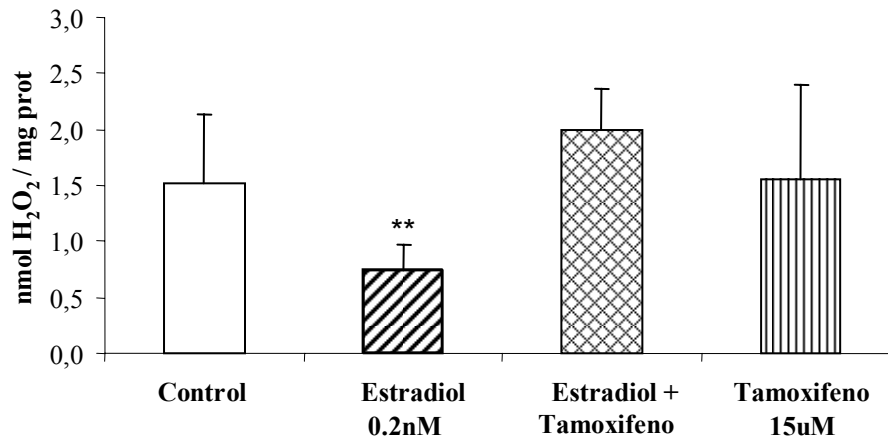


Figura 4.1 Papel del estradiol y los receptores estrogénicos sobre los niveles de H₂O₂ en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7)

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control

4.1.2 Papel de los receptores estrogénicos de membrana sobre el efecto antioxidante del estradiol en células MCF-7.

Existen dos tipos de receptores estrogénicos descritos según su localización celular: receptores de membrana y receptores nucleares.

Para poder determinar la posible implicación de uno u otro en el efecto antioxidante del estradiol, usamos 17β -estradiol unido a albúmina (BSA), que impide al estradiol entrar en la célula, actuando sobre receptores ubicados en la membrana plasmática.

Como vemos en la figura 4.2 el efecto antioxidante del estradiol está mediado por receptores estrogénicos de membrana, ya que la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno también se produce cuando incubamos células MCF-7 con estradiol-BSA durante 48 horas.

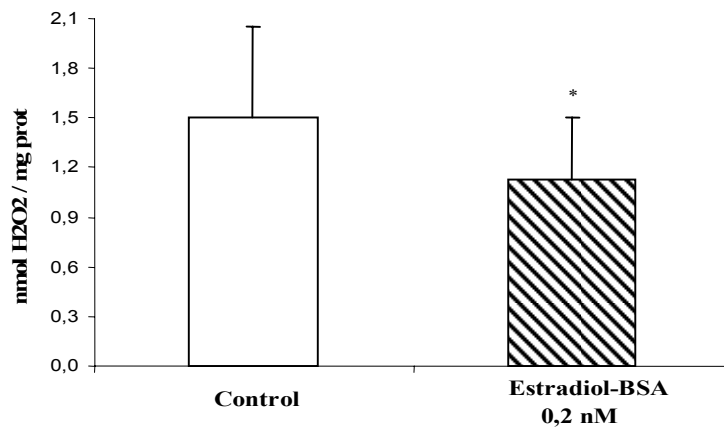


Figura 4. 2. Papel de los receptores estrogénicos de membrana sobre el efecto antioxidante del estradiol en células MCF-7.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

El grupo control corresponde a 10 experimentos y 8 para el experimental. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

4.1.3 Efecto del estradiol sobre la fosforilación de ERK 1/2 en células MCF-7. Papel de MEK 1/2.

Se sabe que los estrógenos a concentraciones fisiológicas, activan distintas vías de señalización a través de sus receptores de membrana, entre ellas activa la vía de las MAPKs, como la de ERK1/2. La activación es muy rápida, de minutos e incluso segundos.

La figura 4.3 muestra, mediante la técnica western blotting, el efecto del estradiol sobre la fosforilación de ERK1/2 a concentraciones fisiológicas (0,2 y 0,02 nM) en células MCF-7 incubadas durante 3 minutos. Podemos observar como:

- En situaciones basales, ERK1/2, presenta unos niveles bajos de fosforilación, **Control**.
- La incubación de células con **estradiol** a concentraciones fisiológicas (0,2 – 0,02 nM) durante 3 minutos, induce la fosforilación de ERK1/2.
- La adición de un inhibidor de la fosforilación de ERK1/2, **U0126** (1µM), disminuye los niveles de ERK1/2 fosforilado.

Así pues, el estradiol a concentraciones fisiológicas activa la cascada de señalización de las MAPK, concretamente de ERK1/2 a través de la fosforilación de MEK.

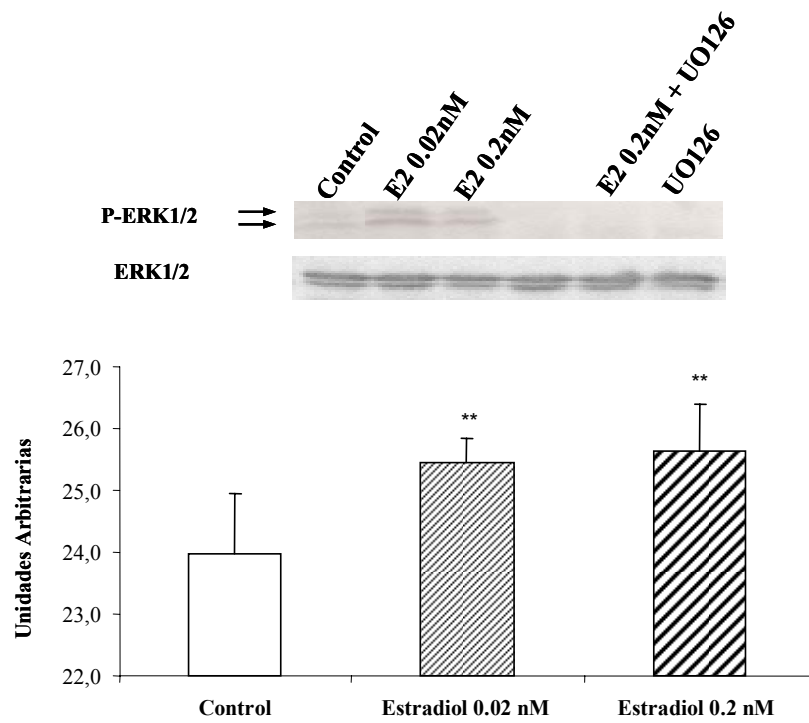


Figura 4.3 (a) Efecto del estradiol a 0,2 y 0,02 nM sobre la fosforilación de ERK 1/2.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada grupo corresponde a 10 experimentos. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control

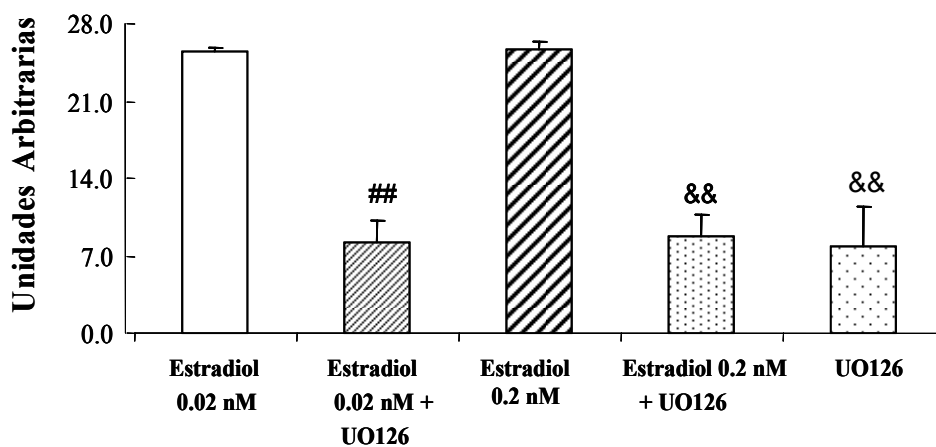


Figura 4.3 (b) Papel de MEK 1/2 en la activación de ERK1/2 por el estradiol.
 Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada grupo corresponde a 10 experimentos. La significación estadística se expresa como ## $p < 0.01$ frente al estradiol 0,02 nM y && $p < 0.01$ frente al estradiol 0,2 nM..

4.1.4 Papel de ERK1/2 en el efecto antioxidante del estradiol en células MCF-7.

La figura 4.4 muestra el papel de las MAPK sobre el efecto antioxidante del estradiol en células MCF-7, cuando son incubadas con estradiol (0,02 y 0,2 nM) y U0126 (1 μ M), inhibidor de MEK 1/2, durante 48 horas.

El tratamiento conjunto de estradiol y U0126 revierte el efecto antioxidante del estradiol. Por lo tanto la activación de las MAPK está implicada en el efecto antioxidante del estradiol.

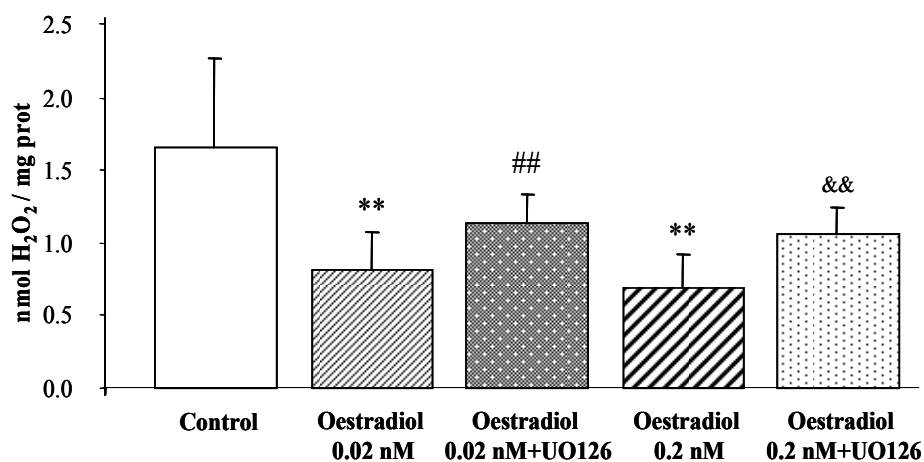


Figura 4.4 Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7. Papel de ERK 1/2.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control, ## $p < 0.01$ frente al estradiol 0,02 nM y && $p < 0.01$ frente al estradiol 0,2 nM.

4.1.5 Efecto del estradiol sobre la translocación de NF- κ B al núcleo en células MCF-7. Papel de ERK1/2.

Concentraciones fisiológicas de estradiol inducen la translocación de NF- κ B al núcleo. La figura 4.5 muestra cómo los niveles de la subunidad p50 de NF- κ B son mayores en núcleos aislados de células MCF-7 incubadas con estradiol (0,2 y 0,02 nM) durante 48 horas, en comparación con los controles.

El bloqueo de la vía de señalización de las MAPK con U0126 (inhibidor de MEK1/2), revierte la translocación de NF- κ B al núcleo inducida por el estradiol.

Por tanto en la vía de señalización de las MAP Kinasas, ERK1/2 está implicada en la activación de NF- κ B por el estradiol a concentraciones fisiológicas.

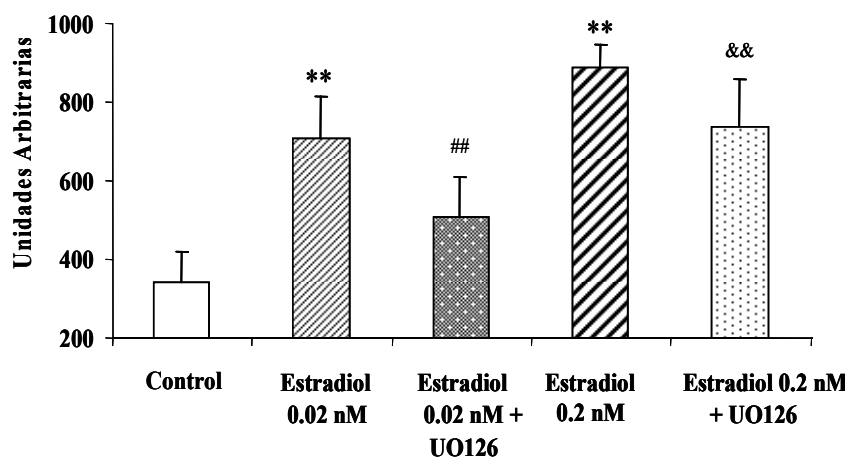


Figura 4. 5 Actividad de la subunidad p50 de NF- κ B en núcleos aislados de células MCF-7. Papel de ERK 1/2.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control, ## $p < 0.01$ frente al estradiol 0,02 nM y && $p < 0.01$ frente al estradiol 0,2 nM.

4.1.6 Papel de NF- κ B en el efecto antioxidante del estradiol en células MCF-7.

Para estudiar el posible papel de NF- κ B, en el efecto antioxidante del estradiol, usamos un inhibidor de su forma activa el pirrolidinditiocarbonato (PDTC).

La figura 4.6 muestra como al incubar estradiol 0,02nM y PDTC 1mM, al mismo tiempo en células MCF-7 durante 48 horas, se revierte el efecto antioxidante del estradiol hasta obtener niveles de peróxido de hidrógeno comparables al control.

Por lo tanto, la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno está mediada por la translocación de NF- κ B al núcleo.

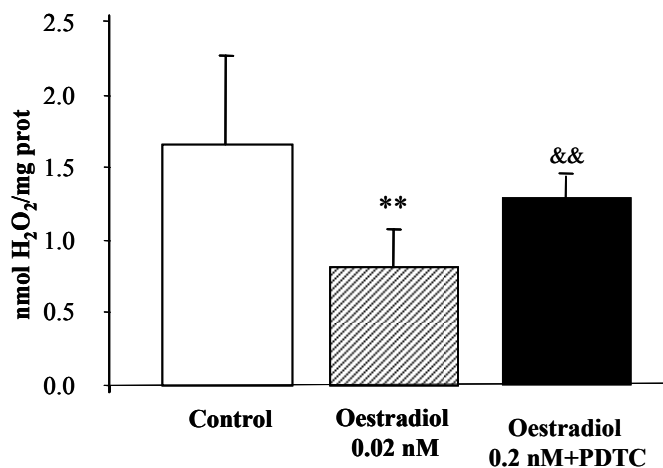


Figura 4. 6. Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 Papel de NF κ B en el efecto antioxidante del estradiol.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control, && $p < 0.01$ frente al estradiol 0,02 nM.

4.1.7 Efecto del estradiol sobre la expresión de enzimas antioxidantes de longevidad en células MCF-7. Papel de ERK1/2 y NF-κB

El estradiol a concentraciones fisiológicas ejerce un efecto antioxidante en células MCF-7 mediado por ERK 1/2 y NF-κB.

Resultados *in vivo* realizados en nuestro laboratorio muestran que las ratas hembras sobreexpresan frente a los machos dos enzimas antioxidantes: la glutatión peroxidasa y la Mn-superóxido dismutasa. Esta sobreexpresión es la responsable de que las hembras tengan un menor estrés oxidativo en comparación con los machos (Borras, 2003).

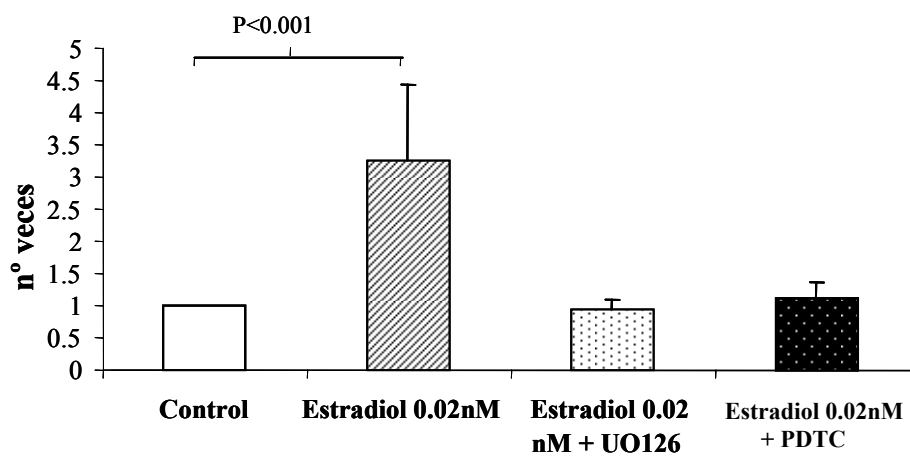
Nuestro objetivo es determinar si estas dos enzimas también están implicadas en el efecto antioxidante del estradiol *in vitro*, en células humanas, y además estudiar el posible papel de ERK 1/2 y NF-κB.

La figura 4.7. muestra como:

- **Mn-Superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa**, se sobreexpresan al tratar las células con **estradiol** a concentraciones fisiológicas (0,2 y 0,02 nM) durante 48 horas.
- El tratamiento con inhibidores, tanto de la vía de señalización de las MAPKs (**U0126**) como de NF-κB (**PDTC**), revierte el efecto del estradiol sobre la expresión de estas dos enzimas antioxidantes.

Por tanto, ambas vías están implicadas en el efecto del estradiol a concentraciones fisiológicas sobre la expresión de tales enzimas antioxidantes.

A) Expresión de Mn-Superóxido dismutasa



B) Expresión de Glutación peroxidasa

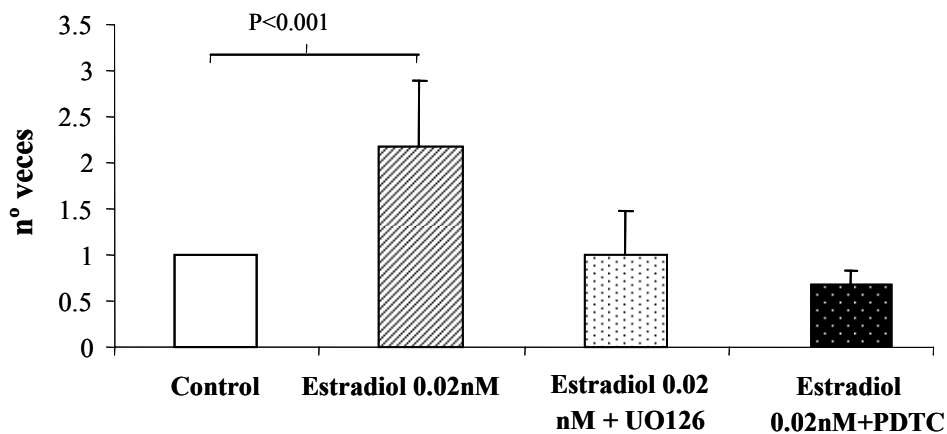


Figura 4. 7. Niveles de RNA mensajero de Mn-SOD (a) y Glutación peroxidasa (b) en células MCF-7 tratadas con estradiol e inhibidores durante 48 horas.

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=4), para cada grupo relativo al grupo control tras normalizar con la expresión de GAPDH. La significación estadística se expresa como $p < 0.001$ frente a grupo control.

4.1.8 Propuesta del mecanismo de acción antioxidante del estradiol en células MCF-7.

Nuestra hipótesis es la siguiente:

- El estradiol se une a los receptores estrogénicos de membrana.
- Vía segundos mensajeros activa la fosforilación de las MAPKs (ERK^{1/2} fosforilada).
- Las MAPKs activan la translocación de NFκB al núcleo.
- El factor de transcripción NF-κB se une a la secuencia del promotor de GPx y Mn-SOD, activando su transcripción.
- El incremento de GPx y Mn-SOD reduce los niveles peróxido de hidrógeno.

4.2 La genisteína mimetiza el efecto antioxidante del estradiol. Mecanismo de acción

Los resultados anteriormente descritos muestran un efecto favorable del estradiol frente al estrés oxidativo. Sin embargo, la administración de estrógenos a humanos presenta una serie de efectos muy perjudiciales, tales como riesgo de cáncer (Rossouw et al., 2002) o efecto feminizante en varones.

Desde hace unos años se están estudiando los fitoestrógenos, que son moléculas que mimetizan los efectos de los estrógenos y se encuentran en plantas. Una fuente rica de estas sustancias se encuentra en la soja, a la que se le atribuyen muchas propiedades beneficiosas y que presenta unos

niveles de fitoestrógenos altos, siendo la genisteína el fitoestrógeno más abundante.

Los siguientes resultados muestran cómo la genisteína presenta un efecto favorable sobre el estrés oxidativo, mimetizando el efecto del estradiol anteriormente presentado.

4.2.1 Efecto de la genisteína a distintas concentraciones sobre los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7.

La figura 4.8 muestra los niveles de peróxido de hidrógeno, en células MCF-7 incubadas con distintas concentraciones de genisteína durante 48 horas. La genisteína a la concentración 0,5 μM es capaz de disminuir los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7. Estas son las concentraciones que podemos encontrar en personas que consumen habitualmente soja (Adlercreutz et al., 1993) y son por tanto nutricionalmente relevantes. Ello ocurre sólo cuando incubamos las células durante 48 horas, no encontrando efecto antioxidante a menores tiempos.

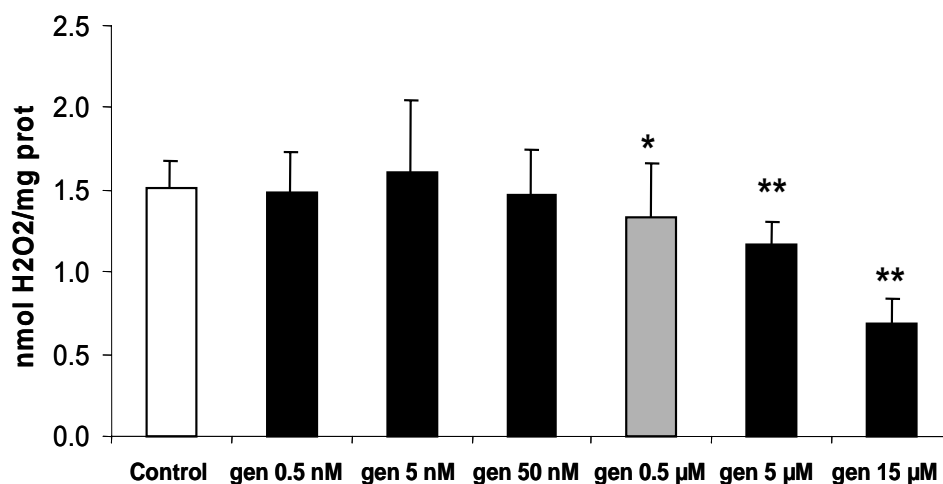


Figura 4.8. Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 tratadas con genisteína a distintas concentraciones.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 9 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

4.2.2 Valoración del efecto de la genisteína, a concentraciones nutricionalmente relevantes, como antioxidante químico.

Para descartar el posible efecto antioxidante directo de la propia molécula, se determinó, mediante el método TRAP, las capacidades antioxidantes de los medios de cultivo empleados en las incubaciones de las células MCF-7.

La figura 4.9 muestra que la concentración de 0,5 μ M empleada no presenta una capacidad antioxidante *per se*, de modo que el efecto antioxidante es debido a una acción indirecta de la genisteína sobre las células MCF-7.

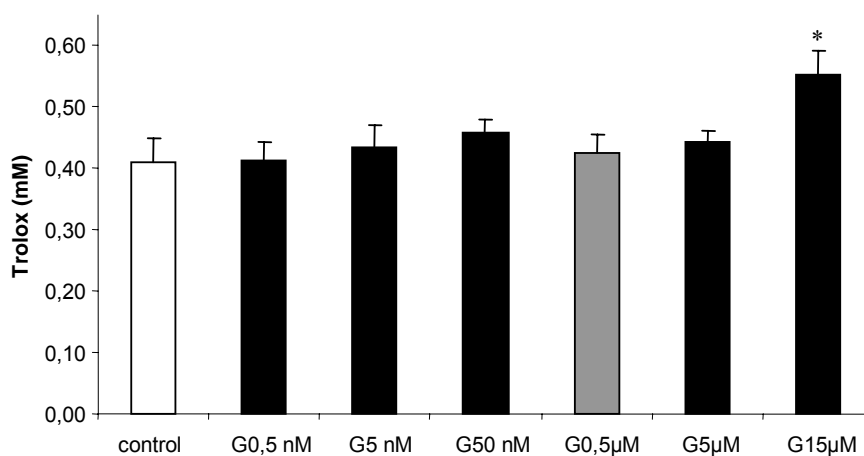


Figura 4.9. Capacidad antioxidante, de medios de cultivo con distintas concentraciones de genisteína, frente a trolox.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 6 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

4.2.3 Papel de los receptores estrogénicos sobre el efecto antioxidante de la genisteína en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7)

La figura 4.10 muestra que los receptores estrogénicos están implicados en el efecto antioxidante de la genisteína. El tamoxifeno, un modulador de receptores estrogénicos, que en células de glándula mamaria actúa como antagonista, es capaz de prevenir la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno detectados en células MCF-7 incubadas con 0,5 μ M de genisteína durante 48 horas.

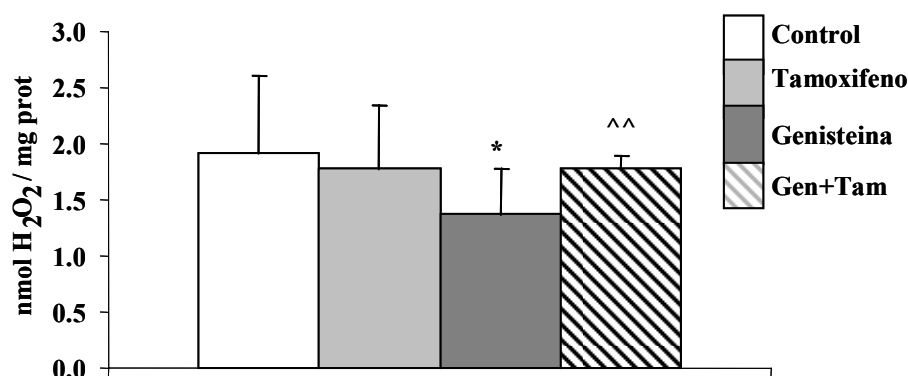


Figura 4.10. Niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7 tratadas con genisteína a concentraciones nutricionales. Papel de los receptores estrogénicos.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control y ^^ $p < 0,01$ frente a genisteína.

4.2.4 Efecto de la genisteína sobre la fosforilación de ERK1 1/2 en células MCF-7. Papel de los receptores estrogénicos.

La figura 4.11 muestra que al incubar células MCF-7 con genisteína 0,5 μM durante 3 minutos, se induce la fosforilación de ERK1/2.

Cuando incubamos conjuntamente las células MCF-7 con genisteína 0,5 μM y con:

- 1 μM de U0126 (inhibidor de MEK1/2): se previene la fosforilación de ERK1/2.
- tamoxifeno a 15 μM : se previene la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la genisteína.

Por lo tanto la genisteína, a concentraciones nutricionalmente relevantes, activa la fosforilación de las MAPKs por medio de los receptores estrogénicos.

Figura 4.11 (a)

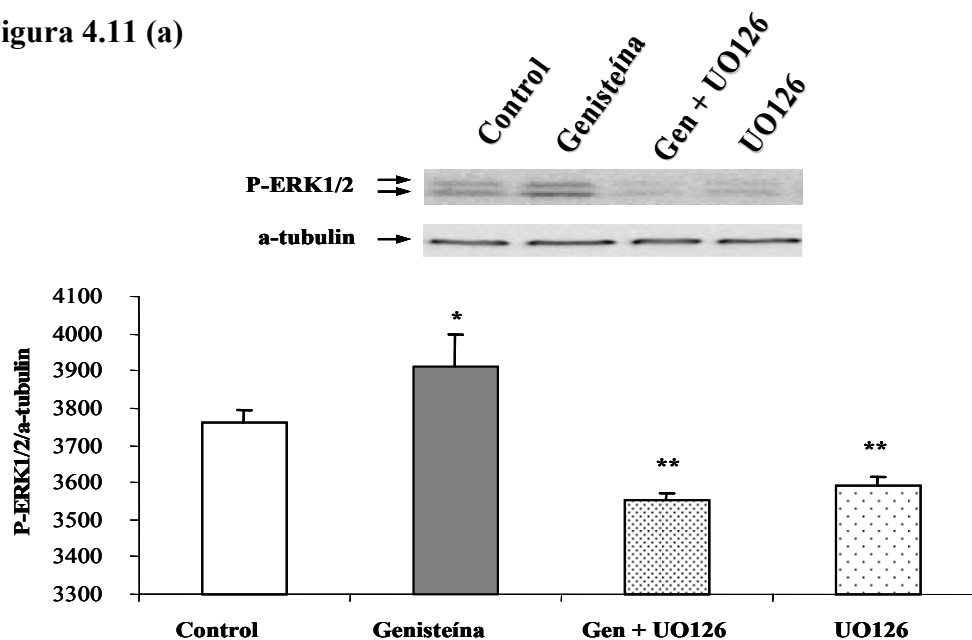


Figura 4.11 (b)

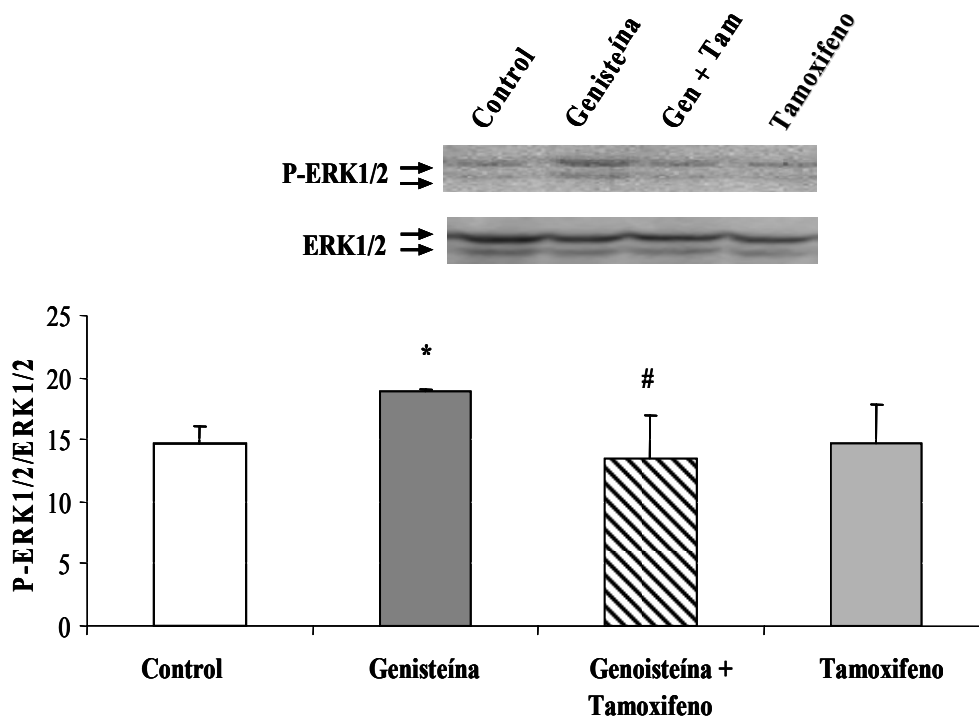


Figura 4.11. Efecto de la genisteína sobre la fosforilación de ERK1/2 en células MCF-7 (a). Papel de los receptores estrogénicos (b).

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ frente al control y # $p < 0.05$ frente a genisteína.

4.2.5 Efecto de la genisteína sobre la translocación de NF- κ B al núcleo en células MCF-7, papel de ERK1/2.

El tratamiento de células MCF-7 con genisteína induce la translocación de NF- κ B al núcleo.

La figura 4.12 muestra cómo la incubación de células MCF-7 con genisteína 0,5 μ M, incrementa los niveles de la subunidad p50 en extractos nucleares de células MCF-7. La activación de NF κ B está mediada por la vía de señalización de las MAPK, ya que al incubar conjuntamente las células con genisteína y un inhibidor de la fosforilación de ERK1/2, U0126 1 μ M, se previene la translocación de NF- κ B al núcleo.

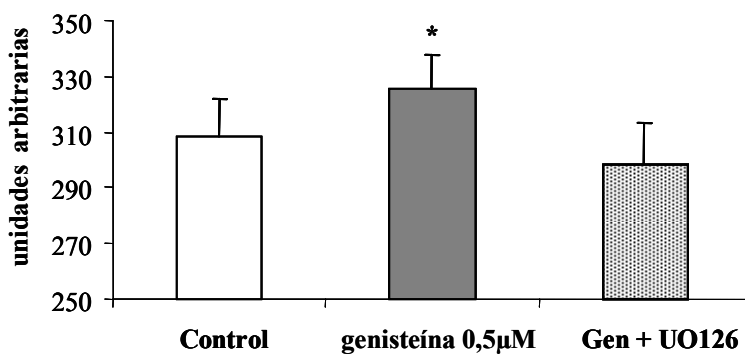


Figura 4.12. Actividad de la subunidad p50 de NF- κ B en núcleos aislados de células MCF-7. Papel de ERK1/2.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0,05$ frente al control.

4.2.6 Efecto de la genisteína sobre la expresión de enzimas antioxidantes de longevidad en células MCF-7. Papel de ERK1/2 y de NF- κ B.

La figura 4.13 muestra que al incubar células MCF-7 con genisteína durante 48 horas, se induce la expresión de la Mn-SOD. Esta inducción se previene cuando incubamos las células con genisteína 0,5 μ M y U0126 (1 μ M), confirmando que la vía de las MAPK está implicada en el efecto de la genisteína sobre la expresión de la enzima antioxidante.

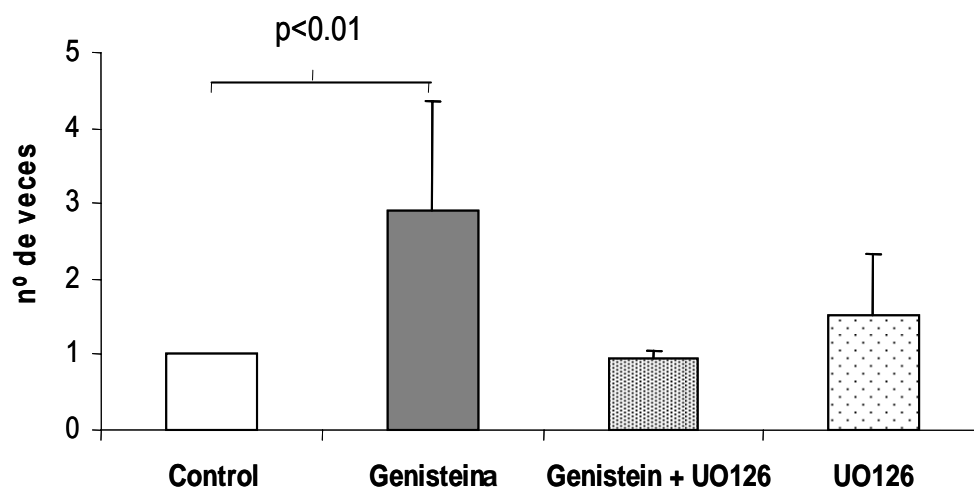


Figura 4.13 Expresión de Mn-SOD en células MCF-7 incubadas con genisteína y un inhibidor de la fosforilación de ERK 1/2 (U0126).

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 4 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

4.2.7 Papel de ERK1/2 en el efecto antioxidante del estradiol en células MCF-7

Al incubar las células MCF-7 durante 48 horas con genisteína, los niveles de peróxido de hidrógeno disminuyen significativamente (ver figura 4.10). Sin embargo, al incubar conjuntamente genisteína con el inhibidor de la fosforilación de ERK1/2 (U0126 1uM), los niveles de peróxidos no se ven afectados frente al control. Ello sugiere que el efecto antioxidante de la genisteína está mediado por la vía de señalización de las MAPK (ver figura 4.14).

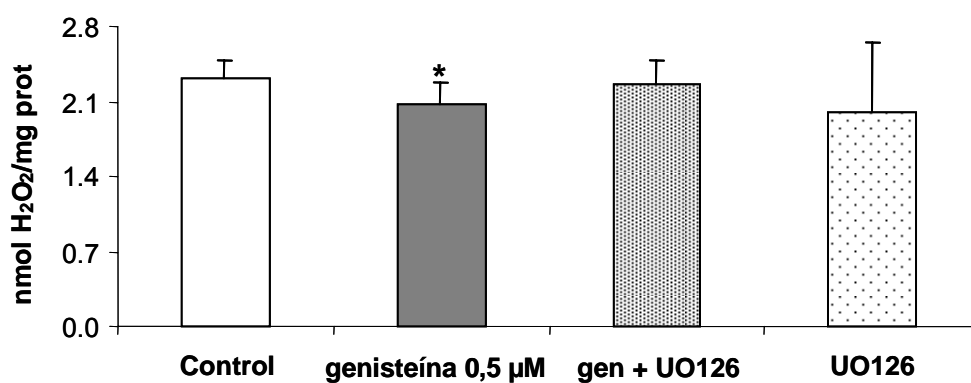


Figura 4.14 Niveles de peróxido de hidrogeno en células MCF-7. Papel de ERK1/2.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

Este efecto se confirmó por otro método. Mediante la citometría de flujo y usando dihidrorodamina 123 como marcador de los niveles peróxido de hidrógeno, pudimos corroborar los resultados obtenidos anteriormente.

	nmol H₂O₂/ mg prot
Control	1.81 ± 0.42
0.5 µM genisteína	1.49 ± 0.40*
0.5 µM genisteína + 1mM U0126	2.25 ± 0.22#
1mM UO126	1.99 ± 0.66

Tabla 4.1 Medida de los niveles de peróxido de hidrogeno en células MCF-7 mediante citometría de flujo.

Los valores de los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 10 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * p< 0,05 frente al control y # p<0,05 frente a genisteína.

4.2.8 Propuesta del mecanismo de acción antioxidante de la genisteína en células MCF-7.

Nuestra hipótesis es la siguiente:

- La genisteína se une a los receptores estrogénicos de membrana.
- Vía segundos mensajeros activa la fosforilación de las MAPKs (ERK½ fosforilada).
- Las MAPKs activan la translocación de NFκB al núcleo.

- El factor de transcripción NF- κ B se une a la secuencia del promotor de GPx y Mn-SOD, activando su transcripción.
- El incremento de GPx y Mn-SOD reduce los niveles de peróxido de hidrógeno.

4.3 Efecto antioxidante DIRECTO del estradiol o la genisteína en mitocondrias aisladas de hígado de ratas macho.

4.3.1 Efecto del estradiol sobre la producción de peróxidos por mitocondrias aisladas de hígado de ratas macho.

El estradiol disminuye la producción de peróxidos en mitocondrias aisladas de hígado de ratas macho.

La figura 4.15 muestra cómo la incubación de mitocondrias aisladas de hígado de ratas macho durante 1 hora con concentraciones fisiológicas de estradiol (0.2 nM), disminuye significativamente la producción de peróxido de hidrógeno, determinado mediante fluorimetría (véase Material y Métodos). Las condiciones de tratamiento de las mitocondrias con estradiol (1 hora de incubación con 0.2 nM de estradiol a 37°C) se establecieron mediante la realización de curvas de concentración y tiempo, resultados no incluidos en la presente tesis. (Sirva esta explicación para los siguientes puntos del apartado 4.3).

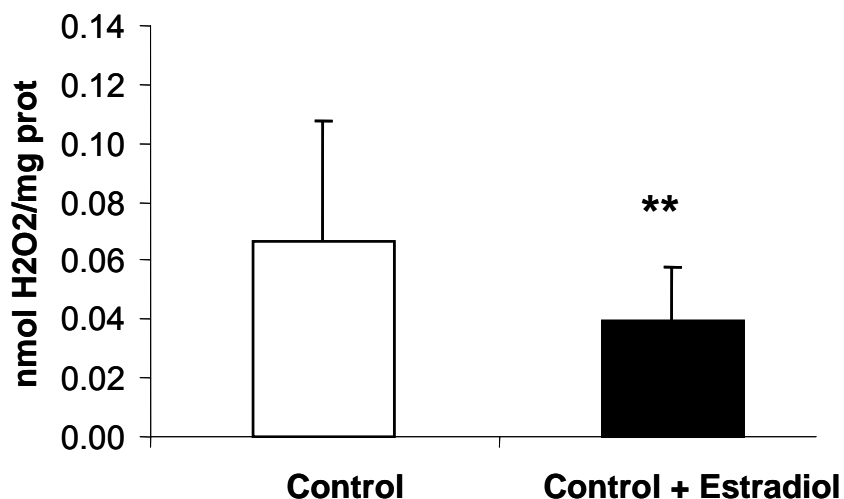


Figura 4.15. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 9 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

4.3.2 Papel de los receptores estrogénicos de membrana en el efecto antioxidante del estradiol

La incubación de mitocondrias aisladas con estradiol unido a albúmina (BSA), que impide la entrada de éste dentro de la mitocondria, produce el mismo efecto antioxidante que el estradiol libre (ver figura 4.16). Ello supone que los recientemente descubiertos receptores estrogénicos mitocondriales de membrana (Chen et al., 2004) están implicados en el efecto antioxidante del estradiol directo sobre las mitocondrias.

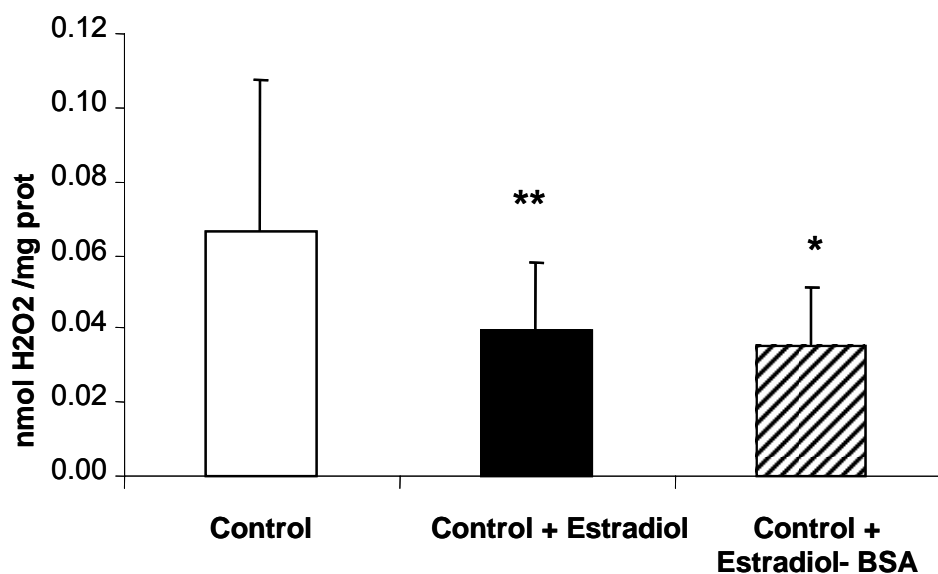


Figura 4.16. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 7-9 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ frente al control.

Otra prueba de la implicación de receptores en el efecto antioxidante del estradiol, es la demostración de que tal efecto es saturable, como puede comprobarse en la figura 4.17, concentraciones crecientes de estradiol saturan el efecto antioxidante del mismo.

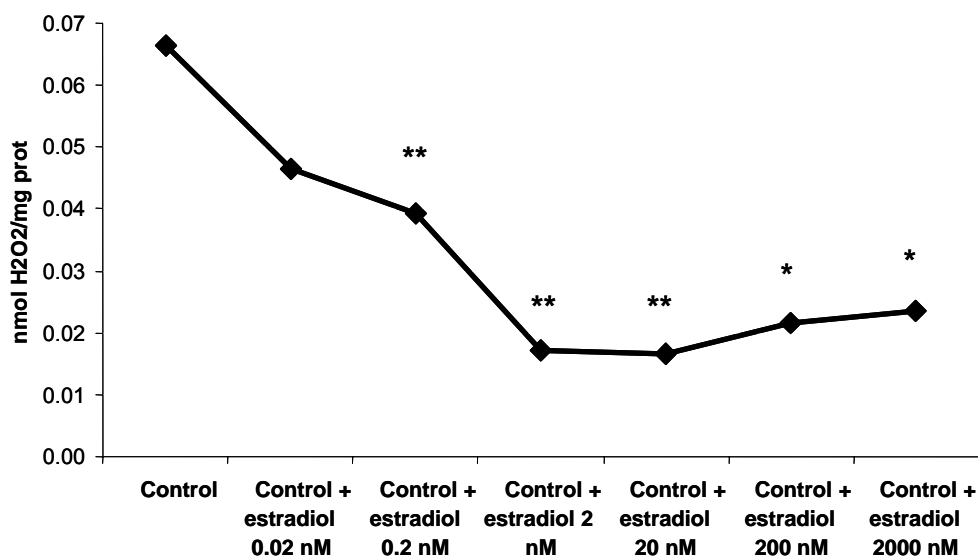


Figura 4.17. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho incubadas con concentraciones crecientes de estradiol

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 5-9 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ frente al control.

4.3.3 El estradiol produce un aumento del potencial de membrana en mitocondrias hepáticas de ratas macho.

Como se puede observar en la figura 4.18, las mitocondrias hepáticas, tras incubación con estradiol 0.2 nM durante 1 hora a 37°C, presentan un mayor potencial de membrana mitocondrial que las control. Ello supone que las mitocondrias con estradiol presentan un estado más favorable que las no tratadas, y nos conduce a pensar que puede ser porque

el estradiol actúe impidiendo la salida de citocromo c, como veremos en el siguiente punto.

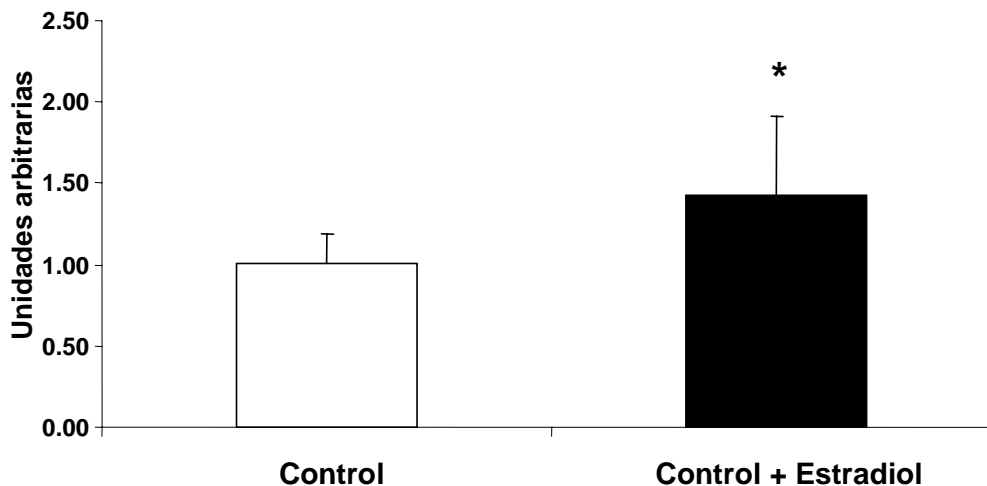


Figura 4.18. Potencial de membrana en mitocondrias hepáticas de ratas macho

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 6 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

4.3.4 El estradiol impide la salida de citocromo c en mitocondrias hepáticas de ratas macho.

El estradiol a concentraciones fisiológicas impide la salida de citocromo c de las mitocondrias. El citocromo c, como componente de la cadena respiratoria mitocondrial que es, actúa como antioxidante porque participa en la reducción del último electrón del oxígeno que se produce en el seno de la enzima citocromo c oxidasa (Skulachev, 1998). Por tanto, el hecho de que el estradiol impida la salida de citocromo c de la mitocondria

podría ser el factor responsable del efecto antioxidante directo del estradiol sobre las mitocondrias. Las figuras 4.19 y 4.20 muestran la cantidad de citocromo c en las mitocondrias y en el sobrenadante respectivamente.

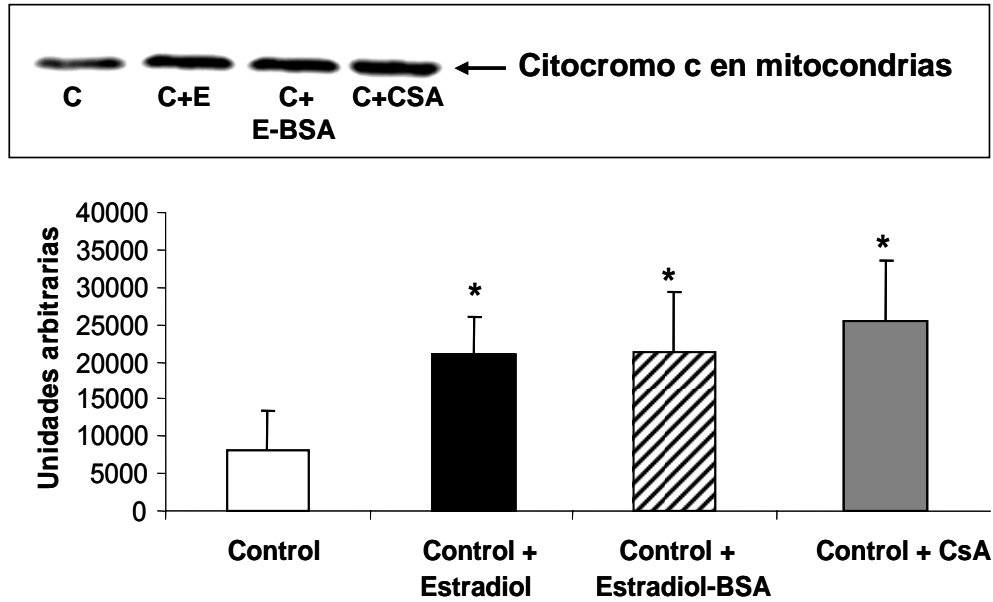


Figura 4.19. Cantidad mitocondrial de citocromo c

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 6 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

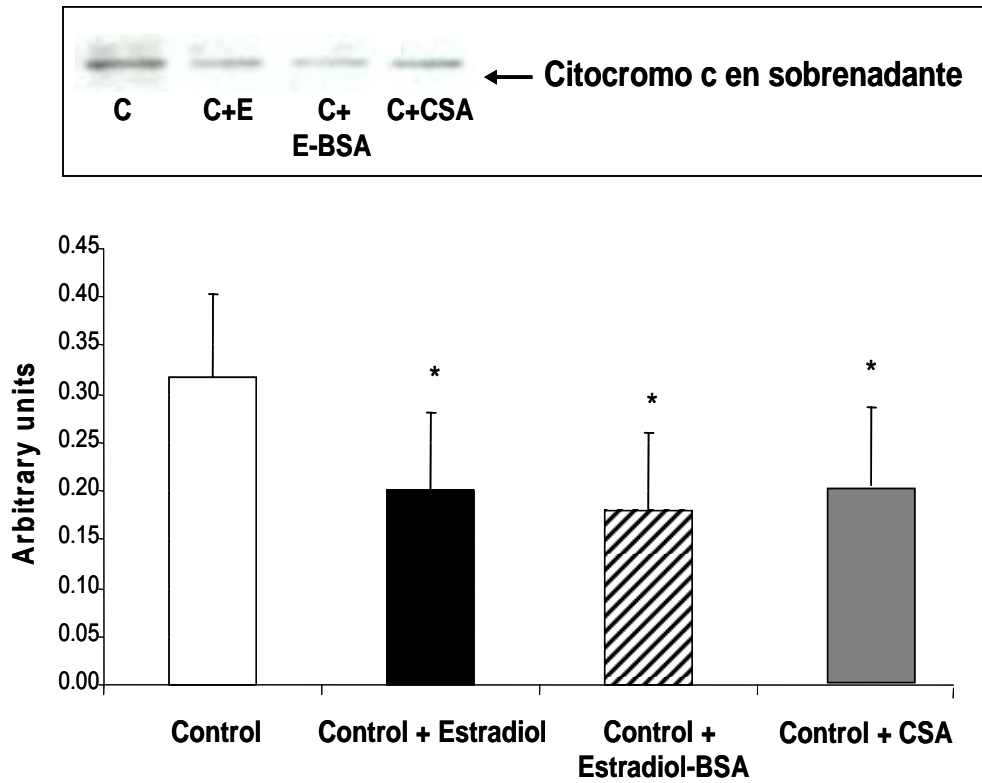


Figura 4.20. Cantidad de citocromo c en el sobrenadante mitocondrial

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 6 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

4.3.5 La genisteína reproduce los efectos del estradiol. Actúa directamente como antioxidante en mitocondrias hepáticas de ratas macho.

La genisteína, a concentraciones nutricionalmente relevantes (0.5 μ M) disminuye la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas incubadas durante una hora (ver figura 4.21).

Del mismo modo que el estradiol, actúa reteniendo al citocromo c en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, y por tanto disminuye la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno (ver figura 4.22 y 4.23).

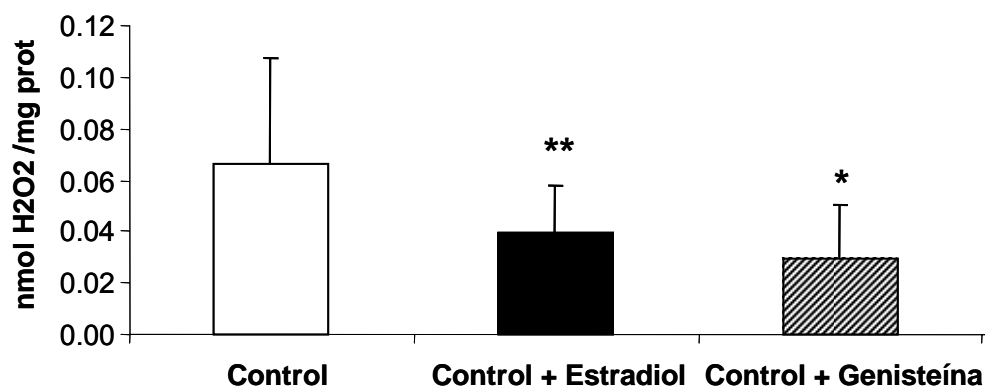


Figura 4.21. Producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas de ratas macho.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 6-9 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ frente al control.

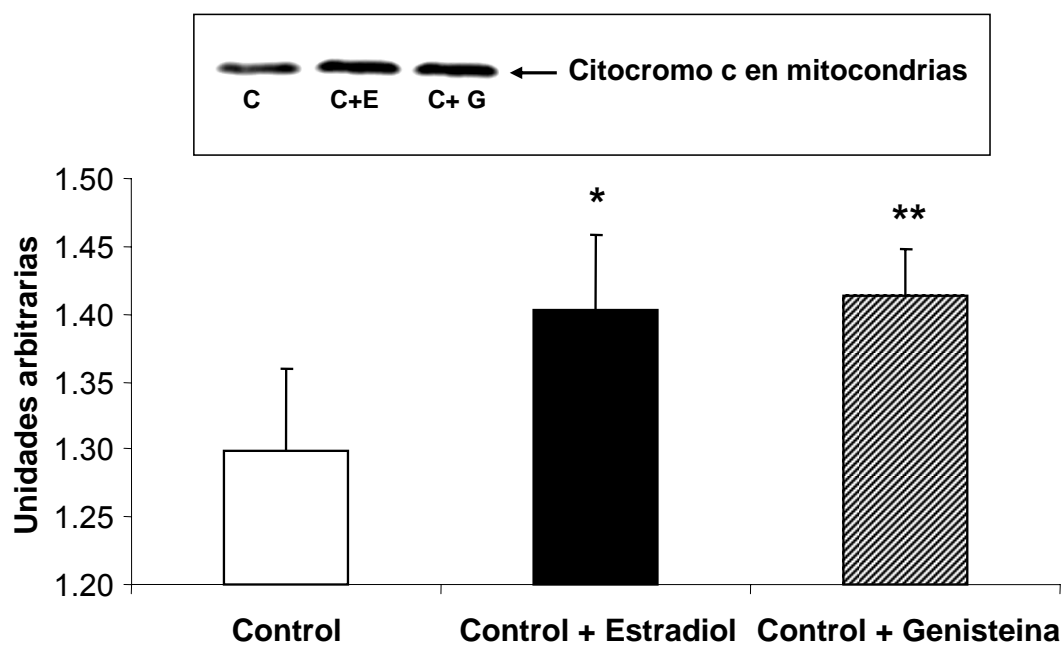


Figura 4.22. Cantidad mitocondrial de citocromo c

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Cada punto corresponde a la media de 6 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

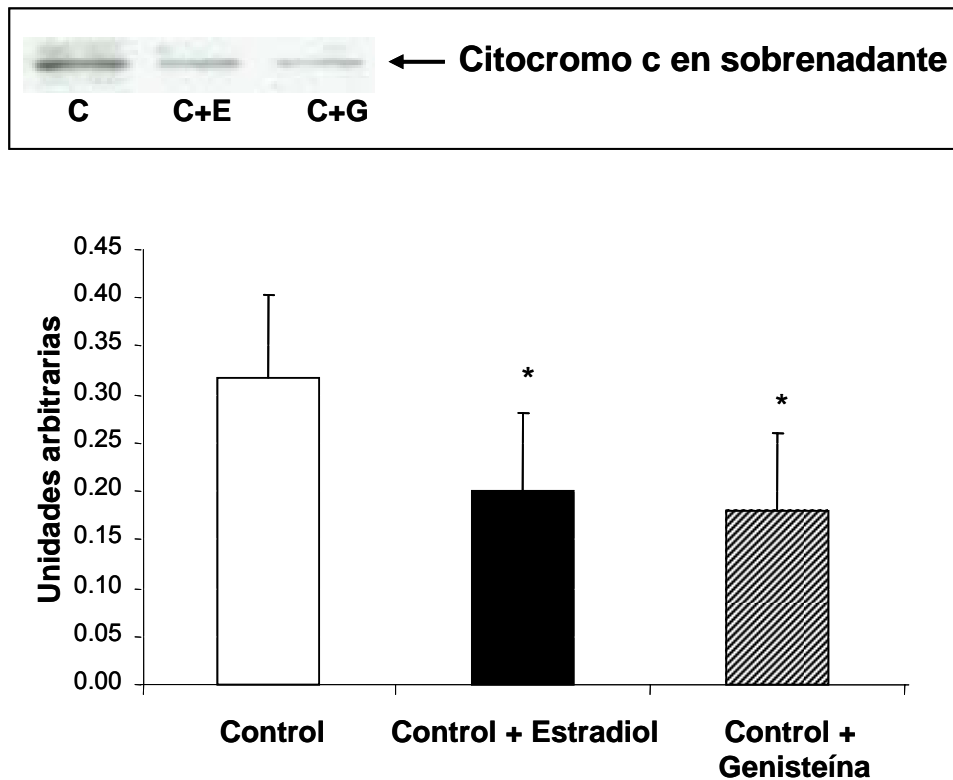


Figura 4.23. Cantidad de citocromo c en el sobrenadante mitocondrial

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de 6 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

4.4 Efecto del consumo de vino tinto sobre la longevidad y sobre la expresión y actividad de genes asociados a ella.

Como se ha comentado en la introducción, el vino es una bebida con múltiples propiedades beneficiosas para la salud. En relación a todas estas propiedades, es el contenido en alcohol lo que más interfiere en el beneficio

de su consumo. No obstante la cantidad de moléculas con actividad antioxidante presentes le proporciona una etiqueta de bebida saludable, siempre y cuando el consumo sea moderado

4.4.1 Efecto del vino y del vino sin alcohol sobre la longevidad en moscas *Drosophila melanogaster*.

Con objeto de determinar su posible beneficio sobre la longevidad realizamos una curva de supervivencia, en poblaciones controladas de moscas *Drosophila melanogaster*. Para ello separamos los individuos de estudio en tres grupos experimentales:

1. Grupo control
2. Grupo vino
3. Grupo vino sin alcohol

La figura 4.24 muestra cómo las moscas que consumieron vino sin alcohol a una concentración del 16 % en la papilla durante toda su vida, presentan una longevidad media de un 19 % más que las que comieron la papilla estándar. La presencia de etanol anula, en parte, los efectos beneficiosos del vino sobre la longevidad. Como se puede comprobar en la figura el incremento de longevidad media no es tan amplio en las moscas que consumieron vino.

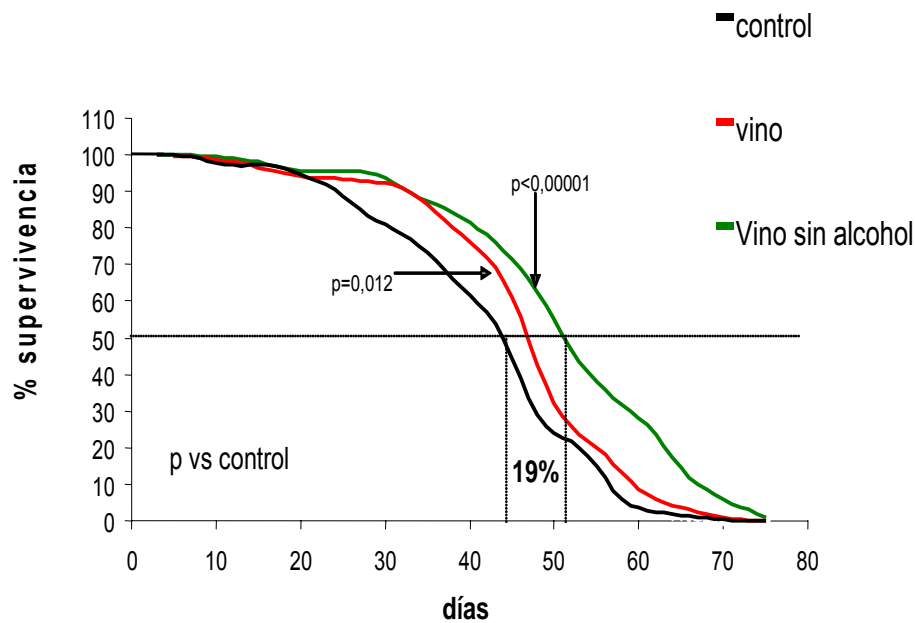


Figura 4.24. Curva de longevidad. Efecto del vino y vino sin alcohol sobre la longevidad de *Drosophila melanogaster*

El método estadístico empleado fue Kaplan-Meier y para el test de significatividad se usó log-rang. La significación estadística se expresa como $p < 0,012$ para el vino y $p < 0,00001$ para el vino sin alcohol, frente al control.

4.4.2 Efecto del vino y del vino sin alcohol sobre la expresión de RNAmensajero de dos enzimas relacionados con la longevidad, en *Drosophila melanogaster*

La figura 4.25 y 4.26 muestra mediante RT-PCR a tiempo real la expresión de dos genes que regulan la longevidad y que se sobreexpresan en las moscas que consumieron vino o vino sin alcohol al 16% v/v en la

comida estándar. Cabe destacar que el etanol no interfiere en la expresión de estas dos enzimas, que expresan el doble de ARNm.

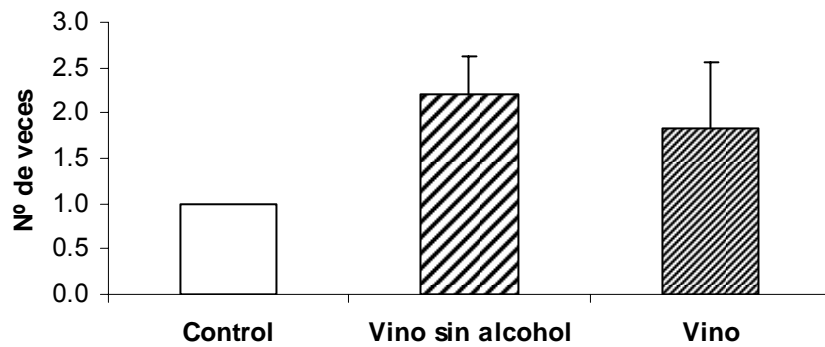


Figura 4.25 Niveles de RNA mensajero de la enzima catalasa en *Drosophila melanogaster*

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de tres experimentos con 5 moscas por cada experimento realizado. La significación estadística se expresa como $p < 0.001$ frente al control.

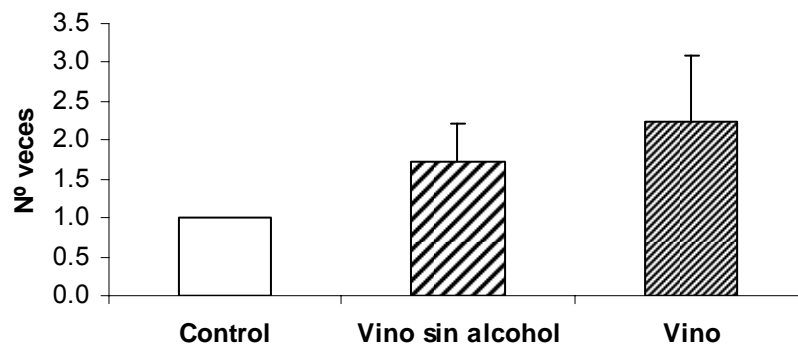


Figura 4.26 Niveles de RNA mensajero de la enzima 16s rRNA en *Drosophila melanogaster*

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de tres experimentos con 5 moscas por cada experimento realizado. La significación estadística se expresa como $p < 0.001$ frente al control.

4.4.3 Efecto del consumo de vino y vino sin alcohol, en ratas macho, sobre la actividad de enzimas antioxidantes en distintos tejidos.

Las siguientes tablas muestran actividades de enzimas antioxidantes, medidas en distintos tejidos, en ratas que consumieron durante dos semanas vino y vino sin alcohol al 50 % en agua (v/v) *ad limitum*.

La tabla 4.2 muestra la actividad de la enzima catalasa en distintos órganos, los resultados muestran cómo las ratas que consumieron vino sin alcohol presentaron una mayor actividad enzimática de la catalasa en cerebro, lo cual se correlaciona con los datos obtenidos en moscas *Drosophila melanogaster*.

Catalasa	Hígado		Corazón		Cerebro	
	U/mgProt	SD	U/mgProt	SD	U/mgProt	SD
Control	38,8	$\pm 6,0$	11,8	$\pm 0,5$	4,8	$\pm 1,2$
vina tinto	36,1	$\pm 9,2$	14,7	$\pm 2,8$	3,0	$\pm 1,6$
Vino sin alcohol	42,6	$\pm 5,8$	12,5	$\pm 2,9$	11*	± 4

Tabla 4.2 actividad enzimática de la catalasa en distintos órganos de ratas.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cuatro experimentos realizados. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control.

La tabla 4.3 muestra los resultados obtenidos en la determinación de la actividad glutatión peroxidasa en homogenados de hígado y corazón. Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa de la actividad de la enzima en el corazón tanto para el grupo vino como vino sin alcohol.

GPx	Hígado		Corazón	
	U/mgProt	SD	U/mgProt	SD
Control	1,8	± 0,4	0,75	± 0,07
vina tinto	2.2	± 0,8	0,61*	± 0,06
Vino sin alcohol	2,3	± 1,2	0,58*	± 0,08

Tabla 4.3 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en distintos órganos de ratas.

Los valores de los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cuatro experimentos realizados. La significación estadística se expresa como *p<0.05 frente al control

La tabla 4.4 y 4.5 muestran los resultados obtenidos en la determinación de las actividades de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glutatión reductasa en homogenados de hígado. Los resultados obtenidos no muestran disminuciones significativas en la actividad de las enzimas para ningún grupo.

GR	Hígado	
	U/mgProt	SD
Control	0,18	± 0,02
vina tinto	0,19	± 0,01
Vino sin alcohol	0,17	± 0,02

Tabla 4.4 Actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hígado de ratas.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cuatro experimentos realizados.

G6P-DH	Hígado	
	U/mgProt	SD
Control	0,007	\pm 0,003
vina tinto	0,009	\pm 0,001
Vino sin alcohol	0,007	\pm 0,001

Tabla 4.5 Actividad enzimática de la glutatión reductasa en hígado de ratas

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cuatro experimentos realizados

Los resultados muestran que las actividades enzimáticas en los distintos tejidos de rata estudiados varían de manera heterogénea tras el tratamiento con vino o vino sin alcohol.

4.4.4 Cantidades de consumo de agua, vino, vino sin alcohol y comida estándar. Efecto sobre el peso.

Los siguientes cuadros muestran los valores de ingesta de agua, vino y vino sin alcohol así como de la comida estándar consumida durante 2 semanas (tabla 4.6) por los distintos grupos de ratas. Los resultados muestran un consumo de bebida sin diferencias entre grupos, sin embargo el consumo de comida estándar fue significativamente mayor en los controles respecto a los dos tipos de vino. Aun así, las variaciones de peso no fueron significativas entre los distintos grupos (tablas 4.7 y 4.8)

	consumo comida (g/día)		consumo bebida (g/día)	
control	22,9	± 6,2	18,4	± 1,5
Vino	13,6*	± 1,1	20,2	± 2,7
Vsin	15,6*	± 2,5	18,6	± 3,1

Tabla 4.6 Medias de los consumos de bebida y comida en ratas macho de tres meses durante dos semanas.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Cada punto corresponde a la media de 4 ratas macho por condición experimental.

La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ frente al control

	peso inicial (g)		peso final (g)	
control	359,3	± 29,4	358,5	± 36,4
Vino	326,3	± 33,2	334,8	± 36,2
Vsin	342,0	± 43,4	352,3	± 56,1

Tabla 4.7 Pesos y sus variaciones en ratas machos que consumieron vino y vino sin alcohol frente al control.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Cada punto corresponde a la media de 4 ratas macho por condición experimental.

	variación peso (g)			variación porcentual (%)		
control	-0,8	±	14,9	-0,2	±	4,2
Vino	8,5	±	10,4	2,6	±	3,2
Vsin	10,3	±	15,7	3,0	±	4,6

Tabla 4.8 Pesos y sus variaciones en ratas machos que consumieron vino y vino sin alcohol frente al control.

Los valores de los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Cada punto corresponde a la media de 4 ratas macho por condición experimental.

DISCUSIÓN

5.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

5.1.1. Longevidad y envejecimiento

Todos los seres vivos como condición natural tienen un instinto de supervivencia que les obliga a preservar la especie. Ya desde que el hombre es consciente de su evolución ha intentado prolongar su vida e incluso inmortalizarla. Una vez desechada la quimera de la inmortalidad, el hombre se ha centrado en el objetivo de incrementar su supervivencia con mejores condiciones físicas y mentales. Los hábitos saludables, la adecuada nutrición, la higiene, el diagnóstico precoz de enfermedades y el avance en los tratamientos de enfermedades, han logrado en los últimos 100 años, duplicar la expectativa de vida de la especie. De este modo la longevidad o supervivencia de la especie humana ha conseguido una mejora espectacular en la vida media aunque no en la máxima (figura 5.1).

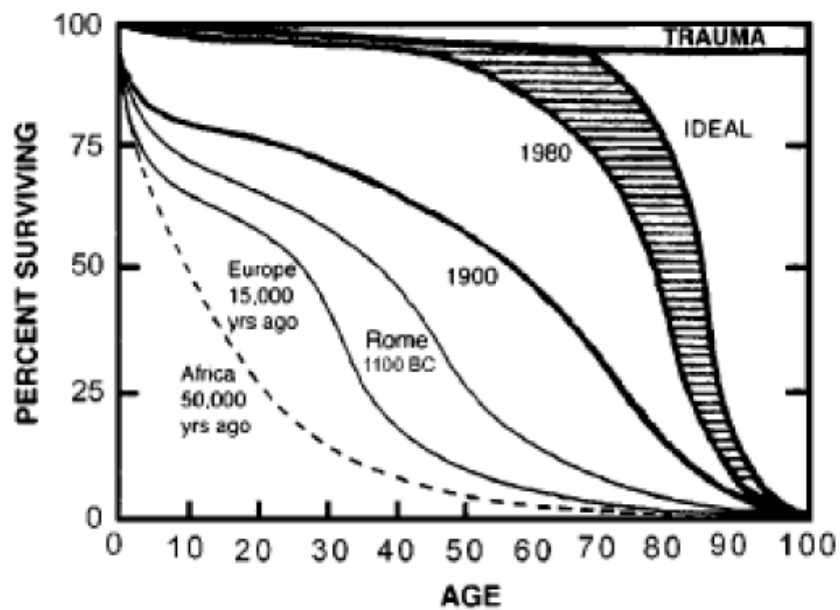


Figura 5.1 Modificada de CUTLER RG (1990)

En condiciones óptimas de vida, es en el último tramo de la vida, donde se incrementan las probabilidades de muerte. El envejecimiento no es una enfermedad y hay que distinguirlo de las causas de muerte por edad avanzada. El término hace referencia a los procesos postmadurativos que conducen a una disminución de la homeostasis y a un incremento en la vulnerabilidad del organismo, que lleva a una mayor predisposición para padecer diferentes patologías que acaban con la muerte del individuo (Harman, 1991).

Como hemos señalado anteriormente, el hombre ha dedicado muchos esfuerzos a aumentar la esperanza de vida. Hasta la actualidad, existen tres regímenes conocidos que pueden incrementar la expectativa de vida animal: el descenso de la temperatura corporal, la reducción de la actividad y la restricción calórica (Lee et al., 1999). Los dos primeros son especialmente eficaces en animales de sangre fría, de modo que un descenso de un 10 % de la temperatura ambiente, o bien la eliminación de la capacidad de vuelo en la mosca común, incrementan la expectativa de vida en un 250 % (Farmer and Sohal, 1987). En ambas modificaciones se consigue rebajar el consumo metabólico de los individuos. Respecto a la restricción calórica los animales sometidos a ella, siempre y cuando no presenten ningún déficit en macro ni micronutrientes, ven incrementada su supervivencia hasta en un 50 % en ratones y en primates produce una reducción de la temperatura corporal y del gasto energético (Weindruch, 1996).

La supervivencia es un parámetro específico de cada especie, en el que claramente existe una implicación genética que explicaría las diferentes tasas de supervivencia (figura 5.2). Además existen otras evidencias, que

implican al genoma como el responsable de la longevidad, por ejemplo: existe una mejor correlación de supervivencia entre gemelos monocigotos que entre hermanos, hecho que también ocurre entre padres e hijos (Begun et al., 2000). En los dos síndromes de envejecimiento prematuro (S. de Werner y Progeria), en los cuales los niños mueren de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, hay una alteración genética autosómica hereditaria (Martin, 1996).

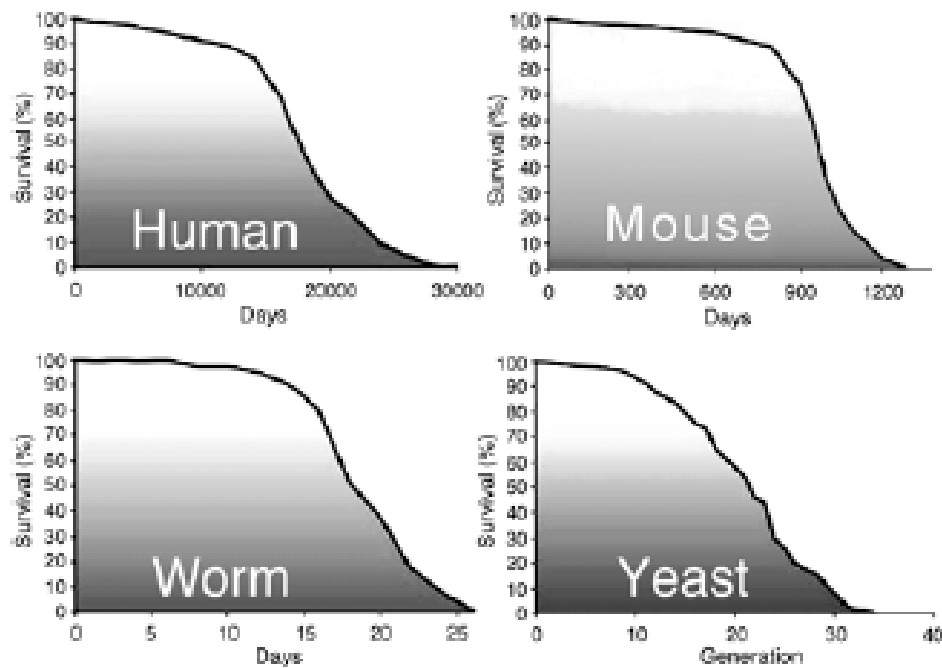


Figura 5.2. Perfil de supervivencia en distintas especies

Como ya se ha mencionado, la longevidad de las especies viene determinada por su longevidad media y máxima. La longevidad máxima corresponde a la edad del individuo más longevo de la especie y la media

corresponde a un dato estadístico en el cual el 50 % de la población sigue aún viva. Existen factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar a las diferentes longevidades entre individuos. De este modo los factores extrínsecos afectarían principalmente a la vida media, por ejemplo un hábito de vida saludable está correlacionado con una mayor probabilidad de supervivencia. En la figura 5.3 se puede comprobar la gran diferencia de vida media entre países como España y EEUU, hecho atribuible en principio a los diferentes hábitos de vida.



Figura 5.3 Tasas de mortalidad por enfermedad coronaria en el mundo

Respecto a la vida máxima de las especies, son los factores intrínsecos los que mas implicados están, de modo que el material genético es el que determinaría las diferentes longevidades (figura 5.2). En los estudios de modificaciones genéticas relacionadas con la longevidad, cabe destacar la creación de una mosca transgénica que sobreexpresa dos enzimas antioxidantes, la catalasa y la superóxido dismutasa (Orr and Sohal, 1994). Estas moscas presentan un incremento tanto en la vida media como en la máxima respecto de sus controles, este hecho demuestra en parte la teoría del estrés oxidativo y la longevidad, ya que individuos que presentan una mayor defensa frente al estrés oxidativo son significativamente más longevos. Además a lo largo de estos años se han identificado en *Drosophila* otros genes que al ser sobreexpresados o silenciados modifican la longevidad de la especie (figura 5.4).

Mutations with extended longevity phenotype in *Drosophila*

Mutation/gene	Gene product	Percent increase in longevity	Type of mutation	References
<i>Mth</i>	G-protein coupled receptor	35	Hypomorph	Lin et al. (1998)
<i>Indy</i>	Cotransporter	100	Hypomorph	Rogina et al. (2000)
<i>Chico</i>	Insulin receptor substrate	48	Null	Clancy et al. (2001)
<i>InR</i>	Insulin-like receptor	50	Hypomorph	Tatar et al. (2001)
<i>Cu/Zn SOD, Catalase</i>	Cu/Zn SOD and Catalase	33	Overexpression	Orr and Sohal (1994)
<i>hsp70</i>	Molecular chaperone	7.9	Overexpression	Tatar et al. (1997)
<i>Cu/Zn SOD</i>	Cu/Zn SOD	48	Overexpression	Sun and Tower (1999)
<i>DPOSH</i>	Scaffold protein	14	Overexpression	Seong et al. (2001a,b)

Figura 5.4 Genes relacionados con la longevidad

Esta serie de experimentos demuestran que la información genética es en parte responsable de la longevidad en los individuos. El siguiente paso sería plantearse ¿cómo podemos aplicar estos avances a la especie humana? Evidentemente la creación de transgénicos humanos no es una meta que se pueda buscar, sin embargo si que se sabe cómo manipular fisiológicamente determinados genes que están implicados directamente en la longevidad.

La presente tesis intenta dilucidar cómo podemos manipular fisiológicamente la expresión de determinados genes implicados en la longevidad de los individuos.

5.1.2 Señalización celular y activación de genes.

La expresión de genes llevada a cabo por las distintas células del organismo es desencadenada por múltiples señales. Éstas pueden ser de tipo fisiológico o químico. En el primer grupo se encuentra, cualquier situación fisiológica capaz de activar una respuesta bioquímica que desencadene en la activación o represión de transcripción génica. Un ejemplo relativamente caracterizado es el ejercicio físico y el ayuno, donde la modulación genética se encuentra muy activada en determinados órganos a células, todo ello con el fin de que el organismo se adapte a la nueva situación “fisiológicamente”. La hormesis es el proceso de adaptación que sufren los organismos para adaptarse a una situación determinada.

Respecto a las señales de tipo químico, es importante destacar pro su interés para el desarrollo de la presente tesis, que los alimentos que ingerimos contienen sustancias capaces de activar determinados genes. Por

ejemplo, el resveratrol, un estilbeno presente en la piel de la uva y otros alimentos, es capaz de activar la expresión de las sirtuinas, deacetilasas responsables del incremento de la longevidad inducido por la restricción calórica (Howitz KT and P, 2003). A su vez hoy en día cada vez más, se descubren moléculas presentes en la alimentación que activan determinados genes y que además esos genes están relacionados con la longevidad.

En la presente tesis veremos cómo una sustancia presente en la dieta preferentemente oriental, es capaz de activar la expresión de genes antioxidantes que se han relacionado con la longevidad, y que podría ser responsable, en parte, de las diferencias que vemos la gráfica de tasas de mortalidad anteriormente citado (ver figura 3), además veremos como otras sustancias presentes en el vino también actúan como moduladores de genes relacionados con la longevidad.

5.1.3 Diferencias de longevidad entre sexos

Uno de los mayores logros del siglo XX es el aumento de la esperanza de vida de la población humana. En Europa, ésta se ha duplicado entre 1900 y 1992. En todos los casos la esperanza de vida de las mujeres supera a la de los hombres. De hecho, en España en 1900, la esperanza de vida para los hombres era de 33.7 años y para las mujeres de 35.1, es decir, un 3.8% superior en mujeres frente a hombres. En 1992 la esperanza de vida de los hombres era de 73.7 años, mientras que la de las mujeres era 83.8, lo cual supone un 9.9% más en las mujeres que en los hombres (Fernandez

Ballesteros 1999). La base de la diferencia de esperanza de vida entre machos y hembras está aún por esclarecer.

Este fenómeno no es atribuible a diferencias sociológicas, puesto que también se reproduce en otras especies. En nuestro laboratorio, las ratas Wistar hembras muestran un 16% más de vida media que las ratas Wistar machos.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que las diferencias de longevidad entre machos hembras tienen una base biológica: los estrógenos suponen una ventaja ante la supervivencia de las hembras, puesto que inducen la expresión de enzimas antioxidantes, y ello las protege frente al estrés oxidativo, y por tanto les confiere una mayor longevidad (Borras et al., 2003; Vina et al., 2005).

Así pues, el estrés oxidativo encontrado en los machos es superior al de las hembras. La producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas y cerebrales (sinápticas y no sinápticas) aisladas de machos producen una cantidad significativamente superior de peróxido de hidrógeno que las de las hembras. Asimismo, los niveles del antioxidante endógeno glutatión reducido son mayores en las mitocondrias procedentes de las hembras en comparación con los machos.

A consecuencia del mayor estrés oxidativo en los machos, el DNA mitocondrial de los mismos está hasta cuatro veces más oxidado que el de las hembras. El aumento de este parámetro está asociado a una menor longevidad.

Todo ello se puede explicar porque las hembras se comportan como dobles transgénicos, que sobreexpresan las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y manganeso superóxido dismutasa.

Además la expresión del marcador de envejecimiento 16S rRNA está disminuida en los machos en comparación con las hembras, lo cual supone que con una misma edad cronológica, las hembras poseen una edad biológica menos que los machos, es decir son más jóvenes que los machos.

La ovariectomía de las ratas hembras suprime las ventajas frente al estrés oxidativo de las hembras, de modo que tienen unos parámetros de estrés oxidativo similares a los machos. La reposición con estrógenos en las ratas ovariectomizadas confiere a éstas de nuevo la protección frente al estrés oxidativo. Así pues, los estrógenos protegen a las hembras frente al estrés oxidativo.

Existen evidencias de que los estrógenos protegen frente a determinadas enfermedades, entre ellas cardiovasculares o neurológicas y que podrían estar relacionadas con su estructura fenólica que les confiere propiedades antioxidantes (Ruiz-Larrea et al., 1997). Sin embargo las dosis de estrógenos administradas a los pacientes es de 50 µg/día, cantidad insuficiente para tener una actividad antioxidante directa, ya que si la comparamos con la dosis clásica de administración de vitamina E, que es de 400 mg/día, vemos que es insuficiente. Esto nos sugiere un mecanismo indirecto.

5.1.4 La soja induce la expresión de genes antioxidantes

Estudios de nuestro laboratorio, realizados en colaboración con el laboratorio del Prof. Giovanni Mann del King's College de Londres, han demostrado que el consumo habitual de soja en ratas aumenta la expresión de genes antioxidantes en distintos tejidos (Mahn et al., 2005). Además mejora la función cardiovascular de estas ratas, que presentan una mayor

expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial, una mejor reactividad vascular y una menor presión arterial tanto sistólica como diastólica.

Estos resultados hacen pensar que los fitoestrógenos de la soja, y más concretamente el más abundante, la genisteína, podría actuar del mismo modo que el estradiol en su acción protectora frente al estrés oxidativo.

Así pues, el objetivo principal de la presente tesis fue determinar *in vitro* el mecanismo por el cual el estradiol y la genisteína, inducen la expresión de genes antioxidantes *in vivo*.

Una vez justificados los motivos para la realización del presente estudio, pasamos a discutir los resultados obtenidos en los siguientes apartados.

5.2 MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL EN CÉLULAS TUMORALES DE GLÁNDULA MAMARIA (MCF-7).

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que el 17 β -estradiol, a concentraciones fisiológicas (0,2-0,02 nM), disminuye los niveles de peróxido de hidrógeno en células tumorales de glándula mamaria (MCF-7) (Borras, 2003). El efecto antioxidante ocurre tras 48 horas de incubación con estradiol, descartando una acción química antioxidante directa, puesto que a tiempos más cortos de incubación no ejerce ningún efecto sobre los peróxidos. En los siguientes apartados detallaremos paso a paso cómo actúa el estradiol, para inducir este efecto.

5.3 PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS SOBRE EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL.

El tiempo de latencia transcurrido desde la adición del estradiol a las células hasta el efecto antioxidante, y las dosis de estradiol empleadas, nos induce a pensar que debe haber un mecanismo indirecto por el cual el estradiol induce la expresión de los genes antioxidantes sobreexpresados en las hembras frente a los machos (Borras, Sastre et al., 2003). El primer paso es considerar que los receptores estrogénicos pueden estar implicados en su acción antioxidante. Para comprobarlo utilizamos tamoxifeno, un antagonista competitivo de receptores estrogénicos en estas células (Lobaton et al., 2005). Al incubar conjuntamente las células con estradiol, a concentraciones fisiológicas, y tamoxifeno la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno se revierten hasta alcanzar los niveles mostrados por el control (figura 4.1). Esto nos confirma que los receptores estrogénicos median el efecto antioxidante del estradiol.

El 17β -estradiol es una molécula muy liposoluble, de modo que atraviesa las membranas plasmáticas con suma facilidad. Ello implica que es capaz de unirse tanto a receptores nucleares como de membrana. Actualmente existen en el mercado moléculas de estradiol unidas a albúmina (17β -estradiol-BSA). Esta unión implica cambios fisicoquímicos que le confieren a la molécula hidrosolubilidad y un mayor volumen, con lo cual no podrá atravesar con facilidad la membrana plasmática. De modo que si tratamos las células con este complejo, solo se podrán unir a los receptores situados en la membrana plasmática, y no a los nucleares.

Para comprobar si los receptores de membrana estaban implicados en el efecto antioxidante del estradiol tratamos las células con las mismas condiciones pero con el 17 β -estradiol-BSA. Los resultados obtenidos muestran que el efecto antioxidante del estradiol se mantiene, de modo que los receptores estrogénicos de membrana son los responsables del efecto antioxidante del estradiol (figura 4.2).

5.4 IMPLICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE ERK12 EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL

Existen numerosas publicaciones que demuestran que los estrógenos inducen la fosforilación de las MAP kinasas (Migliaccio et al., 1996; Watson et al., 1999). Esta activación es muy rápida de minutos e incluso segundos. No obstante los mecanismos son todavía desconocidos (Migliaccio, Di Domenico et al., 1996). Nosotros comprobamos cómo en nuestras células el 17 β -estradiol induce la fosforilación de ERK1/2 en tan sólo 5 minutos (figura 4.3 (a)), efecto que se revierte cuando bloqueamos con U0126, inhibidor de MEK1/2, que es la kinasa anterior que activa ERK1/2 (figura 4.3 (b)).

Para determinar si esta vía de señalización está implicada en el efecto fisiológico antioxidante del estradiol, nos propusimos determinar de nuevo los niveles de peróxido de hidrógeno, en presencia de estradiol y del inhibidor de la vía de las MAP kinasas conjuntamente. Los experimentos muestran que al incubar conjuntamente, 17 β -estradiol con U0126, el efecto antioxidante desaparece, de modo que la fosforilación de ERK1/2 es imprescindible para que el estradiol actúe como antioxidante (figura 4.4).

5.5. IMPLICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN NF- κ B EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL

El factor nuclear kappa B (NF κ B) es un factor nuclear que entra dentro del núcleo para iniciar la transcripción de genes. Se ha establecido que existen más de 300 genes regulados por este factor de transcripción. Se encuentra ubicado en el citosol inactivado por I κ B, cuando éste se fosforila libera a NF- κ B que se transloca al núcleo. Los estrógenos inducen la fosforilación y degradación de I κ B activando así NF κ B (Kawagoe et al., 2003).

Para determinar la activación de este factor, procedimos a la extracción de núcleos celulares en las diferentes condiciones de tratamiento y medimos la subunidad p50 de NF κ B. Tras 48 horas de incubación con estradiol, encontramos niveles superiores de la subunidad p50, indicando que el estradiol activa la translocación de NF κ B hacia el núcleo celular (figura 4.5).

Además demostramos que la vía de las MAP kinasas, concretamente la activación de ERK1/2, está implicada en la translocación de NF κ B al núcleo inducida por el estradiol, puesto que al inhibir la activación de las mismas con UO126, se inhibe la translocación de NF κ B al núcleo inducida por el estradiol (figura 4.5). Otros autores han demostrado previamente que NF κ B puede ser activado por estas MAP kinasas, lo cual apoya nuestros resultados (Hong et al., 2006; Resch et al., 2006).

Para confirmar que NF κ B estaba directamente involucrado en el mecanismo antioxidante del estradiol, medimos los niveles de peróxido de hidrógeno incubando al mismo tiempo 17 β -estradiol con PDTC (pirrolidinditiocarbonato), un inhibidor de la translocación de NF κ B al

núcleo. Los resultados muestran un bloqueo del efecto antioxidante (figura 4.6), por tanto la translocación de NFκB al núcleo está implicada en el efecto antioxidante del estradiol.

5.6 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES

Dentro del gran número de genes que regula NFκB, se encuentran dos enzimas con actividad antioxidante, la Mn-superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. En los promotores de la secuencia genómica de éstas se encuentra una región de unión específica para NFκB (Das et al., 1995) (Zhou et al., 2001), por ello comprobamos los niveles de RNA mensajero (RNAm) para estos dos genes cuando tratamos las células con 17β-estradiol. Los experimentos mostraron, 48 horas después del tratamiento, que los niveles de RNAm eran mayores en las células incubadas con 17β-estradiol (figura 4.7). Así mismo, y para confirmar que la sobreexpresión de estos genes dependía de la activación de la vía de las MAP kinasas y de NFκB, coincuramos estradiol con U0126 y PDTC respectivamente. Efectivamente la sobreexpresión de ambas enzimas se revierte por completo cuando cortamos ambas vías de señalización (figura 4.7).

5.7 MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO

Según los resultados obtenidos nuestra propuesta es la siguiente: el 17 β -estradiol, a concentraciones fisiológicas, se une a los receptores estrogénicos de membrana, activándolos y desencadenando una señal mediada por las MAP Kinasas. Las sucesivas fosforilaciones de las kinasas, mediadas por ERK1/2 acaban fosforilando I κ B, produciendo al liberación de NF κ B que se transloca al núcleo donde se une a regiones específicas en los promotores de las enzimas Mn-SOD y glutatión peroxidasa, iniciando la transcripción génica. Una vez terminada la síntesis, en los ribosomas, estas enzimas migran a la mitocondria donde ejercen un efecto antioxidante disminuyendo los niveles de peróxido de hidrógeno. La figura 5.5 muestra un esquema del mecanismo propuesto (Borras et al., 2005).

Se puede encontrar en la bibliografía experimentos que muestran una relación directa entre el estrés oxidativo y la longevidad de las especies. Un ejemplo muy característico, ya citado anteriormente, es la creación de moscas transgénicas que sobreexpresan dos enzimas antioxidantes (Orr and Sohal, 1994) y que presentan incrementos de longevidad tanto en la vida media como en la máxima. Nuestros resultados, realizados en células humanas de glándula mamaria, muestran un mecanismo de acción de los estrógenos en el que dos enzimas antioxidantes se sobreexpresan, y que podrían ser responsables de las diferentes longevidades entre sexos que muestra la figura 5.6 (adaptada de (Fernandez Ballesteros 1999)

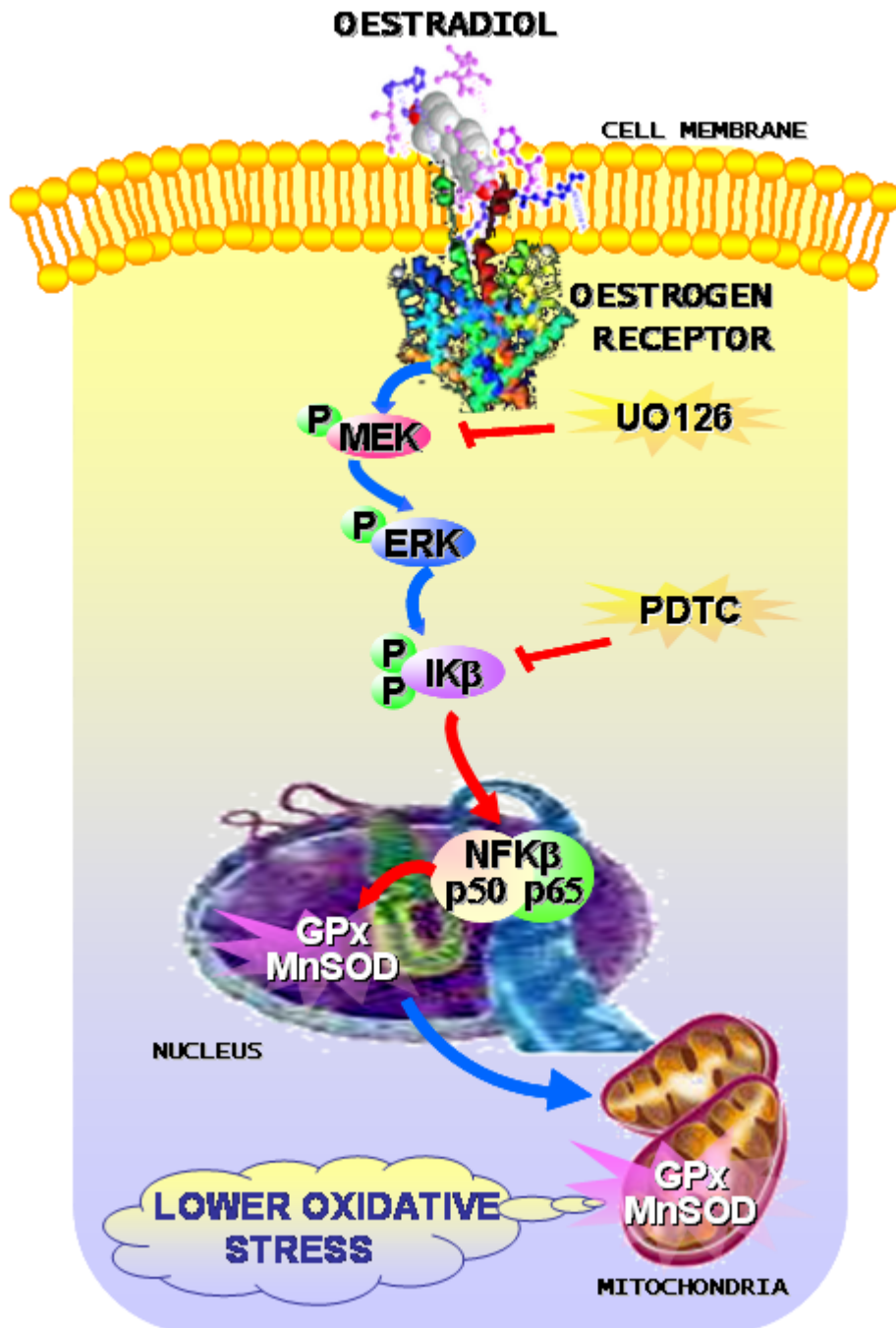


Figura 5.5 Esquema del mecanismo propuesto. Tomado de (Borras, Gambini et al., 2005)

En esta figura se aprecia cómo las mujeres tienen una mayor longevidad que los hombres, se podría pensar que los diferentes estilos de vida entre géneros influyen en estas diferencias, ya que el estrés psicológico o la alimentación también son factores que influyen en la longevidad. No obstante en nuestro laboratorio las ratas presentan un patrón similar de longevidad, y en este caso las condiciones son las mismas tanto para machos como para hembras (Borras, 2003).

AÑO	HOMBRES	MUJERES	%
1900	33.8	35.1	3.8
1960	67.4	72.2	7.1
1980	72.5	78.6	8.4
1992	73.7	81.0	9.9
2020	77.7	83.8	7.9




Figura 5.6 Esperanza de vida en España

Es importante tener en cuenta que la distribución de receptores estrogénicos es muy heterogénea dentro de los órganos e incluso tejidos (Setchell and Cassidy, 1999), y que ello podría determinar que la utilización de compuestos de naturaleza estrogénica, denominados moduladores de

receptores de estrógenos puedan actuar en unos tejidos como los estrógenos, y en otros de modo contrario a los mismos. Este aspecto es importante destacarlo en este momento, pues vamos a comentar los resultados obtenidos con el fitoestrógeno genisteína.

5.8 LA GENISTEÍNA MIMETIZA LOS EFECTOS ANTIOXIDANTES DEL ESTRADIOL

Si bien el estradiol es capaz de proteger frente al estrés oxidativo, la aplicación en humanos es complicada. Por una parte, la administración a humanos de este estrógeno puede tener efectos adversos muy graves, tales como cáncer de mama o de útero (Rossouw et al., 2002) (ver Introducción), además de producir el desarrollo de caracteres sexuales secundarios en hombres. Aun así, se utiliza para la terapia de sustitución hormonal (TSH). No obstante su utilización continúa siendo un hecho de elevada controversia entre la población médica, la científica, y también entre la población en general. Muchas mujeres rechazan estos tratamientos por el riesgo que supone el aumento de la incidencia de cáncer. Así, se propone como alternativa y con resultados aceptables el uso de la soja, que posee moléculas con actividad estrogénica pero sin mostrar las reacciones adversas (Cassidy et al., 2006) ni ser feminizante (Lee et al., 2004).

En la soja se encuentran ciertas moléculas de la familia de las isoflavonas con actividad estrogénica. Entre ellas se encuentran la daidzeína y la genisteína. Sus beneficios sobre la salud son conocidos desde hace tiempo, en concreto una dieta rica en soja mejora parámetros cardiovasculares como la presión arterial y reactividad vascular (Mahn, Borrás et al., 2005).

La soja posee unas buenas propiedades nutricionales, tiene un alto contenido proteico con aminoácidos esenciales y moléculas con actividad antioxidante. Su consumo se encuentra muy extendido, sobre todo en países orientales como Japón. La concentración de genisteína, por ejemplo, en el plasma de hombres japoneses, llega a alcanzar niveles de hasta 0,5 μM (Adlercreutz et al., 1993).

El objetivo de la segunda parte de resultados fue determinar si la genisteína, que es un fitoestrógeno, actúa mediante el mismo mecanismo de acción que el 17 β -estradiol, anteriormente descrito.

5.9 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GENISTEÍNA SOBRE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

Incubamos las células con genisteína a distintas concentraciones, y observamos que a partir de concentraciones mayores e iguales a 0,5 μM , los niveles de peróxido de hidrógeno disminuyen significativamente (figura 4.8). Si comparamos las concentraciones utilizadas de 17 β -estradiol y las de genisteína, observamos que la actividad estrogénica es mucho menor en estas moléculas de origen vegetal. Se necesitan concentraciones 25000 veces mayores de genisteína para conseguir un efecto parecido al del estradiol. Sin embargo, la concentración de 0.5 μM de genisteína, que reproduce los efectos antioxidantes del estradiol, es además la concentración que se encuentra en las personas que consumen habitualmente soja (Adlercreutz, Markkanen et al., 1993), de modo que esta concentración se puede considerar nutricionalmente relevante, y tiene significado fisiológico su estudio como sustituto del estradiol.

Al igual que el estradiol, la estructura fenólica de la genisteína, podría conferirle propiedades antioxidantes *per se*, en este caso más probables por el incremento de concentración. Por ello, estudiamos si el efecto era o no directo determinando la actividad antioxidante de los medios de cultivo con y sin genisteína. La genisteína sólo presentó actividad antioxidante a partir de concentraciones de 15 μM (figura 4.9). Por tanto, la genisteína a la concentración de 0.5 μM no actúa como antioxidante directamente debido a su estructura, sino por un mecanismo indirecto.

Así pues, los siguientes experimentos se encaminaron a corroborar si la genisteína actuaba por el mismo mecanismo de acción descrito anteriormente para el 17 β -estradiol.

5.10 MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO

La genisteína a concentraciones de 0,5 μM , sigue la misma vía de señalización que los estrógenos: el efecto antioxidante se inhibe cuando bloqueamos los receptores estrogénicos con tamoxifeno (figura 4.10), hecho que nos indica que el efecto se media por receptores estrogénicos. Además, y como ocurría con el 17 β -estradiol, el efecto antioxidante se inhibe cuando bloqueamos la vía de señalización de las MAP Kinasas (figura 4.11 a y b). La vía continúa con la fosforilación de I κ B, que desprende a NF κ B el cual se transloca al núcleo para iniciar la transcripción de genes. El efecto antioxidante también se inhibe cuando bloqueamos la activación de NF κ B con PDTC (figura 4.12). Un hecho curioso es que la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes es distinta, en el caso del 17 β -estradiol, se sobreexpresaban tanto la Mn-SOD como la glutatión peroxidasa, y nuestros resultados muestran que la genisteína sólo induce la Mn-SOD (figura 4.13).

Este resultado llevaría a una protección antioxidante menor que la del 17 β -estradiol, hecho que se confirma en los resultados de la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno, que son menores en la genisteína que en el estradiol (figura 4.14) (Borras et al., 2006).

El hecho de que el 17 β -estradiol incremente los niveles de RNAm de la Mn-SOD y la de glutatión peroxidasa, y que la genisteína sólo active la expresión del primer gen, sugiere una diferencia en el mecanismo de acción o la vía. Estudios de afinidad en los diferentes receptores estrogénicos, muestran que la genisteína tiene una preferencia sobre los receptores beta (Kuiper et al., 1997).

Cuando la genisteína o el 17 β -estradiol se unen a sus respectivos receptores de membrana, a la señal desencadenada le acompañan coactivadores que determinarán al final del proceso respuestas concretas, en este caso podríamos pensar que la activación de los receptores estrogénicos beta acaban produciendo la sobreexpresión de la Mn-SOD y que la activación de receptor alfa induce la sobreexpresión de la glutatión peroxidasa. No obstante se requieren estudios en células que contengan uno u otro receptor para realizar esta afirmación.

La figura 5.7 resume el mecanismo de acción propuesto para el efecto antioxidante de la genisteína *in vitro*, que a su vez podría explicar los efectos antioxidantes mostrados *in vivo*.

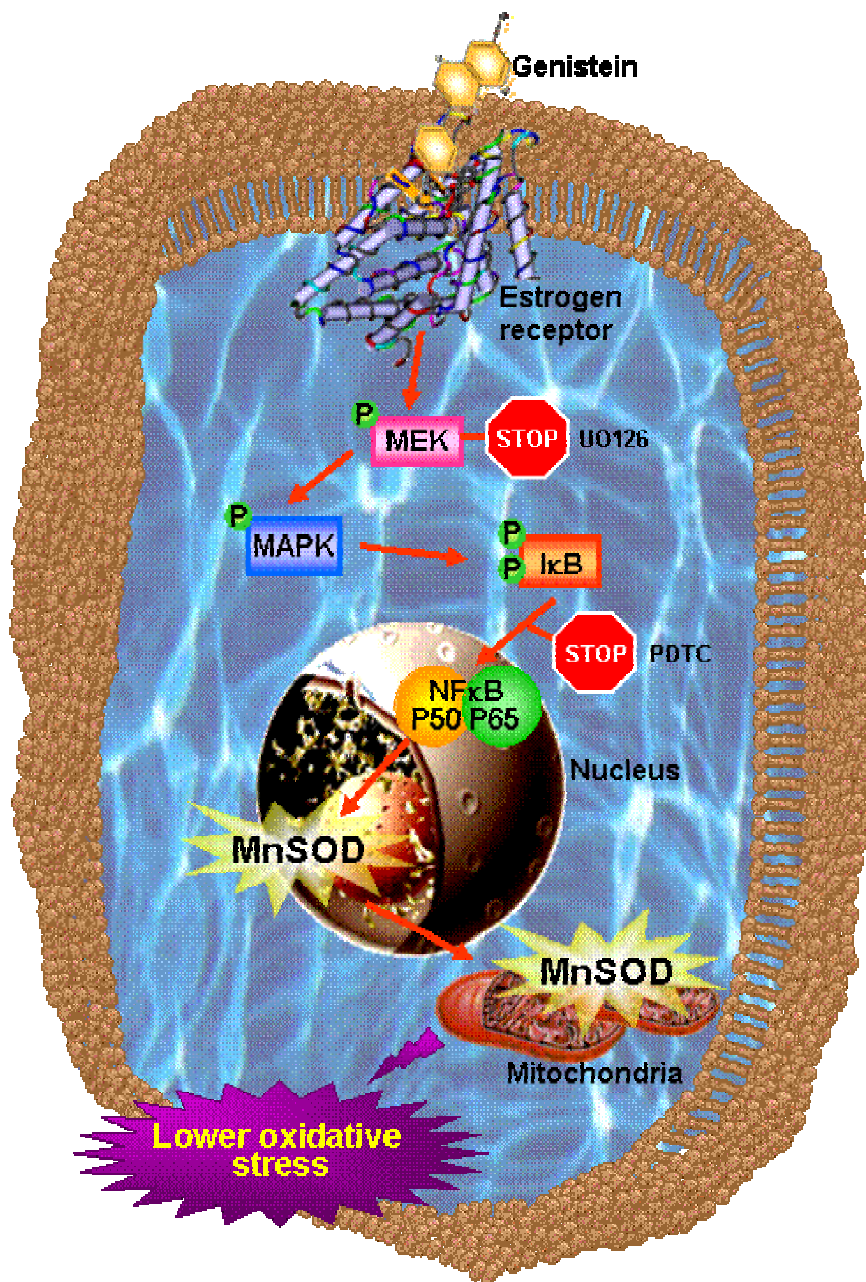


Figura 5.7 Mecanismo de acción propuesto. Tomado de (Borras, Gambini et al., 2006)

5.11 POSIBLE APLICACIÓN PRÁCTICA

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que el consumo de una dieta rica en fitoestrógenos podría ser saludable para las personas, ya que nos protegería frente al estrés oxidativo incrementando nuestras defensas antioxidantes. Además según resultados estadísticos (figura 5.3) los japoneses tienen una menor tasa de mortalidad que el resto de países y además es el mayor consumidor de soja. Otro dato estadístico confirma la mayor longevidad del sexo femenino (Fernandez Ballesteros 1999), de este modo los más longevos serían las mujeres japonesas, ya que durante su edad fértil le protegerían los estrógenos endógenos y durante la postmenopausia obtendrían los fitoestrógenos mediante la dieta.

Una de las barreras para obtener concentraciones nutricionalmente relevantes es la biodisponibilidad de estas moléculas, que en principio es muy baja. Esta biodisponibilidad es mayor cuando el consumo se hace más prolongado, ya que la microflora intestinal interviene directamente en la absorción (Xu et al., 1995). Normalmente la genisteína se encuentra en las plantas, formando complejos con otras moléculas. Al consumirlas lo hacemos en forma de glucósidos, y necesitamos a las glicosidasas intestinales para poder absorberlas en el intestino, de modo que su absorción depende directamente de las glicosidasas intestinales.

5.12 EFECTO ANTIOXIDANTE DIRECTO DEL ESTRADIOL O LA GENISTEÍNA EN MITOCONDRIAS AISLADAS HÍGADO DE RATAS MACHO

Recientemente se ha descubierto la presencia de receptores estrogénicos en las mitocondrias (Chen et al., 2004). Ello nos hizo plantearnos que los resultados obtenidos *in vivo* podrían ser el resultado conjunto del mecanismo de acción mencionado anteriormente, pero también por un efecto directo de los estrógenos sobre las mitocondrias.

Así, aislamos mitocondrias de ratas macho, para comprobar si podrían ser efectivos también en los machos, y los incubados a diferentes tiempos con estradiol (a concentraciones fisiológicas) o genisteína (a concentraciones nutricionalmente relevantes), encontrando un efecto máximo de protección frente a la producción mitocondrial de radicales libres a la hora de incubación (figura 4.15), lo cual indica que también existe un efecto directo de estos compuestos sobre las mitocondrias, y además, es efectivo en los machos y no sólo en las hembras.

El efecto parece mediado por receptores puesto que se reproduce por el estradiol unido a albúmina (figura 4.16) y porque concentraciones crecientes saturan el efecto antioxidante (figura 4.17).

Al incubar las mitocondrias durante una hora con estradiol, aumenta el potencial de membrana mitocondrial (figura 4.18) y se inhibe la salida de citocromo c de la mitocondria (figura 4.19 y 4.20). El hecho de que el estradiol inhibe la salida de citocromo c de las mitocondrias ha sido recientemente publicado por el grupo de Pedram y cols (Pedram et al.,

2006). En su estudio inducen daño mitocondrial y comprueban cómo el estradiol inhibe la salida de citocromo c protegiendo a las células de la apoptosis. Nuestro trabajo sin embargo, se centra en el estado basal de producción de radicales libres, no inducimos un daño mitocondrial, sino que en condiciones basales demostramos que el estradiol inhibe la salida de citocromo c, lo cual explicaría que las mitocondrias produzcan una menor cantidad de radicales libres, puesto que el citocromo c, en situaciones fisiológicas, actúa como antioxidante puesto que es un componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial que dona electrones a la única enzima de la cadena capaz de retener las especies parcialmente reducidas del oxígeno, la citocromo c oxidasa. Así pues, nuestros resultados muestran que en condiciones fisiológicas, el estradiol retiene al citocromo c en la cadena respiratoria mitocondrial, de modo que permite la acción antioxidante de la citocromo c oxidasa, y consiguientemente, la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno disminuye.

Como en la ocasión anterior, la genisteína reproduce exactamente los efectos del estradiol, a concentraciones nutricionalmente relevantes (figuras 4.21, 4.22, 4.23).

5.13 EFECTO DEL CONSUMO DE VINO TINTO SOBRE LA LONGEVIDAD Y SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE GENES ASOCIADOS A ELLA.

Otro producto natural con muchos beneficios descritos para la salud, es el vino tinto. De entre las múltiples publicaciones descritas acerca de las propiedades beneficiosas del vino tinto, cabe destacar los beneficios sobre el sistema cardiovascular. Una de las sustancias más implicadas en los

accidentes cardiovasculares es el colesterol, este esteroide cuando se encuentra en exceso en el organismo, o mas aún cuando se oxida, puede formar agregados que se unen a las arterias formando placas de ateroma con los consiguientes riegos. Estudios *in vivo* muestran cómo, en personas que consumieron una comida rica en grasas animales suplementadas con vino tinto, los niveles de colesterol oxidado fueron menores que los que consumieron la misma comida pero con agua (Serafini et al., 2000; Ventura et al., 2004). El hecho está en que la ingesta de vino tinto produce unos incrementos de sustancias antioxidantes en sangre que son capaces de inhibir procesos de oxidación como los del colesterol.

Además existe un estudio muy relevante acerca de los beneficios del consumo moderado de vino tinto, llamado “la paradoja francesa”, derivado del proyecto MONICA (Schneider et al., 1996). Una premisa del estudio se basa, en que los países europeos donde se consumía una dieta rica en grasas animales presentaban un mayor riesgo de mortalidad relacionada con accidentes cardiovasculares, de este modo las tasas de mortalidad seguían un patrón en el que los países situados mas al norte de Europa, presentaban mayor riesgo que los situados mas al sur, ello se atribuyó al mayor consumo de grasas animales y con ello de colesterol. Sin embargo, en los países situados más al sur, la dieta se basaba en un mayor consumo de alimentos no animales, que en principio y dependiendo de la procedencia son más saludables. En la progresión desde el norte de Europa hasta el sur, teniendo en cuenta que en el sur el riesgo es menor, existe una zona del sur de Francia donde la lógica no seguía su camino, la región de Burdeos. En esta zona la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares relacionada con el consumo de grasas animales era menor de lo esperado, lo extraño era que consumiendo la misma dieta que sus vecinos no presentaban

los mismos riesgos. Una diferencia nutricional entre sus vecinos era la sustitución del alcohol en forma de cerveza por el vino, es decir ellos consumían el mismo alcohol pero en forma de vino. Estudios posteriores muestran cómo el vino es beneficioso para el sistema cardiovascular, ya que disminuye el colesterol oxidado y protege frente al estrés oxidativo postprandial (Sun et al., 2002).

En “la paradoja francesa” las condiciones sociales, el nivel de vida, etc, pueden influir directamente en la longevidad de los individuos, es decir resulta muy difícil controlar todas las variables. Para determinar efectos de tratamientos sobre la longevidad, es importante realizarlo en poblaciones estrictamente controladas, ya que las variables sociológicas, por ejemplo, influyen directamente en las longevidades. Hasta el momento no existe ningún experimento que busque la influencia del consumo de vino sobre la longevidad en poblaciones controladas, cosa prácticamente imposible en humanos. Según se ha comentado anteriormente los estudios de longevidad en moscas *Drosophila* presentan ventajas y desventajas. Para poder determinar si el vino afecta a la longevidad, realizamos una curva de longevidad en moscas *Drosophila* en la que todos los grupos se encontraban con las mismas condiciones excepto la comida. Con ello podríamos determinar si este suplemento dietético influía en la longevidad. Para poder determinar si el vino tinto influía, realizamos 3 grupos experimentales: grupo “control” con la papilla estándar, grupo “vino” con la papilla estándar suplementada con vino tinto y grupo “vino sin” en el que la papilla se suplementó con vino dealcoholizado con el fin de separar los efectos del alcohol. Los resultados mostraron una mayor longevidad en los individuos que consumieron la papilla estándar suplementada tanto con vino tinto como con vino tinto sin alcohol (figura 4.24). En cambio los resultados

fueron más significativos en el grupo que consumió vino dealcoholizado, en el que llegaron a alcanzar incrementos en la longevidad media de hasta un 19 %.

Las pruebas bioquímicas mostraron incrementos en dos genes relacionados con la longevidad. La enzima catalasa y la subunidad 16s del RNA ribosomal, mostraron incrementos en su expresión génica (figura 4.24 y 4.26), hecho que podría explicar en parte las diferencias de longevidad, a parte de consumir una dieta rica en compuestos antioxidantes, que también favorece a longevidad media, que fue la incrementada.

5.14 EFECTO DEL CONSUMO DE VINO Y VINO SIN ALCOHOL, EN RATAS MACHO, SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN DISTINTOS TEJIDOS

Si bien la longevidad media se modificó en moscas que consumieron vino sin alcohol, una prueba que podría apoyar estos resultados sería observar que ocurre con mamíferos, por ello estudiamos el efecto del consumo en ratas, pero en este caso probamos el efecto del consumo durante dos semanas con los mismos tratamientos. Como ya comentamos anteriormente realizar una curva de longevidad en ratas constituye un problema debido al largo periodo experimental.

Nuestros resultados muestran que el efecto del consumo moderado de vino tinto y vino tinto sin alcohol modifican la actividad de las enzimas antioxidantes en distintos tejidos y en distinto grado según el tejido del cual se trate (tablas 4.2, 4.3, 4.4, y 4.5). Estudios de seguimiento de las ratas para observar las variaciones de peso demostraron no presentar diferencias

significativas (tablas 4.6, 4.7 y 4.8). Estos resultados merecen un estudio más pormenorizado en el que podemos dilucidar si los receptores estrogénicos, que como ya se ha mencionado se encuentran repartidos de manera heterogénea, podrían ser los responsables de los efectos heterogéneos encontrados en los tejidos de las ratas que consumieron vino tinto o vino tinto sin alcohol.

***SUMMARY OF
RESULTS AND DISCUSSION***

6.1 SUMMARY

Females live longer than males in many mammalian species, including humans. This natural phenomenon can be explained on the basis of the mitochondrial theory of aging. Mitochondria are a major source of free radicals in cells. Mitochondria from female rats generate half the amount of hydrogen peroxide than those of males and have higher levels of mitochondrial reduced glutathione. The latter is due to females behaving as double transgenic in over-expressing antioxidant enzymes. Estrogens bind to the estrogen receptors and subsequently activate the mitogen activated protein (MAP) kinase and nuclear factor kappa B (NFkappaB) signalling pathways, resulting in an up-regulation of antioxidant enzymes. Moreover, the 16S rRNA expression, which decreases significantly with aging, is four times higher in mitochondria from females than in those from males of the same chronological age. On the contrary, the oxidative damage of mitochondrial DNA is fourfold higher in males than in females. Ovariectomy abolishes the gender differences between males and females and estrogen replacement rescues the effect of ovariectomy. The challenge for the future is to find molecules that have the beneficial effects of estradiol, but without its feminizing effects. Phytoestrogens or phytoestrogen-related molecules may be good candidates to meet this challenge.

6.2 INTRODUCTION: MITOCHONDRIAL OXIDANT FUNCTION IN AGING

Denham Harman proposed in 1956 and 1972 that free radicals (Harman, 1956; Harman, 1972), especially those of mitochondrial origin (Miquel, Economos et al., 1980), are causally related to the basic aging process. A series of authors and studies produced evidence in favour of the mitochondrial hypothesis of aging (Weindruch and Sohal, 1997; Beckman and Ames, 1998; Barja de Quiroga, 1999; Navarro and Boveris, 2004).

Aging is progressive, which means that the causes of aging must be present during the whole life span, both at young and old age, and at approximately the same level of intensity (Barja, 2002).

What is the connection between aging and oxidative stress? The rate of aging correlates with the rate formation of H_2O_2 by mitochondria. All the investigations performed to date have shown that the rate of H_2O_2 production of mitochondria isolated from postmitotic tissues (the ones more relevant to aging) is lower in long-lived than in shortlived species (Ku et al., 1993; Barja, Cadenas et al., 1994).

This occurs in all kinds of long-lived homeothermic animals independently of their rates of O_2 consumption, which are lower in mammals of large body size and higher in birds of small size. It is generally assumed that in homeotherms high rates of O_2 consumption are associated with low maximal life spans. However, birds are unique because they combine a high rate of O_2 consumption at rest and under basal conditions with an extended maximal life span. Barja and his coworkers (Barja, Cadenas et al., 1994) studied this problem and concluded that mitochondria

from birds show a rate of H_2O_2 and of free radical generation per unit of O_2 that is one order of magnitude lower than mitochondria from rats. However, the hypothesis is not free of criticism; pigeon heart mitochondria produce H_2O_2 at rates that are similar to those of rat heart (Boveris and Chance, 1973; Cadenas and Boveris, 1980).

We observed that aging causes an oxidation of mitochondrial glutathione, the co-factor of mitochondrial glutathione peroxidase which is involved in the catabolism of mitochondrial H_2O_2 and that such oxidation accounts for the total GSH oxidation that is observed in whole cells upon aging (Asensi et al., 1994). It is worth noting that we were able to make such observation by developing a method to determine accurately GSSG in biological samples by preventing autoxidation of GSH (Asensi, Sastre et al., 1994).

Furthermore, the levels of 8-oxo-deoxyguanosine, an index of oxidative damage to mitochondrial DNA, increased with aging and this increase correlated with the oxidation of GSH mentioned above (Asensi, Sastre et al., 1994). The age-associated oxidation of glutathione and of mitochondrial DNA was prevented by treatment with vitamins C and E (Asensi, Sastre et al., 1994) and by treatment with *Ginkgo biloba* extract (Sastre, Millan et al., 1998).

Damaged mitochondria are isolated from the organs of old animals and mitochondria are dysfunctional inside intact cells from old animals (Sastre, Pallardo et al., 1996; Hagen et al., 1997; Navarro and Boveris, 2004). Age-associated mitochondrial damage is associated to an increased rate of oxidant production and to an increased content of oxidation products (Sastre, Pallardo et al., 1996; Hagen, Yowe et al., 1997; Navarro and Boveris, 2004). The observation of lower activity of the complexes of the

mitochondrial respiratory chain in old animals is accompanied by the reports of a higher level of mtDNA damage (Shigenaga and Ames, 1991; Lezza et al., 1994).

More than 97% of the O₂ used by aerobic cells is consumed in mitochondria, and about 1% of this O₂ does not form water by the cytochrome oxidase reaction, i.e. in the main process of normal tissue respiration, but superoxide anion (O₂⁻) (Chance, Sies et al., 1979; Sastre, Pallardo et al., 1996; Sastre, Millan et al., 1998). Superoxide is then converted into H₂O₂ within mitochondria, highly favoured by the action of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD). The continuous mitochondrial generation of O₂⁻ and H₂O₂ throughout the life of a cell leads to "chronic oxidative stress" that plays a key role in cellular aging, and that, as it is now well established, involves oxidative damage to mitochondrial DNA, proteins, and lipids (Shigenaga and Ames, 1991; Benzi and Moretti, 1995; de la Asuncion, Millan et al., 1996; Sastre, Pallardo et al., 1996; Sastre, Millan et al., 1998; Navarro and Boveris, 2004).

6.3 FEMALES PRODUCE LESS MITOCHONDRIAL OXIDANTS THAN MALES

The rate of oxidant production by mitochondria from females is significantly lower than that from males. We measured the rate of H₂O₂ production and found that mitochondria from female rats produce approximately half the amount of H₂O₂ generated by "male" mitochondria, as tested in liver and brain mitochondria from mice and rats (Borras et al., 2003)

Moreover, neuronal mitochondria produce much greater quantities of oxidants than do glial mitochondria, a finding that agrees with the idea that post-mitotic and non-dividing cells suffer much more age-associated damage than do cells that divide normally.

To determine whether ovarian hormones, such as estrogens, are involved in the marked differences in oxidant production between mitochondria from male and female rats, we tested the effects of ovariectomy and of estrogen replacement therapy on mitochondrial H₂O₂ production. Ovariectomy caused an increase in H₂O₂ production by liver and brain mitochondria, yielding values similar to those observed with mitochondria from males, *i.e.* an increase of more than 60% from the values found normally with mitochondria from females. Estrogen replacement therapy completely abolished the observed increase in H₂O₂ generation that was produced by ovariectomy (Borras, Sastre et al., 2003; Vina et al., 2005).

6.4 MITOCHONDRIA ARE LESS DAMAGED IN FEMALES THAN IN MALES

Mitochondria from females suffer considerably less oxidative damage in critical molecules such as mitochondrial DNA (mtDNA) or glutathione as compared with those of males (Borras, Sastre et al., 2003) (Vina et al., 2003). Mitochondrial DNA is a key component of the mitochondrion (Wallace, 1994), and its degree of oxidation is directly related to aging (Richter, Park et al., 1988; Shigenaga, Hagen et al., 1994; de la Asuncion, Millan et al., 1996). The observed abundance of 8-oxodeoxyguanosine, an excellent indicator of oxidative damage to DNA, is four times as great in mitochondria from males than in those from females

(Borras, Sastre et al., 2003; Vina, Sastre et al., 2003). This is the most pronounced oxidative change we have observed in mtDNA in any physiological situation, and it indicates that the higher chronic and continuous H₂O₂ production that is directly related to a higher rate of damaging ROS generation in males results in marked oxidative damage to mtDNA and in mutagenic lesions DNA (Kasai et al., 1986).

We will now focus in glutathione, which is the major low-molecular-weight thiol in cells (Jocelyn and Kamminga, 1974). Its concentration is similar to that of glucose (Nina et al., 1978). Mitochondrial GSH levels are double in females than in males. The intracellular level of the oxidized form of glutathione (GSSG) is considered a biological marker of aging (Hazelton and Lang, 1984), and we have found that mitochondrial GSSG is related to the damage associated with aging (Sastre et al., 2000).

6.5 ESTROGENS UP-REGULATE THE EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT DEFENCES

In order to explain the lower oxidative stress observed in mitochondria from females as compared with males, we examined the differences in expression and activity of mitochondrial antioxidant enzymes as a function of gender.

Since the mitochondrial steady-state concentrations of O₂⁻ and H₂O₂ are defined by the ratio of the rates of production and utilization of these species, we determined the mitochondrial activity and expression of Mn-SOD and glutathione peroxidase (GPx) (Boveris and Cadenas, 2000). Both the expression and the enzymatic activity of Mn-SOD and GPx were

approximately double in females than in males. The fact that females have a higher GPx activity than males was already observed in the 1960s (Pinto and Bartley, 1969), but at that time the phenomenon was not related to the different longevity between genders. A few years ago Orr and Sohal (Orr and Sohal, 1994) observed that *Drosophila* that over express either SOD or catalase (they lack GPx) did not increase their average life span. However, when they overexpressed both, life span was increased. We have found that females over-express both mitochondrial antioxidant enzymes, Mn-SOD and GPx, and we hypothesized that the phenomenon depends on a hormonal regulation exerted by estrogens.

6.6 SIGNALLING PATHWAYS INVOLVED IN THE ANTIOXIDANT EFFECT OF ESTROGENS

Estrogens were long ago recognized as *in vitro* antioxidants (Ruiz-Larrea et al., 1997). However, at physiological concentrations it is very unlikely that they may act as such, especially due to their low concentration in plasma. A simple calculation indicates that if the recommended dose of estradiol in estrogen replacement therapy is 50 microg/day and the recommended dose of vitamin E as supplement is 500 mg/day; estrogen ought to be ten thousand times more potent than vitamin E to have a similar antioxidant capacity and this is obviously not the case.

Yet, *in vivo* experiments show that estrogens have a powerful antioxidant effect: mitochondrial H₂O₂ production is significantly increased (by more than 50%) after ovariectomy and this is completely prevented when ovariectomised rats are treated with estradiol at doses similar to those used in estrogen replacement therapy (for details see (Borras, Sastre et al.,

2003)). Then, it is clear that estrogens do not act as chemical antioxidants *in vivo*, instead they exert their antioxidant effect by up-regulation of the expression of antioxidant genes and antioxidant enzymes.

We used MFC-7 cells, a human mammary gland cell line, to test if the antioxidant effects of estradiol are exerted via interaction with the estrogen receptors. When these cells were incubated with physiological concentrations of estradiol, the levels of H₂O₂ were significantly decreased. However, when the cells were co-incubated with estradiol and tamoxifen (an estrogen receptor inhibitor) the levels of H₂O₂ were similar to controls, thus confirming that the antioxidant effect of estrogen is mediated by the interaction of estradiol with the estrogen receptor (see Figure 6.1)

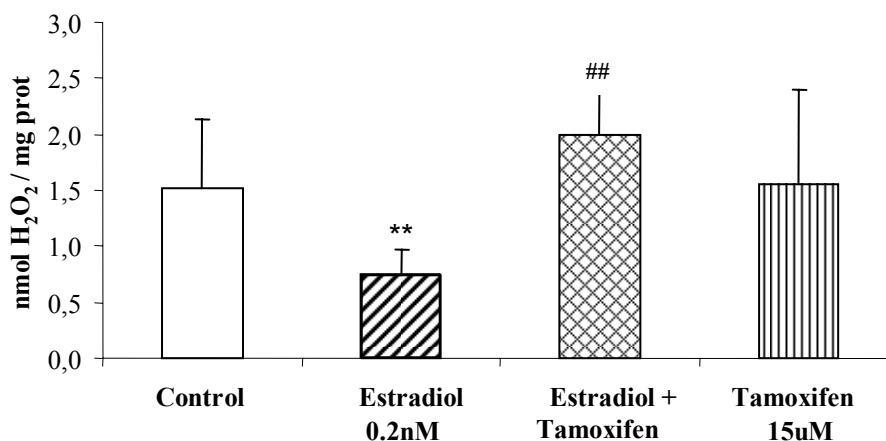


Figure 6.1 Antioxidant effect of estradiol is estrogen receptor-mediated. Data are expressed as mean \pm SD of 6–8 different experiments. The statistical significance is expressed as ** $P < 0.01$ vs. control and ## $P < 0.01$ vs. estradiol.

Moreover, we demonstrated that the antioxidant effect of estradiol was mediated by the membrane estrogen receptor. Figure 6.2 shows that estradiol bound to bovine serum albumin (E₂-BSA), which cannot get into the cell, is also able to decrease the level of hydrogen peroxide in MCF-7 cells after 48 hours of treatment, thus it exerts its antioxidant effect through the membrane estrogen receptor.

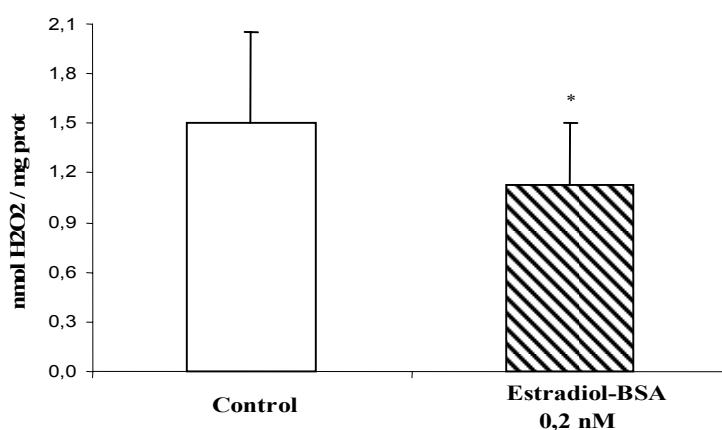


Figure 6.2 Antioxidant effect of estradiol is estrogen membrane receptor-mediated. Data are expressed as mean \pm SD of 6–8 different experiments. The statistical significance is expressed as * $P < 0.01$ vs. control.

This observation opened the question about the intracellular mechanism by which estradiol acts to increase the expression of mitochondrial antioxidant enzymes. A direct genomic effect of estradiol was unlikely because neither Mn-SOD nor GPx have estrogen-responsive elements in their promoter region. Thus, it was likely that the action of

estradiol is mediated via intracellular signalling cascades. We tested the effect of mitogen activated protein (MAP) kinases by using UO126, an inhibitor of the phosphorylation of these kinases. Our experiments showed that UO126 completely inhibited the lowering effect of estradiol on the level of H₂O₂ in cells (see Figure 6.3 A and B).

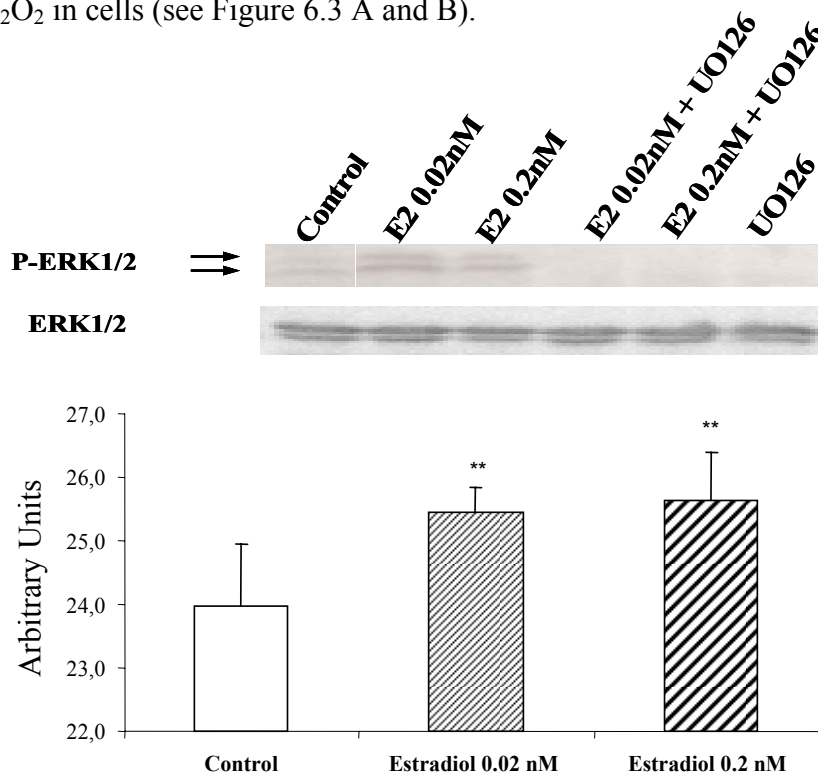


Figure 6.3 (A) Estradiol induces phosphorylation of ERK1/2. A representative Western blot is shown of phospho-ERK1 and 2 in MCF-7 cells after 3 min incubation with estradiol (0.2 or 0.02 nM). Histograms represent densitometric measurement of specific bands of phospho-ERK1 and 2 content using total ERK levels as controls. The statistical significance is expressed as **($P < 0.01$ vs. control). Data are expressed as mean \pm SD of six independent experiments.

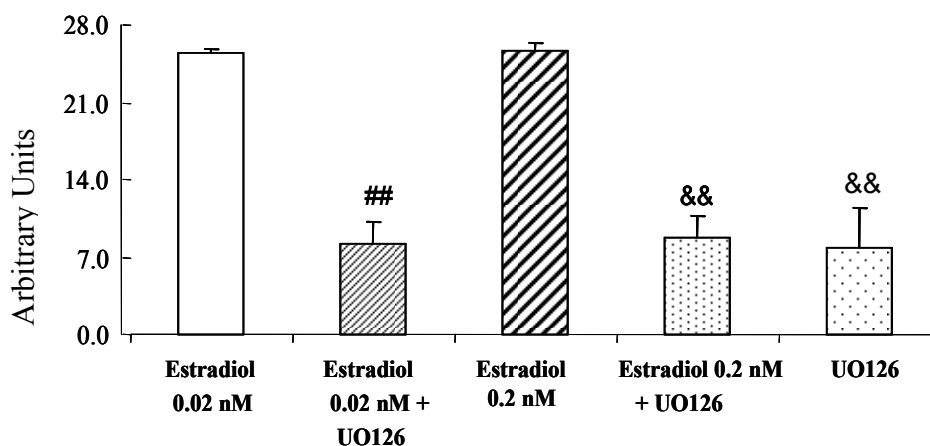


Figure 6.3 (B) Estradiol induces phosphorylation of ERK1/2. A representative Western blot is shown of phospho-ERK1 and 2 in MCF-7 cells after 3 min incubation with oestradiol (0.2 or 0.02 nM) alone or with 1 μ M UO126. Histograms represent densitometric measurement of specific bands of phospho-ERK1 and 2 content using total ERK levels as controls. The statistical significance is expressed as ## $P < 0.01$ vs. oestradiol 0.02 nM and && $P < 0.01$ vs. oestradiol 0.2 nM. Data are expressed as mean \pm SD of six independent experiments.

In order to establish if MAPK activation was indeed involved in the antioxidant effect of estradiol, we measured hydrogen peroxide levels in cells treated with estradiol, at physiological concentrations, and UO126, the inhibitor of MAPK activation. Figure 6.4 shows that in fact, MAPK activation is involved in the antioxidant effect of estradiol. When we co-

treated the cells with the inhibitor of MAPK, the antioxidant effect of estradiol was lost.

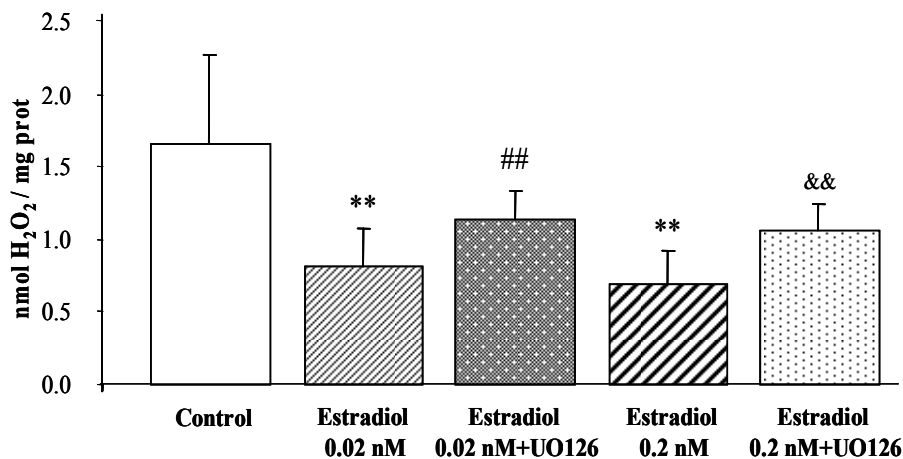


Figure 6.4 MAPK mediate the antioxidant effect of estradiol. Data are expressed as mean \pm SD of 8–10 different experiments. The statistical significance is expressed as **P < 0.01 vs. control, ##P < 0.01 vs. estradiol 0.02 nM and &&P < 0.01 vs. oestradiol 0.2 nM. UO126 alone non affected H₂O₂ levels significantly.

MAP kinases are known to activate the nuclear factor kappa B (NF-kappaB). Thus, we tested whether estradiol acts by activating NF-kappaB in its up-regulation of the expression of both Mn-SOD and GPx genes, whose promoters contain putative NF-kappaB -binding motifs. This was indeed the case: when cells were incubated with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an inhibitor of the I-kappaB degradation, and therefore an inhibitor of the

NF-kappaB translocation to the nucleus, the effect of estradiol on the up-regulation of antioxidant enzyme expression was prevented (see Figure 6.5).

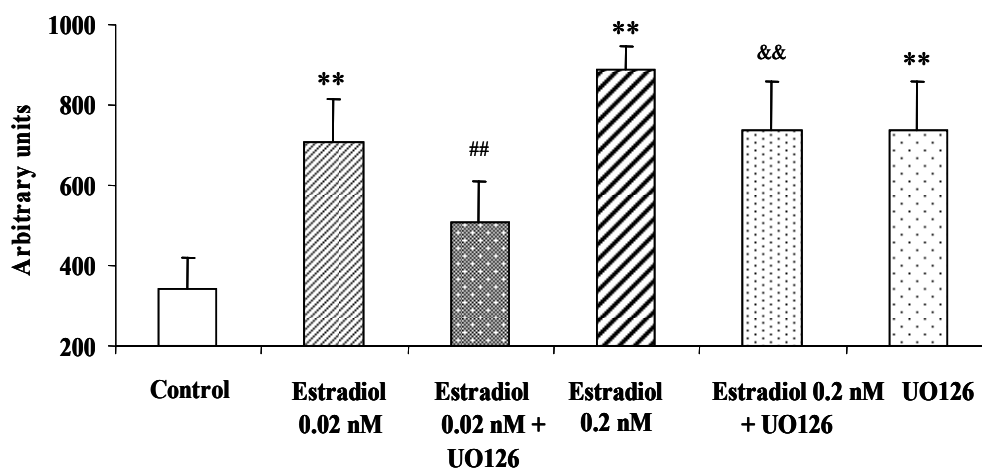


Figure 6.5 Estradiol induces NF- κ B translocation, mediated by MAPK. Levels of the active p50 subunit of NF- κ B were measured in nuclear extracts from cells treated with physiological concentrations of estradiol alone or with 1 μ M UO126. Data are expressed as mean \pm SD of six different experiments. The statistical significance is expressed as **P < 0.01 vs. control, ##P < 0.01 vs. oestradiol 0.02 nM and &&P < 0.01 vs. oestradiol 0.2 nM.

In order to establish if NFkappaB translocation to the nucleus was indeed involved in the antioxidant effect of estradiol, we measured hydrogen peroxide levels in cells treated with estradiol, at physiological concentrations, and PDTC, an inhibitor of NFkappaB translocation to the

nucleus. Figure 6.6 shows that in fact, NFkappaB translocation to the nucleus is involved in the antioxidant effect of estradiol. When we co-treated the cells with the inhibitor of NFkappaB translocation to the nucleus, the antioxidant effect of estradiol was lost.

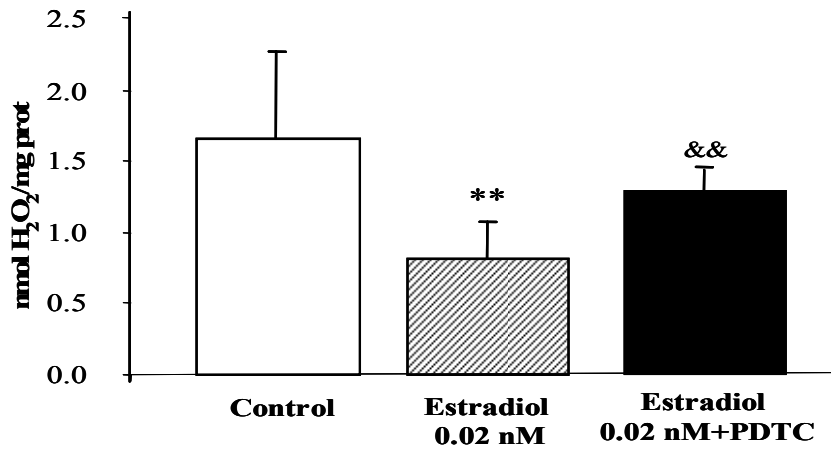
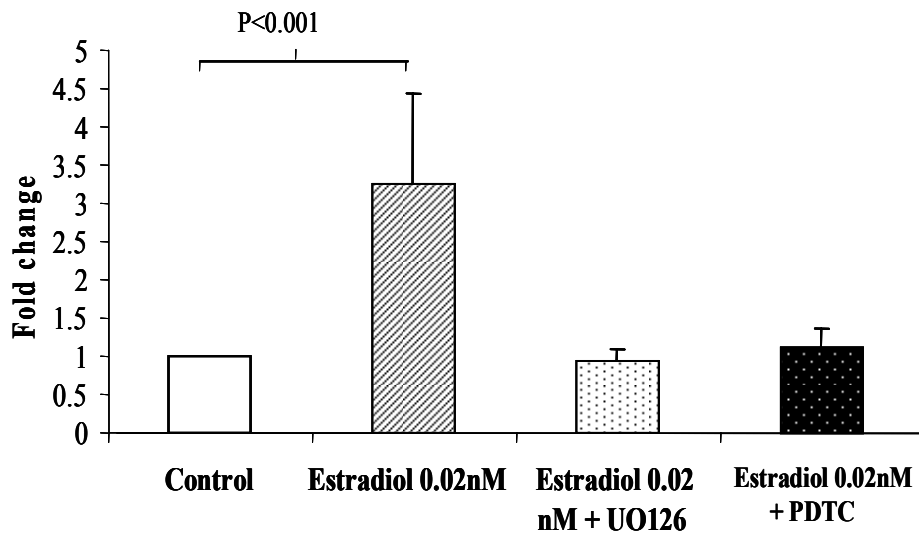


Figure 6.6 NF- κ B mediate the antioxidant effect of estradiol. Data are expressed as mean \pm SD of 8–10 different experiments. The statistical significance is expressed as **P < 0.01 vs. control, &&P < 0.01 vs. estradiol 0.02 nM. PDTC alone non affected H₂O₂ levels significantly.

Finally, the next step was to determine if estradiol was able to up-regulate the expression of the antioxidant enzymes Manganese-Superoxide dismutase and Glutathione Peroxidase, and the involvement of MAPK and NFkappaB activation on this up-regulation. Figure 6.7 shows that estradiol up-regulates the expression of the mentioned enzymes after 48 hours of treatment and that both, MAPK and NFkappaB signalling pathways, are involved in the up-regulation of these enzymes by estradiol.

A) Mn-Superoxide Dismutase expression



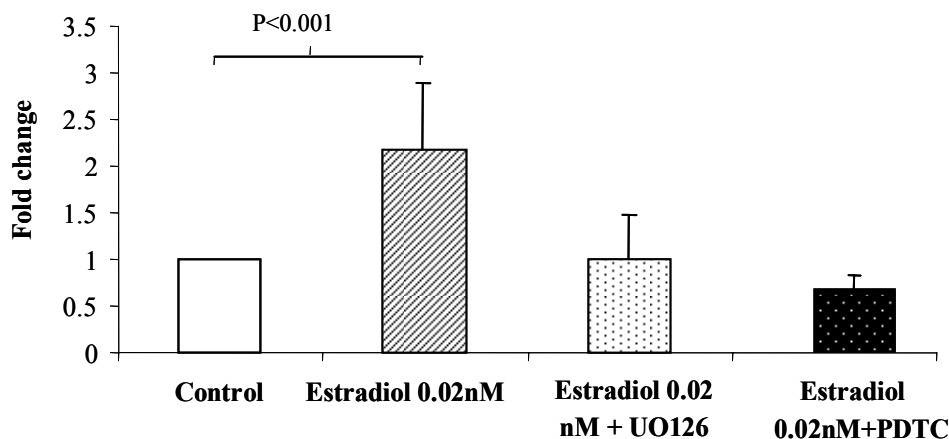
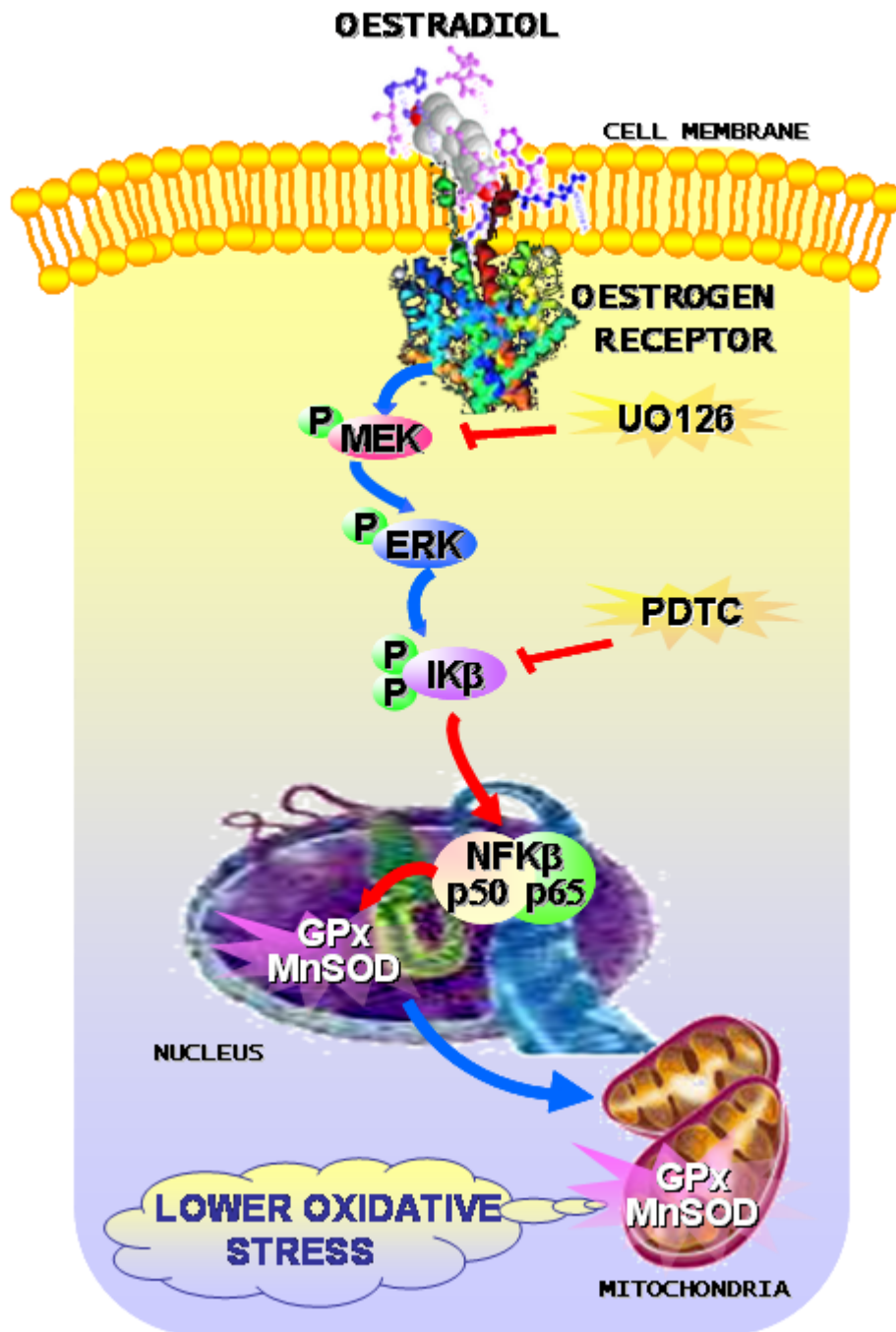
B) Glutathione peroxidase expression

Figure 6.7 Estradiol up-regulates antioxidant enzyme expression, mediated by MAPK and NFκB. (A) Mn-SOD

expression. Estradiol (0.02 nM) increases the levels of Mn-SOD mRNA ($P < 0.001$ vs. control), which is prevented by coincubation with 1 μ M UO126 or with 200 μ M PDTC. (B) Gpx expression. Estradiol (0.02 nM) increases the levels of GPx mRNA ($P < 0.001$ vs. control), which is prevented by coincubation with 1 μ M UO126 or with 200 μ M PDTC. Data are expressed as fold change vs. control (mean \pm SD) of three different experiments

Using these pharmacological inhibitors of the signalling pathways, we concluded that estradiol up-regulates the expression of Mn-SOD and GPx mediated by the following pathway: interaction with membrane estrogen receptor, activation of MAP kinases, activation of NF-kappaB, and up-regulation of gene expression (Borras et al., 2005).

Figure 6.8 summarizes the proposed mechanism:



6.7 PHYTOESTROGENS MIMIC THE BENEFICIAL ACTION OF ESTROGENS IN PROMOTING MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT DEFENCES

The effect of estradiol as an up-regulator of antioxidant and longevity-related genes indicates that its administration might be beneficial to increase life span, particularly in males that should reach in that way a life span similar to females. However, considerable evidence has shown that estrogen replacement therapy after menopause may have set backs (Enserink, 2002). Phytoestrogens constitute an interesting alternative. Their beneficial effects have been reported repeatedly (Munro et al., 2003; Mahn et al., 2005) and, to our knowledge very few, if any, serious reports have shown detrimental effects. Thus, we tested the effect of 0.5 microM genistein, one of the major phytoestrogens in soya (Park et al., 2005) on the H₂O₂ levels in MCF 7 cells. This level of genistein can be considered as nutritionally relevant as it is the concentration normally found in the blood of Far East people who eat relatively large quantities of soya in their normal diet. This concentration is, however, significantly higher than the one found in people living in the Western world.

We found that genistein significantly decreased H₂O₂ levels in cells and that, just as with estradiol, this effect is mediated by estrogen receptors (see Figures 6.9 and 6.10). We then studied if the signalling pathway that we had found to explain the antioxidant effects of estradiol also acted for genistein and found that indeed this is the case and that genistein increases MAP kinases (see Figure 6.11 A and B) and activates NF-kappaB (see

Figure 6.12) resulting in an up-regulation of the antioxidant gene for Mn-SOD (see Figure 6.13)(Borras et al., 2006).

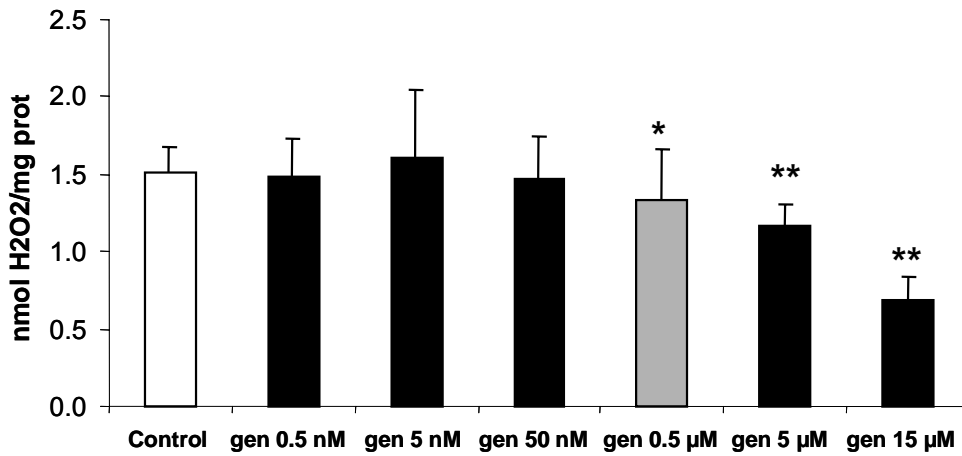


Figure 6.9 Genistein diminishes peroxide levels in MCF-7 cells at concentrations detected in the plasma of populations (0,5μM) consuming soy protein diets rich in isoflavones. Peroxide levels were determined by a fluorimetric method using homovanilic acid. Data are expressed as mean ± SD for 8-10 different experiments, *p<0.05 **p< 0.01 vs control.

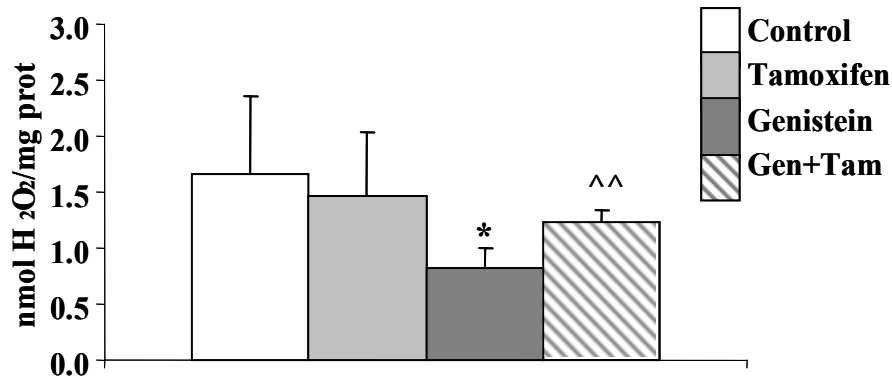
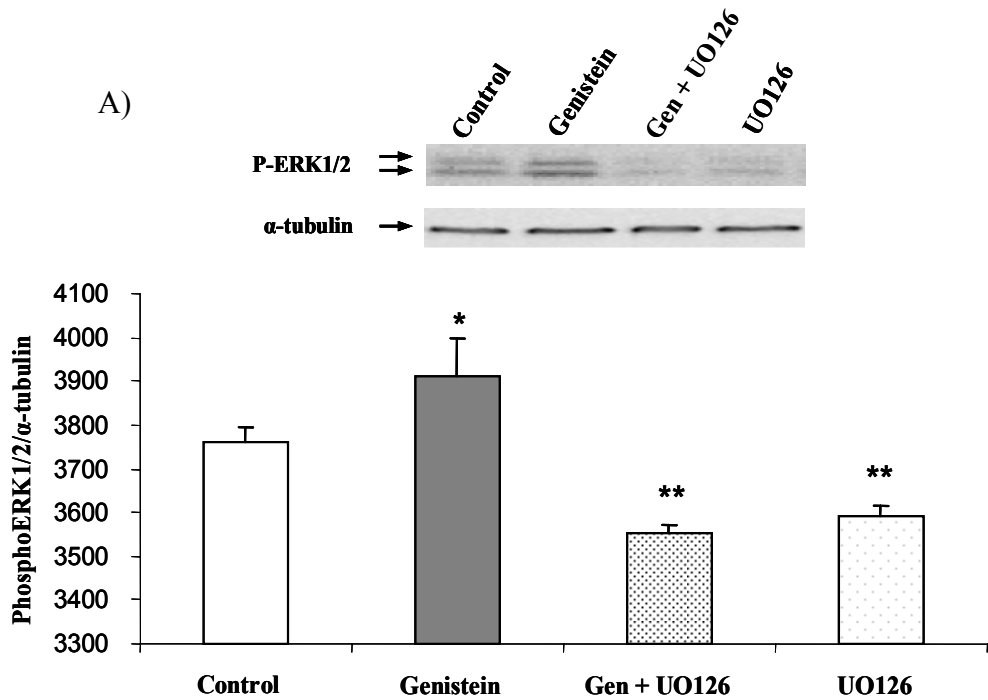


Figure 6.10 Antioxidant effects of genistein involve estrogen receptor(s). MCF-7 cells were treated with genistein (0.5 μ M) and/or tamoxifen (15 μ M) for 48 h. Data are expressed as means \pm SD for 6-8 different experiments, * p < 0.05 versus control and ^^ p <0.01 versus genistein.



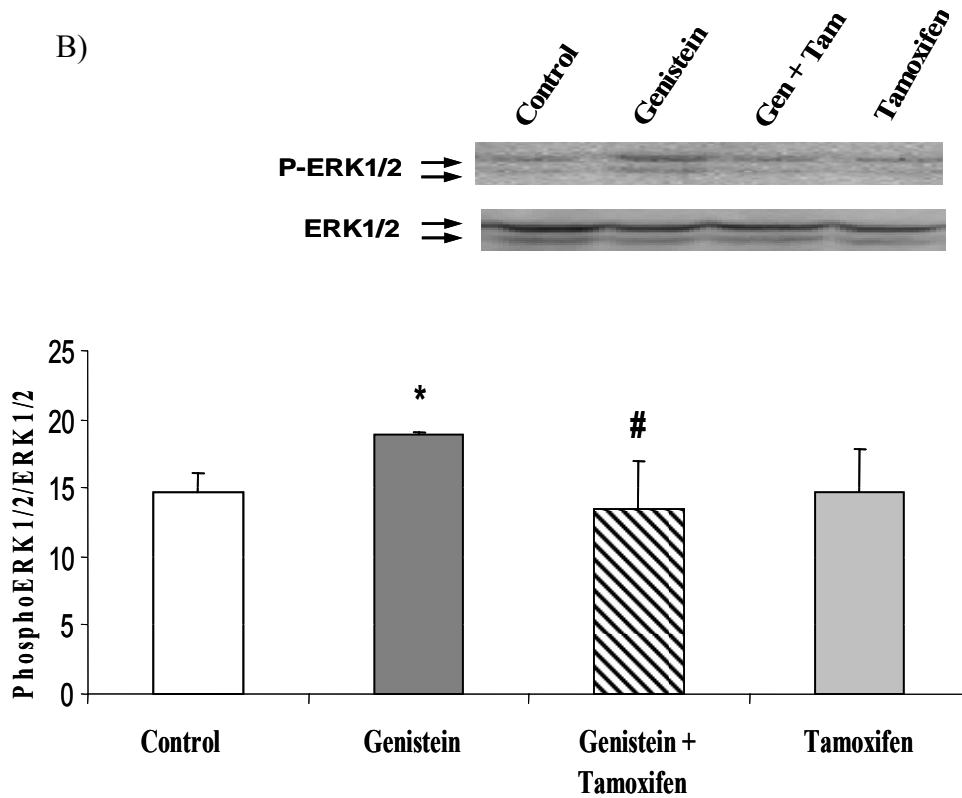


Figure 6.11 Genistein activates extracellular-signal regulated kinase pathway. A representative Western blot is shown of phospho-ERK 1/2 in MCF-7 cells after 3 min incubation with genistein (0.5 μ M) alone (A) or following co-incubation with 15 μ M tamoxifen (B). Histograms represent densitometric measurement of specific bands of phospho-ERK 1/2 content using total ERK levels as house-keeping controls. Data are expressed as means \pm SD for 5 independent experiments, * p <0.05; ** p <0.01 versus control.

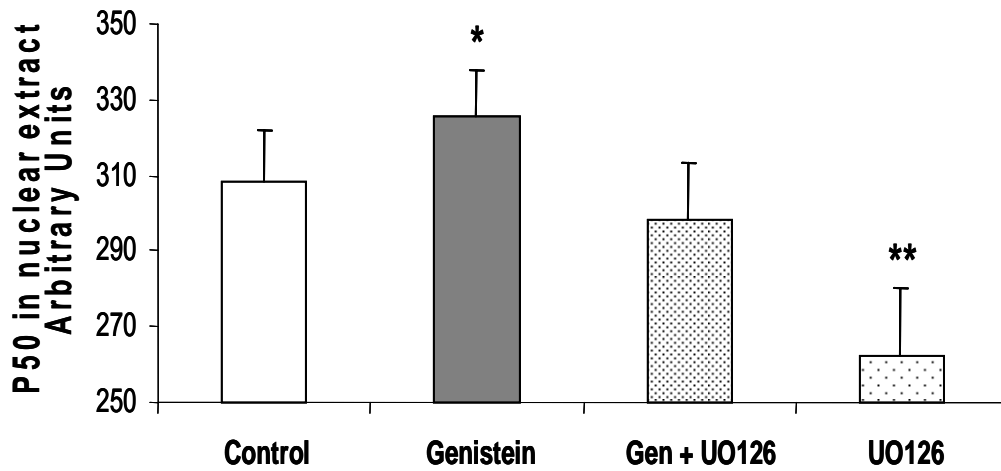


Figure 6.12 Genistein activates the NF- κ B signalling pathway in MCF-7 cells. Levels of the active p50 subunit of NF- κ B were measured in nuclear lysates from cells treated for 48 h with 0.5 μ M genistein alone or following co-incubation with 1 μ M UO126. Data are expressed as means \pm SD for 5 different experiments, * p <0.05; ** p < 0.01 versus control.

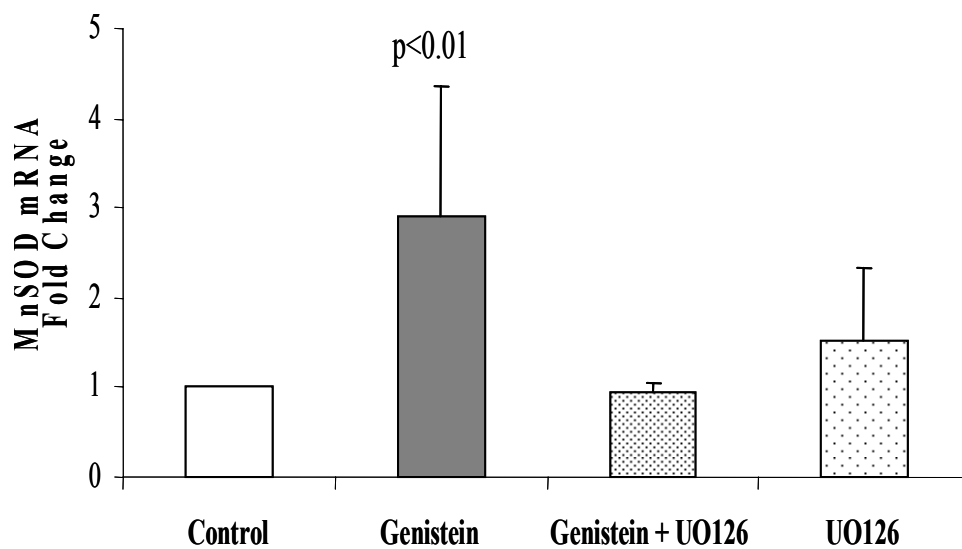
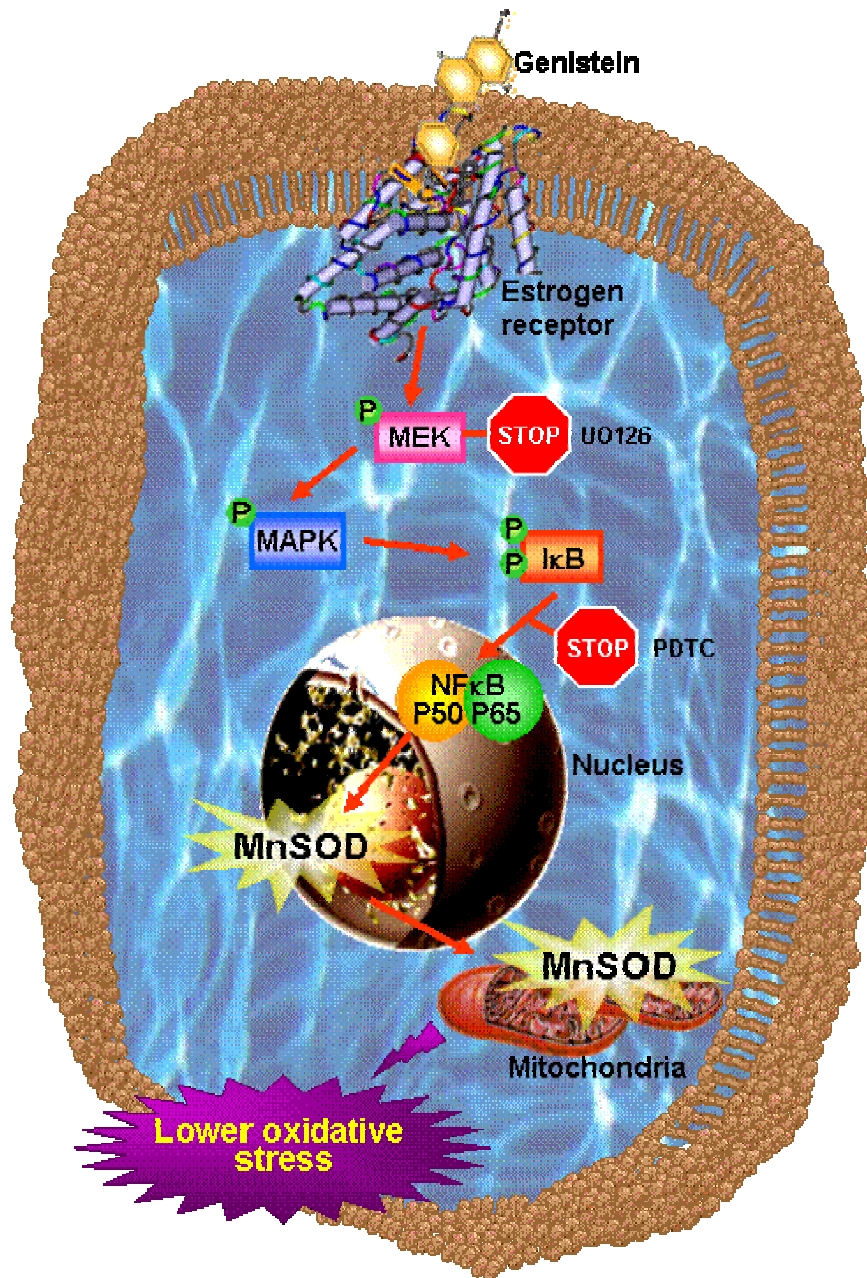


Figure 6.13 Genistein up-regulates the expression of MnSOD in MCF-7 cells. Genistein (0.5 μ M) induced increases in mRNA levels of Mn-SOD ($p < 0.01$ versus control) are abrogated following co-incubation of cells with 1 μ M U0126. Data are expressed as means \pm SD for three experiments.

Figure 6.14 summarizes the proposed mechanism:



6.8 PERSPECTIVES

Finding good models of aging is a major aim of gerontology. The different longevity between genders, *i.e.* that females live around 10% more than males in many species, including humans, offers a unique opportunity to study fundamental aspects of aging.

In the context of the mitochondrial theory of aging, we have found that mitochondrial oxidant production is approximately double in females than in males. We have traced this advantage of females to the presence of estrogens, which act via a pathway that comprises membrane estrogen receptors, MAP kinase, NF-kappaB signalling and the up-regulation of the expression of the antioxidant enzymes Mn-SOD and GPx. Estrogen administration after menopause has clinical problems and, obviously, cannot be given to males. Phytoestrogens offer an interesting alternative. We have found that at concentrations found in plasma, they increase the expression of antioxidant enzymes without the feminizing effects of estradiol. The possibility of using those compounds to increase the longevity of males to reach the longevity of females is a fact to be seriously considered (Borras et al., 2007).

This perspective prompted us to study the effect of red wine on the longevity of male flies *Drosophila melanogaster*. The results obtained in this study are shown in the follow chapter of the present thesis.

6.9 EFFECT OF RED WINE ON THE LONGEVITY OF MALE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Red wine is without doubting one of the natural substances consumed by human beings with the highest antioxidant capacity. This is because red wine is rich in polyphenols(Alberti-Fidanza, Burini et al., 2003). Some of them are phytoestrogens (Kopp, 1998).

As we have previously demonstrated that soya has antioxidant effects *in vivo* (Mahn, Borrás et al., 2005) and genistein, one of the phytoestrogens present in soya, have antioxidant properties at nutritionally relevant concentrations *in vitro* (Borrás, Gambini et al., 2006), we studied if one of the most common beverages in Spain, red wine, could have similar antioxidant effects.

For this purpose, we choose a relative good model to determine longevity, which is *Drosophila melanogaster* and study if red wine consumption, at low doses, could increase the longevity of these flies.

As ethanol has been proposed to have toxic effects to the body, we included a group who ate food with dealcoholized red wine.

As shown in Figure 6.15, red wine increase the longevity of male *D. melanogaster*, and the effect was more pronounced in flies which ate dealcoholized red wine.

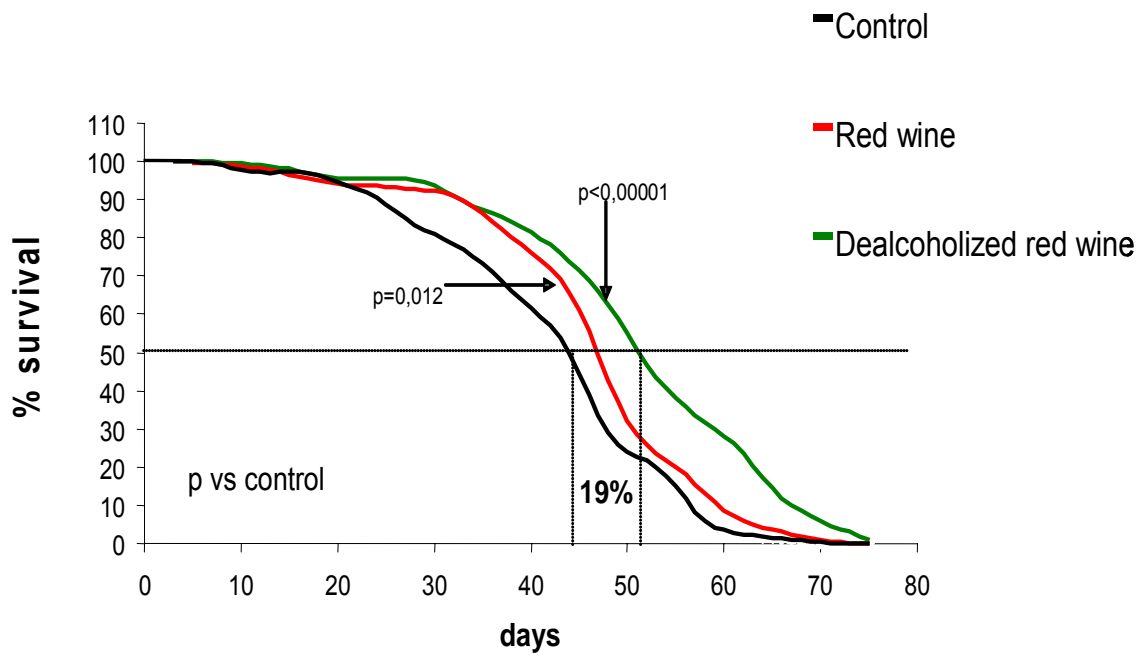


Figure 6.15. Effect of red wine and dealcoholized red wine in *Drosophila melanogaster* longevity curve. The statistical significance is expressed with Kaplan-Meier method and log-rank test as ($P < 0.012$ vs. control) and ($P < 0.00001$ vs. control)

We also determine in these flies the RNA expression of antioxidant enzyme, catalase, and one enzyme which is proposed to be a biomarker of aging, the 16S rRNA subunit (Calleja, Pena et al., 1993; Crawford, Wang et al., 1997; Borrás, Sastre et al., 2003). We found that those enzymes were up-regulated in flies which ate food with red wine or dealcoholized red wine compared to control flies, giving as an explanation for their longer longevity (see Figure 6.16 and 6.17).

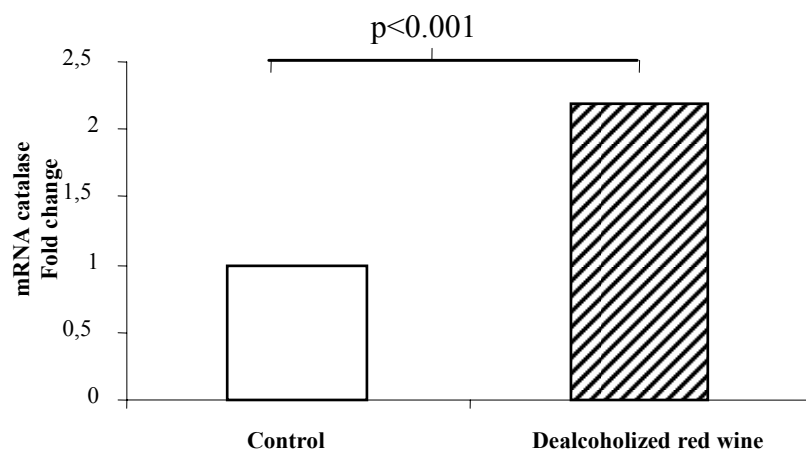


Figure 6.16 Dealcoholized red wine up-regulates antioxidant enzyme expression of catalase. The level of catalase mRNA was measured in the half life span ($P < 0.001$ vs. control). Data are expressed as fold change vs. control of three different experiments with 5 flies per condition.

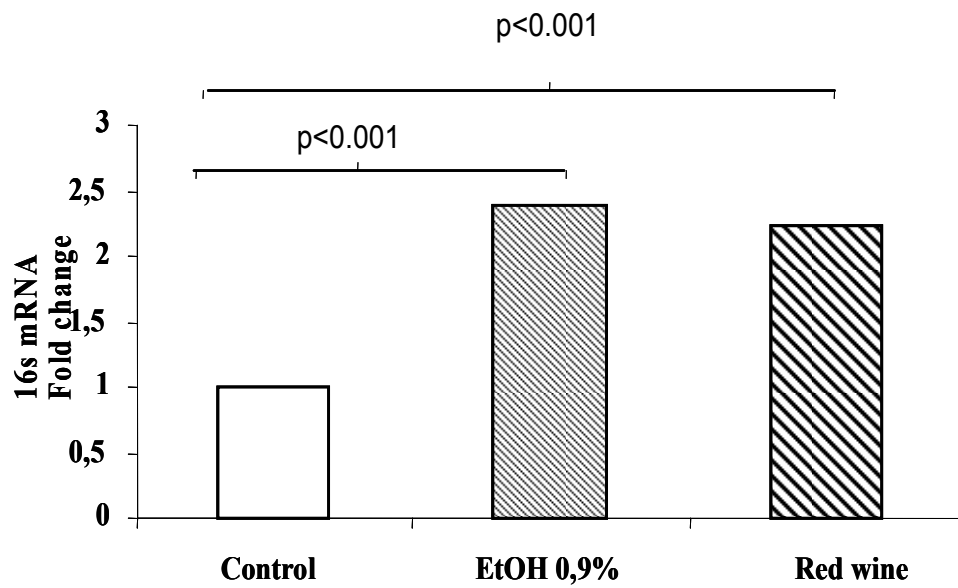


Figure 6.17 Red wine up-regulates antioxidant enzyme expression, of 16S rRNA. The level of 16S rRNA mRNA was measured in the half life span ($P < 0.001$ vs. control). Data are expressed as fold change vs. control of three different experiments with 5 flies per condition.

6.10 EFFECT OF RED WINE ON THE ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN WISTAR RATS

In order to check if these effects could be extrapolated to mammals, we performed a study in male Wistar rats.

For this purpose, we grouped the rats as follows:

Control: Male Wistar rats fed with standard food and tap water.

Red Wine: Male Wistar rats fed with standard food and tap water with red wine (1:2, v:v)

Dealcoholized red wine: Male Wistar rats fed with standard food and tap water with red wine (1:2, v:v)

Tables 6.1, 6.2, and 6.3 show the food and drink intake, weight and weight variation of the rats during the two weeks treatment.

	Food intake (g/day)			Drink intake (mL/day)		
Control	22,9	±	6,2	18,4	±	1,5
Red wine	13,6	±	1,1	20,2	±	2,7
R.w.dealc.	15,6	±	2,5	18,6	±	3,1

Table 6.1 Values of intake and drink in young rats treated with red wine, dealcoholized red wine and control.

	Initial weight (g)		Final weight (g)	
Control	359,3	± 29,4	358,5	± 36,4
Red wine	326,3	± 33,2	334,8	± 36,2
Red wine dealc.	342,0	± 43,4	352,3	± 56,1

Table 6.2 Initial and final weight in young rats treated with red wine, dealcoholized red wine and its control.

	Increment weight (g)		Percentual increment (%)	
Control	-0,8	± 14,9	-0,2	± 4,2
Red wine	8,5	± 10,4	2,6	± 3,2
Red wine dealc.	10,3	± 15,7	3,0	± 4,6

Table 6.3 Increments of weight in young rats treated with red wine, dealcoholized red wine and its control.

The rats were treated for two weeks and then were sacrificed. We extracted all the tissues and measured the activity of the antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate deshydrogenase.

As is shown in Tables 6.4, 6.5, 6.6 an 6.7, red wine or dealcoholized red wine exert its antioxidant effect by increasing the activity of catalase and glutathione peroxidase.

Catalase	Liver		Heart		Brain	
	U/mgProt	SD	U/mgProt	SD	U/mgProt	SD
Control	38,8	± 6,0	11,8	± 0,5	4,8	± 1,2
red wine	36,1	± 9,2	14,7	± 2,8	3,0	± 1,6
red wine deal	42,6	± 5,8	12,5	± 2,9	11*	± 4

Table 6.4 Catalase Activity in different tissues of young male rats. Data are expressed as means ± SD for 4 experiments per group, *p<0.05 versus control.

GPx	Liver		Heart	
	U/mgProt	SD	U/mgProt	SD
Control	1,8	± 0,4	0,75	± 0,07
red wine	2,2	± 0,8	0,61*	± 0,06
red wine deal	2,3	± 1,2	0,58*	± 0,08

Table 6.5 Glutathione peroxidase Activity in different tissues of young male rats. Data are expressed as means ± SD for 4 experiments per group, *p<0.05 versus control.

GR	Liver	
	U/mgProt	SD
Control	0,18	± 0,02
red wine	0,19	± 0,01
red wine deal	0,17	± 0,02

Table 6.6 Glutathione reductase Activity in different tissues of young male rats. Data are expressed as means ± SD for 4.

G6P-DH	Liver	
	U/mgProt	SD
Control	0,007	± 0,003
red wine	0,009	± 0,001
red wine deal	0,007	± 0,001

Table 6.7 Glucose-6-phosphate deshydrogenase Activity in different tissues of young male rats. Data are expressed as means ± SD for 4.

BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz, H. (2002). "Phyto-oestrogens and cancer." *Lancet Oncol* 3(6): 364-73.
- Adlercreutz, H., H. Markkanen, et al. (1993). "Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men." *Lancet* 342(8881): 1209-10.
- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Alberti-Fidanza, A., G. Burini, et al. (2003). "Acute effects of lyophilised red wine on total antioxidant capacity in healthy volunteers." *Diabetes Nutr Metab* 16(1): 65-71.
- Albertini, R., S. Rindi, et al. (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." *Arch. Biochem. Biophys.* 327(2): 207-214.
- Aleman, V. and P. Handler (1967). "Hiydrorotate dehydrogenase." *J. Biol. Chem.* 242: 4087-4092.
- Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." *Science* 221: 1256-1264.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.
- Aronica, S. M., W. L. Kraus, et al. (1994). "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18): 8517-21.
- Asensi, M., J. Sastre, et al. (1994). "A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples." *Anal. Biochem.* 217: 323-328.
- Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668.

- Baccarini, D. P. (1978). "Coupled oxidation of NADPH wigy thiols at neutral pH." *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 315-357.
- Barja de Quiroga, C. (1999). "Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of produccion in states 4 an 3, organ specificity and relation to aging and longevity." *J. Bioenergetics Biomembranes* 31(4): 347-366.
- Barja, G. (2002). "Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity." *Free Radic Biol Med* 33(9): 1167-72.
- Barja, G., S. Cadenas, et al. (1994). "Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds." *Free Radic Res* 21(5): 317-27.
- Barton, J. P. and J. E. Parker (1970). "The radolysis of oxigenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O₂." *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* 2: 159-166.
- Basly, J. P., F. Marre-Fournier, et al. (2000). "Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol." *Life Sci* 66(9): 769-77.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." *Physiol Rev* 78(2): 547-81.
- Begun, A. Z., I. A. Iachine, et al. (2000). "Genetic nature of individual frailty: comparison of two approaches." *Twin Res* 3(1): 51-7.
- Behl, C., T. Skutella, et al. (1997). "Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship." *Mol Pharmacol* 51(4): 535-41.

- Bellomo, C., S. A. Jewel, et al. (1982). "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6842-6846.
- Bendich, A., L. J. Machlin, et al. (1986). "The antioxidant role of vitamina C." *Free radical biology and medicine* 2: 419-444.
- Benzi, G. and A. Moretti (1995). "Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Radic Biol Med* 19(1): 77-101.
- Berthois, Y., N. Pourreau-Schneider, et al. (1986). "Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems." *J Steroid Biochem* 25(6): 963-72.
- Bielsky, B. H. and J. M. Gebieki (1977). Application of radiation chemistry to biology. *Free radicals in biology.* P. W.A., Academic Press. 3: 1-19.
- Borel, J. P., J. C. Monboisse, et al. (1988). *Med. Sci.* 5: 304-311.
- Borras, C. (2003). *Importancia del estrés oxidativo en la diferencias de longevidad entre achos y hembras.* Valencia, Universidad de Valencia.
- Borras, C., J. Gambini, et al. (2005). "17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade." *Aging Cell* 4(3): 113-8.
- Borras, C., J. Gambini, et al. (2006). "Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB." *Faseb J* 20(12): 2136-8.

- Borras, C., J. Gambini, et al. (2007). "Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males." *Front Biosci* 12: 1008-13.
- Borras, C., J. Sastre, et al. (2003). "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males." *Free Radic Biol Med* 34(5): 546-52.
- Boveris, A. and B. C. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* 143: 707-716.
- Boveris, A. and E. Cadenas (2000). "Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone." *IUBMB Life* 50(4-5): 245-50.
- Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxyde." *Biochem. J.* 128: 617-630.
- Brand, M. D. and M. P. Murphy (1987). "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." *Biol. Rev.* 62: 141-193.
- Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 1033-1077.
- Cadenas, E. and A. Boveris (1980). "Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria." *Biochem J* 188(1): 31-7.
- Cadenas, E., A. Boveris, et al. (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and unbiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 248-257.

- Calleja, M., P. Pena, et al. (1993). "Mitochondrial DNA remains intact during *Drosophila* aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced." *J Biol Chem* 268(25): 18891-7.
- Capdevila, L., L. Parkhill, et al. (1981). "The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 1357-1362.
- Cassidy, A. (2003). "Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets." *Int J Vitam Nutr Res* 73(2): 120-6.
- Cassidy, A., P. Albertazzi, et al. (2006). "Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women." *Proc Nutr Soc* 65(1): 76-92.
- Chaban, V. V., A. J. Lakhter, et al. (2004). "A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes." *Endocrinology* 145(8): 3788-95.
- Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- Chang, L. Y. (1988). "Molecular immunocytochemistry of the Cu,Zn superoxide dismutase in rat hepatocytes." *J. Cell. Biol.* 107: 2169-2179.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.
- Chen, D., P. Ganapathy, et al. (1999). "Potential regulation of membrane trafficking by estrogen receptor alpha via induction of rab11 in uterine glands during implantation." *Mol Endocrinol* 13(6): 993-1004.
- Chen, J. Q., J. D. Yager, et al. (2005). "Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen

- receptors and potential physiological/pathophysiological implications." *Biochim Biophys Acta* 1746(1): 1-17.
- Chen, J. Q., M. Delannoy, et al. (2004). "Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(6): E1011-22.
- Chen, J. Q., M. Eshete, et al. (2004). "Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements." *J Cell Biochem* 93(2): 358-73.
- Chen, Z., I. S. Yuhanna, et al. (1999). "Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen." *J Clin Invest* 103(3): 401-6.
- Ciriolo, M. R., K. Fiskin, et al. (1991). "Age-related changes in Cu,Zn superoxide dismutase, Se-dependent and - independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain." *Mech Ageing Dev* 61(3): 287-97.
- Corbisier, P. and J. Remacle (1990). "Involvement of mitochondria in cell degeneration." *European J. Cell. Biol.* 51: 173-182.
- Cosman, F., V. Shen, et al. (1993). "Estrogen protection against bone resorbing effects of parathyroid hormone infusion. Assessment by use of biochemical markers." *Ann Intern Med* 118(5): 337-43.
- Crawford, D. R., Y. Wang, et al. (1997). "Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 22(3): 551-9.
- Cutler, R. G. (1984). *Antioxidants, aging and longevity. Free radicals in biology.* W. A. Pryor. Orlando, Academic Press. IV: 371-428.

- Czapski, G. and S. Goldstein (1995). "The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach." *Free. Radic. Biol. Med.* 19(6): 785-794.
- Das, K. C., Y. Lewis-Molock, et al. (1995). "Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells." *Am J Physiol* 269(5 Pt 1): L588-602.
- Davies, K. J. A., M. E. Delsignore, et al. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids." *J. Biol. Chem.* 262: 9902-9907.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha, et al. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." *Biochem Biophys Res Commun* 107(4): 1198-205.
- Davis, V. L., J. F. Couse, et al. (1994). "Correlation between low levels of estrogen receptors and estrogen responsiveness in two rat osteoblast-like cell lines." *J Bone Miner Res* 9(7): 983-91.
- de la Asuncion, J. G., A. Millan, et al. (1996). "Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA." *Faseb J* 10(2): 333-8.
- Dean, R. T., S. Gieseg, et al. (1993). "Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins." *TIBS.* 18: 437-441.
- Dempster, D. W. and R. Lindsay (1993). "Pathogenesis of osteoporosis." *Lancet* 341(8848): 797-801.
- Deroo, B. J., S. C. Hewitt, et al. (2004). "Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus." *Endocrinology* 145(12): 5485-92.

- Dolphin, D. (1988). The generation of free radicals during de normal and abnormal functioning of citocromes P450. Oxygen radicals in biology and medicine. M. G. T. Simic, K.A.; Ward, F. F., Sonntag, C.: 491-500.
- Donald, R. and M. D. Johns (1995). "Mitochondrial DNA and disease." N. Engl. J. Med. 333: 638-644.
- Doroshov, J. and P. Hochstein (1982). Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseades. Pathology of Oxigen. New York, Academic Press: 245-253.
- Endoh, H., H. Sasaki, et al. (1997). "Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line." Biochem Biophys Res Commun 235(1): 99-102.
- Enserink, M. (2002). "Women's health. The vanishing promises of hormone replacement." Science 297(5580): 325-6.
- Estrela, J. M., G. T. Saez, et al. (1983). "The effect of cysteine and N-acetylcysteine on rat liver glutathione." Biochem. Pharmacol. 32(22): 3483-3485.
- Farhat, M. Y., S. Abi-Younes, et al. (1996). "Estradiol increases cyclic adenosine monophosphate in rat pulmonary vascular smooth muscle cells by a nongenomic mechanism." J Pharmacol Exp Ther 276(2): 652-7.
- Farmer, K. J. and R. S. Sohal (1987). "Effects of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, *Musca domestica*." Exp Gerontol 22(1): 59-65.
- Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." J. Chem. Soc. Trans. 65: 899-910.

- Fernandez Ballesteros , R. (1999). "Aging in Europe--European Aging. IVth European Congress of Gerontology. Berlin, Germany, July 7-11, 1999. Abstracts." *Z Gerontol Geriatr* 32 Suppl 2: II1-298, 299-312.
- Fisher, B., J. Dignam, et al. (1999). "Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial." *Lancet* 353(9169): 1993-2000.
- Flohe, L. and W. A. Gunzler (1984). "Assays of glutathione peroxidase." *Methods Enzymol* 105: 114-21.
- Forstrom, J. W., J. J. Zakowski, et al. (1978). "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine." *Biochemistry*. 17: 2639-2644.
- Foster, R. R. and R. W. Estabrook (1993). "Is oxygen an essential nutrient?" *Annu. Rev. Nutr.* 13: 383-403.
- Freeman, B. A. and J. Crapo (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injury." *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.
- Fridovich, I. (1974). "Superoxide Dismutases." *Adv Enzymol* 41: 35-97.
- Fridovich, I. (1986). *Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxygen Toxicity. Free Radicals and Biology.* W. A. Pryor. New York, Academic Press. 1: 239-246.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters." *J. Biol. Chem.* 272(30): 18515-18517.
- Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." *Embo J* 16(8): 1921-33.

- Ginaldi, L., M. De Martinis, et al. (2000). "Cell proliferation and apoptosis in the immune system in the elderly." *Immunol Res* 21(1): 31-8.
- Giulivi, C. and K. J. A. Davies (1993). "Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome." *J. Biol. Chem.* 268: 8752-8759.
- Gottardis, M. M. and V. C. Jordan (1987). "Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model." *Cancer Res* 47(15): 4020-4.
- Greenwald, R. A. and W. W. Moy (1980). "Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid." *Arthritis Rheum.* 23: 455-463.
- Grossman, A. and A. Traish (1992). "Site-specific antibodies to the DNA-binding domain of estrogen receptor distinguish this protein from the 3H-estradiol-binding protein in pancreas." *Life Sci* 51(11): 859-67.
- Gruber, C. J., W. Tschugguel, et al. (2002). "Production and actions of estrogens." *N Engl J Med* 346(5): 340-52.
- Gupta, S., D. Campbell, et al. (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway." *Science* 267(5196): 389-93.
- Guvakova, M. A. and E. Surmacz (1997). "Tamoxifen interferes with the insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) signaling pathway in breast cancer cells." *Cancer Res* 57(13): 2606-10.
- Haber, F. and J. Weiss (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." *Naturweiss.* 20: 948.
- Haber, F. and J. Weiss (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." *Proc. R. Soc. London.* 147: 332-351.

- Hageman, H. H., A. Bast, et al. (1992). "Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: Analytical aspects." *Chem. Biol. Interactions*. 82: 243-293.
- Hagen, T. M., D. L. Yowe, et al. (1997). "Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3064-9.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" *Lancet* 344: 721-724.
- Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts." *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med* 18(1): 125-6.

- Halliwell, B. and O. I. Auroma (1991). "DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems." *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J. Gerontol.* 2: 298-300.
- Harman, D. (1972). "The biological clock: The mitochondria." *Journal of the American Geriatrics Society.* 20(4): 145-147.
- Harman, D. (1978). "Free radical theory of aging: Nutritional implications." *Age.* 1: 145-152.
- Harman, D. (1991). "The aging process: Major risk factor for disease and death." *Proc. Natl. acad. Sci.* 88: 5360-5363.
- Harman, D. (2001). "Aging: overview." *Ann N Y Acad Sci* 928: 1-21.
- Hassan, H. M. and I. Fridovich (1977). "Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 252: 7667-7672.
- Hazelton, G. A. and C. A. Lang (1984). "Glutathione levels during the mosquito life span with emphasis on senescence." *Proc Soc Exp Biol Med* 176(3): 249-56.
- Holmgren, A. (1979). "Glutathione dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 254: 3664-3671.
- Hong, J., S. Sang, et al. (2006). "Modulation of arachidonic acid metabolism and nitric oxide synthesis by garcinol and its derivatives." *Carcinogenesis* 27(2): 278-86.
- Hood, D. A., P. J. Adhietty, et al. (2003). "Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway." *Med Sci Sports Exerc* 35(1): 86-94.

- Hopkins, F. G. (1921). "On an Autoxidisable Constituent of the Cell." *Biochem J* 15(2): 286-305.
- Howitz KT, B. K., Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung and K. A. P, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." *Nature* 425(6954): 191-196.
- Huynh, H. T., E. Tetenes, et al. (1993). "In vivo inhibition of insulin-like growth factor I gene expression by tamoxifen." *Cancer Res* 53(8): 1727-30.
- Hyder, S. M., G. M. Stancel, et al. (1996). "Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen." *Cancer Res* 56(17): 3954-60.
- Ischiropoulos, H. (1990). "Effect of aging on pulmonary superoxide dismutases." *Mech. Ageing Dev.* 52: 11-26.
- Jensen, P. K. (1966). "Antimycin insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles." *Biochem. Biophys. Acta.* 122: 157-161.
- Jocelyn, P. C. and A. Kamminga (1974). "The non-protein thiol of rat liver mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 343(2): 356-62.
- Jones, S. A., J. D. Wood, et al. (1994). "The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide bu an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts." *FEBS Lett.* 355: 178-182.
- Jordan, V. C., N. F. Fritz, et al. (1987). "Strategies for breast cancer therapy with antiestrogens." *J Steroid Biochem* 27(1-3): 493-8.

- Kanazawa, T., T. Osanai, et al. (1995). "Protective effects of soy protein on the peroxidizability of lipoproteins in cerebrovascular diseases." *J Nutr* 125(3 Suppl): 639S-646S.
- Kanofsky, J. R. and P. D. Sima (1993). "Singlet-oxygen generation at gas-liquid interfaces: a significant artifact in the measurement of singlet-oxygen yields from ozone-biomolecule reactions." *Photochem Photobiol* 58(3): 335-40.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984). "Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents." *Nucleic Acids Res.* 12: 2137-2145.
- Kasai, H., P. F. Crain, et al. (1986). "Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair." *Carcinogenesis* 7(11): 1849-51.
- Kawagoe, J., M. Ohmichi, et al. (2003). "Raloxifene inhibits estrogen-induced up-regulation of telomerase activity in a human breast cancer cell line." *J Biol Chem* 278(44): 43363-72.
- Ketterer, B. (1986). "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." *Xenobiotica.* 16: 957-973.
- Kleinman, D., M. Karas, et al. (1996). "Stimulation of endometrial cancer cell growth by tamoxifen is associated with increased insulin-like growth factor (IGF)-I induced tyrosine phosphorylation and reduction in IGF binding proteins." *Endocrinology* 137(3): 1089-95.
- Kopp, P. (1998). "Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?" *Eur J Endocrinol* 138(6): 619-20.
- Korte, T., M. Fuchs, et al. (2005). "Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced

- ventricular automaticity after myocardial infarction." *Circulation* 111(18): 2282-90.
- Korycka-Dahi, M. and T. Richardson (1981). "Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk." *J. Dairy Sci.* 63: 1181-1208.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1983). Glutathione and cell membrane thiol status. *Functions of glutathione: Biochemical, Toxicological and Clinical aspects.* A. Larsson, A. Holmgren, S. Orrenius and B. Mannervick. New York, Raven Press: 307-315.
- Krinsky, N. (1994). *Natural antioxidants in human health and disease.* B. Frei. San Diego, Academic Press: 239-262.
- Ku, H. H., U. T. Brunk, et al. (1993). "Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species." *Free Radic Biol Med* 15(6): 621-7.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, et al. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* 138(3): 863-70.
- Kuiper, G. G., P. J. Shughrue, et al. (1998). "The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems." *Front Neuroendocrinol* 19(4): 253-86.
- Lee, B. J., J. K. Kang, et al. (2004). "Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet." *J Vet Sci* 5(3): 227-34.
- Lee, C. K., R. G. Klopp, et al. (1999). "Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction." *Science* 285(5432): 1390-3.

- Lewis, J. M. and M. A. Schwartz (1998). "Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl." *J Biol Chem* 273(23): 14225-30.
- Lezza, A. M., D. Boffoli, et al. (1994). "Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles." *Biochem Biophys Res Commun* 205(1): 772-9.
- Linnane, A. W., S. Marzuki, et al. (1989). "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases." *Lancet*: 642-645.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1994). "The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: in vitro and in vivo." *Free Radical Biol. Med.* 16: 29-33.
- Lippman, R. D. (1985). "Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man." *Exp. Gerontol.* 20: 1-5.
- Lobaton, C. D., L. Vay, et al. (2005). "Modulation of mitochondrial Ca⁽²⁺⁾ uptake by estrogen receptor agonists and antagonists." *Br J Pharmacol* 145(7): 862-71.
- Lopez-Torres, M., R. Perez-Campo, et al. (1991). "Aging in brown fat: antioxidant defenses and oxidative stress." *Mech Ageing Dev* 59(1-2): 129-37.
- Lopez-Torres, M., R. Perez-Campo, et al. (1993). "Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, and basal and maximum aerobic capacity." *Mech Ageing Dev* 70(3): 177-99.

- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, et al. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mahn, K., C. Borrás, et al. (2005). "Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo." *Faseb J* 19(12): 1755-7.
- Mahn, K., C. Borrás, et al. (2005). "Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo." *Faseb J* 19(12): 1755-7.
- Marklund, S. L. (1982). "Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 7634-7638.
- Marquez, D. C. and R. J. Pietras (2001). "Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells." *Oncogene* 20(39): 5420-30.
- Martin, G. M. (1996). "Somatic mutagenesis and antimutagenesis in aging research." *Mutat Res* 350(1): 35-41.
- Mason, R. P. (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. *Free radicals biology.* W. A. Pryor. New York, Academic Press: 262-165.
- McCord, J. M. (1974). "Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase." *Science* 185: 5229-531.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.

- McCord, J. M., B. B. Keele, et al. (1974). "An enzyme based theory of obligate anaerobius: the physiological function of superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci USA* 41: 35-97.
- Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (1999). "The protective effects of estrogen on the cardiovascular system." *N Engl J Med* 340(23): 1801-11.
- Mendelson, C. R., C. T. Evans, et al. (1987). "Regulation of aromatase in estrogen-producing cells." *J Steroid Biochem* 27(4-6): 753-7.
- Messina, M., W. McCaskill-Stevens, et al. (2006). "Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings." *J Natl Cancer Inst* 98(18): 1275-84.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, et al. (1996). "Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells." *Embo J* 15(6): 1292-300.
- Miquel, J. and J. Fleming (1986). Theoretical and experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of cell aging. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. J. E. J. Johnson, R. Walford and D. Harman. New York., Alan R. Liss: 51-74.
- Miquel, J., A. C. Economos, et al. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp. Gerontol.* 15: 579-591.
- Mitchell, J. H., S. J. Duthie, et al. (2000). "Effects of phytoestrogens on growth and DNA integrity in human prostate tumor cell lines: PC-3 and LNCaP." *Nutr Cancer* 38(2): 223-8.
- Moats, R. K., 2nd and V. D. Ramirez (2000). "Electron microscopic visualization of membrane-mediated uptake and translocation of estrogen-BSA:colloidal gold by hep G2 cells." *J Endocrinol* 166(3): 631-47.

- Moncada, S., R. M. J. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology." *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Munro, I. C., M. Harwood, et al. (2003). "Soy isoflavones: a safety review." *Nutr Rev* 61(1): 1-33.
- Nakajima, T., T. Kitazawa, et al. (1995). "17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells." *Eur J Pharmacol* 294(2-3): 625-35.
- Navarro, A. and A. Boveris (2004). "Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(5): R1244-9.
- Nemere, I. and M. C. Farach-Carson (1998). "Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens." *Biochem Biophys Res Commun* 248(3): 443-9.
- Niki, E. (1987). "Antioxidants in relation to lipid peroxidation." *Chem Phys Lipids* 44(2-4): 227-53.
- Nilsen, J., S. Chen, et al. (2006). "Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function." *BMC Neurosci* 7: 74.
- Nina, J., R. Hems, et al. (1978). "Maintenance of glutathione content is isolated hepatocytes." *Biochem J* 170(3): 627-30.
- Ochoa, S. (1983). "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes." *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 325-349.
- Okamoto, H. (1985). "Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans." *Bioassays* 2: 15-21.

- Orr, W. C. and R. S. Sohal (1993). "Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*." *Arch Biochem Biophys* 301(1): 34-40.
- Orr, W. C. and R. S. Sohal (1994). "Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*." *Science* 263(5150): 1128-30.
- Orrenius, S. and P. Moldeus (1984). "The multiple roles of glutathione in drug metabolism." *Trends. Pharmacol. Sci.* 5: 432-435.
- Osborne, C. K., R. Schiff, et al. (2001). "Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation." *Clin Cancer Res* 7(12 Suppl): 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
- Pacifi, R. E. and K. J. Davis (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." *Gerontology* 37: 166-180.
- Pajares, M. A., C. Durán, et al. (1992). "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione." *J. Biol. Chem.* 267(25): 17598-17605.
- Palmieri, C., G. J. Cheng, et al. (2002). "Estrogen receptor beta in breast cancer." *Endocr Relat Cancer* 9(1): 1-13.
- Park, D., T. Huang, et al. (2005). "Phytoestrogens as cardioprotective agents." *Cardiol Rev* 13(1): 13-7.
- Parker, R. S. (1989). "Dietary and biochemical aspects of vitamin E." *Advances in food nutrition and research.* 33: 157-232.
- Patel, R. P., B. J. Boersma, et al. (2001). "Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging." *Free Radic Biol Med* 31(12): 1570-81.

- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 22(2): 153-83.
- Pedram, A., M. Razandi, et al. (2006). "Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells." *Mol Biol Cell* 17(5): 2125-37.
- Perez-Campo, R., M. Lopez-Torres, et al. (1998). "The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach." *J Comp Physiol [B]* 168(3): 149-58.
- Philpot, R. M. (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." *Methods. Enzymol.* 206: 623-631.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1977). "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells." *Nature* 265(5589): 69-72.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1979). "Estrogen receptors in uterine plasma membrane." *J Steroid Biochem* 11(4): 1471-83.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1980). "Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes." *Biochem J* 191(3): 743-60.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1984). "Specific internalization of estrogen and binding to nuclear matrix in isolated uterine cells." *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 84-91.
- Pinto, R. E. and W. Bartley (1969). "The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver." *Biochem J* 115(3): 449-56.

- Postlethwait, E. M., S. D. Langford, et al. (1995). "NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." *Free. Radic. Biol. Med.* 19(5): 553-563.
- Prevot, V., D. Croix, et al. (1999). "Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor." *Endocrinology* 140(2): 652-9.
- Rawley, D. A. and B. Halliwell (1983). "Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease." *Clin. Sci.* 64: 649-653.
- Razandi, M., A. Pedram, et al. (1999). "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells." *Mol Endocrinol* 13(2): 307-19.
- Reinwald, S. and C. M. Weaver (2006). "Soy isoflavones and bone health: a double-edged sword?" *J Nat Prod* 69(3): 450-9.
- Resch, Z. T., C. Oxvig, et al. (2006). "Stress-activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts." *Endocrinology* 147(2): 885-90.
- Rice-Evans, C. A. and N. J. Miller (1996). "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food." *Biochem Soc Trans* 24(3): 790-5.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, et al. (1995). "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids." *Free Radic Res* 22(4): 375-83.

- Richter, C., J. W. Park, et al. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." *Proc. Natl. acad. Sci.* 85: 6465-6467.
- Rickwood, R., M. T. Wilson, et al. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. *Mitochondria, a practical approach*. R. Rickwood, M. T. Wilson and V. M. Darley-Usmar, Ed. IRL Press, Ltd. Reino Unido.: 1-16.
- Rodriguez, A. M., P. M. Carrico, et al. (2000). "Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂." *Free Radic Biol Med* 29(9): 801-13.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *Jama* 288(3): 321-33.
- Ruiz-Larrea, M. B., A. M. Leal, et al. (1997). "Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes." *Rev Esp Fisiol* 53(2): 225-9.
- Ruiz-Larrea, M. B., M. J. Garrido, et al. (1993). "Estradiol-induced effects on glutathione metabolism in rat hepatocytes." *J Biochem (Tokyo)* 113(5): 563-7.
- Russell, K. S., M. P. Haynes, et al. (2000). "Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5930-5.

- Sack, M. N., D. J. Rader, et al. (1994). "Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women." *Lancet* 343(8892): 269-70.
- Sacks, F. M., A. Lichtenstein, et al. (2006). "Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee." *Circulation* 113(7): 1034-44.
- Salomon, D. S., C. Bianco, et al. (1999). "Cripto: a novel epidermal growth factor (EGF)-related peptide in mammary gland development and neoplasia." *Bioessays* 21(1): 61-70.
- Sastre, J., A. Millan, et al. (1998). "A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 24(2): 298-304.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, et al. (1996). "Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes." *Hepatology* 24(5): 1199-205.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, et al. (2000). "Mitochondria, oxidative stress and aging." *Free Radic Res* 32(3): 189-98.
- Sastre, J., M. Asensi, et al. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." *Am. J. Physiol.* 263: R992-R995.
- Sawyer, D. T. (1988). The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , $O_2^{\bullet-}$, HOO^{\bullet} , H_2O_2 and HOO^-) and monooxygen species (O , $O^{\bullet-}$, $^{\bullet}OH$, and OH^-) in water and aprotic solvents. *Oxygen radicals in biology and medicine*. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag, Ed. Plenum Press.: 11-20.

- Schmidt, B. M., D. Gerdes, et al. (2000). "Rapid, nongenomic steroid actions: A new age?" *Front Neuroendocrinol* 21(1): 57-94.
- Schneider, J., H. Kaffarnik, et al. (1996). "[Alcohol, lipid metabolism and coronary heart disease]." *Herz* 21(4): 217-26.
- Serafini, M., J. A. Laranjinha, et al. (2000). "Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans." *J Nutr Biochem* 11(11-12): 585-590.
- Setchell, K. D. and A. Cassidy (1999). "Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health." *J Nutr* 129(3): 758S-767S.
- Sevanian, A., K. Davies, et al. (1985). "Conservation of vitamin C by uric acid in blood." *J. Free Radic. Biol. Med.* 1: 117-124.
- Shen, C. C., W. Wertelecki, et al. (1995). "Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells." *Mutat Res* 337(1): 19-23.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1992). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* 349: 431-434.
- Shigenaga, M. K. and B. N. Ames (1991). "Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage." *Free Radic Biol Med* 10(3-4): 211-6.
- Shigenaga, M. K., T. M. Hagen, et al. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10771-10778.
- Sies, H. (1983). *Biochemistry of oxidative stress. Glutathione: storage, transport and turnover in mammals.* S. Y., T. Higashi and N.

- Tateishi, Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrech.: 63-69.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." *Angew. Chem.* 25: 1058-1071.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." *Eur J Biochem* 215(2): 213-9.
- Simpkins, J. W., P. S. Green, et al. (1997). "Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease." *Am J Med* 103(3A): 19S-25S.
- Skulachev, V. P. (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants." *Quat. Rev. Biophys* 29: 169-202.
- Skulachev, V. P. (1998). "Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades." *FEBS Lett* 423(3): 275-80.
- Slater, T. F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." *Biochem. J.* 222: 1-15.
- Sohal, R. S. (1993). "The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status." *Aging (Milano)* 5(1): 3-17.
- Sohal, R. S. and B. H. Sohal (1991). "Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging." *Mech Ageing Dev* 57(2): 187-202.
- Sohal, R. S., I. Svensson, et al. (1990). "Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species." *Mech Ageing Dev* 53(3): 209-15.
- Sohn, O. S., E. S. Fiala, et al. (1999). "Comparative effects of phenylenebis(methylene)selenocyanate isomers on xenobiotic

- metabolizing enzymes in organs of female CD rats." *Carcinogenesis* 20(4): 615-21.
- Sparrow, C. P. and J. Olszewski (1993). "Cellular oxidation of low-density lipoprotein by thiols: Superoxide-dependent and -independent mechanisms." *J. Lipid Res.* 34: 2051-2061.
- Stadman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." *Science* 257: 1220-1224.
- Stefano, G. B., V. Prevot, et al. (2000). "Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia." *Circulation* 101(13): 1594-7.
- Strehler, B. L. (1985). "Aging: a challenge to science, society, and the individual." *Clin Geriatr Med* 1(1): 5-13.
- Sun, A. Y., A. Simonyi, et al. (2002). "The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols." *Free Radic Biol Med* 32(4): 314-8.
- Suter, M. and C. Richter (1999). "Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases." *Biochemistry* 38(1): 459-64.
- Swan, P. B. (1997). "To live longer, eat less! (McCay, 1934-1939)." *J Nutr* 127(5 Suppl): 1039S-1041S.
- Szego, C. M. and J. S. Davis (1967). "Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(4): 1711-8.
- Takada, A., J. Neil, et al. (1982). "Clinicopathological study of alcoholic fibrosis." *American Journal of Gastroenterology* 77: 660-666.

- Tanner, B. and M. Mueckler (1993). "Molecular cloning of a mouse extracellular signal regulated kinase (erk-1)." *Biochim Biophys Acta* 1171(3): 319-20.
- Tateishi, N., T. Higashi, et al. (1974). "Studies of the regulation of glutathione level in rat liver." *J. Biochem.* 75: 90-103.
- Todd, D. G., R. B. Mikkelsen, et al. (1999). "Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and ERBB-3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells." *J Recept Signal Transduct Res* 19(6): 885-908.
- Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes." *J Cell Biol* 91(3 Pt 2): 271s-283s.
- Vance, P. G., B. B. Keele Jr., et al. (1972). "Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. Isolation and characterization of two forms of the enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 247: 4782-4786.
- Ventura, P., A. Bini, et al. (2004). "Red wine consumption prevents vascular oxidative stress induced by a high-fat meal in healthy volunteers." *Int J Vitam Nutr Res* 74(2): 137-43.
- Viguie, C. A., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Antioxidant estatus and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise." *J. Appl. Physiol.* 75: 566-572.
- Vina, J. (1990.). *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Boca Raton Florida, CRC Press.
- Vina, J., C. Borras, et al. (2005). "Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds." *FEBS Lett* 579(12): 2541-5.

- Vina, J., C. Borras, et al. (2005). "Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones." *Sci Aging Knowledge Environ* 2005(23): pe17.
- Viña, J., G. T. Sáez, et al. (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." *Biochem. J.* 212: 39-44.
- Vina, J., J. Sastre, et al. (1992). "Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants." *Exs* 62: 136-44.
- Vina, J., J. Sastre, et al. (2003). "Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males." *Antioxid Redox Signal* 5(5): 549-56.
- Vladimirov, Y. A. (1986). Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences. Free radicals, aging and degenerative diseases. J. E. Johnson, R. Walford, D. Harman, J. Miquel and A. R. Liss: 141-195.
- Walford, R. L., L. Weber, et al. (1995). "Caloric restriction and aging as viewed from Biosphere 2." *Receptor* 5(1): 29-33.
- Wallace, D. C. (1994). "Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 8739-46.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, et al. (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." *Embo J* 16(8): 1909-20.
- Watson, C. S., A. M. Norfleet, et al. (1999). "Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha." *Steroids* 64(1-2): 5-13.
- Watts, C. K., K. J. Sweeney, et al. (1994). "Anti-estrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 31(1): 95-105.

- Wawrzak, Z., W. L. Duax, et al. (1988). "Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other catechol estrogens." *J Steroid Biochem* 29(4): 387-92.
- Weindruch, R. (1996). "The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates." *Toxicol Pathol* 24(6): 742-5.
- Weindruch, R. (1996). "The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates." *Toxicol Pathol* 24(6): 742-5.
- Weindruch, R. and R. S. Sohal (1997). "Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging." *N Engl J Med* 337(14): 986-94.
- Weisger, R. A. and I. Fridovich (1973). "Superoxide dismutase: Organella specificity." *J. Biol. Chem.* 248: 3582-3591.
- White, R. P. (1990). "Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agents." *Neurosurg. Clin. N. Am.* 1(2): 401-415.
- Whitten, K. W., K. D. Gailey, et al. (1992). *Química General*. Méjico, Editorial McGraw-Hill.
- Wilson, T., H. March, et al. (2002). "Antioxidant effects of phyto-and synthetic-estrogens on cupric ion-induced oxidation of human low-density lipoproteins in vitro." *Life Sci* 70(19): 2287-97.
- Xu, X., K. S. Harris, et al. (1995). "Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women." *J Nutr* 125(9): 2307-15.
- Yang, S. H., R. Liu, et al. (2004). "Mitochondrial localization of estrogen receptor beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12): 4130-5.
- Yost, F. J. and I. Fridovich (1973). "An iron containing Superoxide dismutase from *E. coli*." *Journal of Biological Chemistry* 248: 2905-2908.

- Zhai, P., T. E. Eurell, et al. (2000). "Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(6): H2766-75.
- Zhai, P., T. E. Eurell, et al. (2001). "Effects of dietary phytoestrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated female rat hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(3): H1223-32.
- Zhou, L. Z., A. P. Johnson, et al. (2001). "NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells." *Free Radic Biol Med* 31(11): 1405-16.
- Zysek, E., L. Dufy-Barbe, et al. (1981). "Short-term effect of estrogen on release of prolactin by pituitary cells in culture." *Biochem Biophys Res Commun* 102(4): 1151-7.

CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, podemos extraer las siguientes conclusiones enumeradas a continuación:

1. El estradiol actúa como antioxidante en células de mama a concentraciones fisiológicas.
2. La genisteína actúa como antioxidante en células de mama a concentraciones nutricionalmente relevantes.
3. Ambos compuestos no actúan como antioxidantes debido a su estructura química sino porque activan vías de señalización.
4. La unión del estradiol o la genisteína a receptores estrogénicos de membrana activa la vía de las MAP kinasas ERK1/2.
5. Las MAP kinasas ERK1/2 activadas por el estradiol y la genisteína desencadenan la translocación del Factor Nuclear kappa B (NFκB) al núcleo.
6. El Factor Nuclear kappa B, una vez en el núcleo, induce la expresión de dos genes antioxidantes con elementos de respuesta a este factor de transcripción, la Mn-superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa.
7. Los niveles de peróxido de hidrógeno disminuyen en células de mama tras 48 horas de tratamiento con estradiol o genisteína.
8. El estradiol o la genisteína actúan como antioxidantes directamente en mitocondrias aisladas de ratas macho porque previenen la salida de citocromo c, actuando de modo similar a la ciclosporina A.
9. El vino, rico en fitoestrógenos, alarga la longevidad de las moscas, modificando la expresión de genes relacionados con la longevidad.
10. El vino, rico en fitoestrógenos, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes en ratas Wistar

