

17.944

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



\* 5 3 0 9 5 7 0 3 4 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

"Efectos de la manipulación de antioxidantes enzimáticos endógenos y de la edad a lo largo del ciclo vital de *Rana perezi*, en relación con los radicales de oxígeno"

Vº Bº

El director

Gustavo Barja de Quiroga

Mónica López Torres

Memoria presentada por Mónica López Torres para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Junio de 1992

**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Gustavo Barja de Quiroga.**

La realización de presente trabajo se ha llevado a cabo, en parte, gracias al apoyo económico prestado por una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia, y un Proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social del Ministerio de Sanidad y Consumo.

*A mis Padres*

Son muchas las personas que durante la realización de este trabajo y de una u otra manera han contribuido a que éste saliera adelante; a todas ellas muchísimas gracias.

Muy especialmente agradezco al Dr. Gustavo Barja de Quiroga su constante ayuda y dirección, tanto en la fase de realización de este trabajo, como en la de redacción. Aprender a su lado y comprobar día a día su dedicación e interés científico constituyen todo un estímulo para mí.

A los profesores D. Arsenio Fraile Ovejero, Dña. Mercedes Alonso Bedate y Dña. Mónica de la Fuente del Rey, quienes como directores del Departamento desde mi incorporación al mismo hasta hoy, siempre han mostrado interés y amabilidad.

A Rosa, mi compañera de laboratorio durante todos estos años; hemos trabajado juntas mucho tiempo y pasado por mejores y peores momentos, espero que al final los recuerdos agradables sean los que perduren y el cansancio, los nervios, y los malos ratos se olviden pronto. Gracias por todo Rosa.

A todos los compañeros y amigos del Departamento, y en especial aquellos que comparten conmigo risas y lagrimas, Begoña, M<sup>a</sup> Jesús, Nuria, Angel Luis, Cari y Susana, así como María, M<sup>a</sup> Paz, Pedro, M<sup>a</sup> Jose, Chiky, Marisa y todos los demás, gracias por vuestro interés, amistad y continuos ánimos.

A Dolores y Alberto que en estas últimas semanas han hecho todo y más por mí y han estado a mi lado cuando más les necesitaba, muchísimas gracias.

Gracias también a Julia por estar siempre dispuesta a echarme una mano cuando y en lo que haga falta, por cederme su tiempo y también su ordenador, y por hacerlo todo con una sonrisa.

Por último quiero dar las gracias a mi familia, a mis padres y hermanas, por su ayuda y comprensión, por creer en mí y animarme a realizar mis sueños. Gracias, en definitiva, a todos aquellos que derrocharon su paciencia conmigo, e incluso aquellos que la perdieron en el camino. Y muy especialmente a Alberto por aguantar siempre, por animarme cuando me invade el desánimo y compartir conmigo sueños e ilusiones.

## **ABREVIATURAS**

<b>ANOVA</b>	<b>Análisis normal de varianza</b>
<b>AT</b>	<b>3-amino-1,2,4-triazol</b>
<b>BHT</b>	<b>Butilhidroxitolueno</b>
<b>CAT</b>	<b>Catalasa</b>
<b>COX</b>	<b>Citocromo c oxidasa</b>
<b>DDC</b>	<b>Dietilditiocarbamato</b>
<b>GPx</b>	<b>Glutación peroxidasa</b>
<b>GR</b>	<b>Glutación reductasa</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutación reducido</b>
<b>GSSG</b>	<b>Glutación oxidado</b>
<b>MDA</b>	<b>Malondialdehído</b>
<b>N.D.</b>	<b>No detectable</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutasa</b>
<b>TBA</b>	<b>Acido 2-tiobarbitúrico</b>

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
I. EL ENVEJECIMIENTO .....	2
1.- Teorías de envejecimiento genéticamente programado .....	4
2.- Teorías de envejecimiento por acumulación de errores .....	5
II. TOXICIDAD DEL OXIGENO .....	7
1.- Antecedentes históricos .....	7
2.- Fisiología comparada de la toxicidad del oxígeno .....	9
3.- Toxicidad del oxígeno normobárico e hiperbárico .....	12
4.- Causas de la toxicidad del oxígeno .....	15
A. Inactivación de enzimas .....	15
B. Radicales libres (especies de O <sub>2</sub> activo) .....	17
III. PRODUCCION CELULAR DE RADICALES LIBRES .....	19
1.- Peróxido de hidrógeno .....	20
2.- Radical superóxido .....	22
3.- Radical hidroxilo .....	24
4.- Oxígeno en estado singlete .....	26
IV. PEROXIDACION LIPIDICA .....	28
1.- Proceso de peroxidación .....	28
A. Estructura de la membrana .....	29
B. Iniciación, propagación y terminación .....	29
C. Importancia de los metales en la peroxidación lipídica .....	31
D. Productos de la peroxidación .....	33
2.- Protección contra la peroxidación lipídica .....	38

## Indice

---

A. Mediante organización estructural de los lípidos .....	38
B. Antioxidantes .....	39
Vitamina E .....	39
Glutación peroxidasa .....	40
V. DAÑO AL DNA Y PROTEINAS .....	41
1.- Daño oxidativo y DNA .....	41
2.- Daño oxidativo y proteínas .....	43
VI. DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	46
1.- Mecanismos enzimáticos .....	47
A. Superóxido dismutasas (SOD) .....	47
B. Catalasa (CAT) .....	49
C. Glutación peroxidasas (GPx) .....	52
D. Otras peroxidasas .....	55
2.- Mecanismos no enzimáticos .....	55
A. Hidrosolubles .....	56
Glutación .....	56
Acido ascórbico .....	58
Acido úrico .....	59
Otros .....	60
B. Liposolubles .....	61
Vitamina E o $\alpha$ -tocoferol .....	61
Carotenoides .....	63
Otros .....	63
3.- Protección mediante secuestro de iones metálicos .....	64
4.- Sistemas reparadores .....	66
VII. TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES Y ENVEJECIMIENTO .....	68
OBJETIVOS .....	73

MATERIALES Y METODOS .....	77
I. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	78
II. MATERIALES .....	80
1.- Productos .....	80
2.- Equipo instrumental .....	82
3.- Animales de experimentación .....	83
III. METODOS .....	85
1.- Determinación de la edad por esqueletocronología .....	85
2.- Tratamiento con aminotriazol (AT) y dietilditiocarbamato (DDC) .....	88
3.- Medida del consumo de oxígeno .....	90
4.- Medidas enzimáticas .....	92
A. Preparación de muestras .....	92
B. Medida de la actividad catalasa .....	93
C. Medida de la actividades glutatión peroxidasas .....	95
D. Medida de la actividad glutatión reductasa .....	97
E. Medida de la actividad superóxido dismutasa .....	98
F. Medida de la actividad citocromo c oxidasa .....	100
5.- Valoración de proteínas .....	101
6.- Análisis de la peroxidación tisular <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (sustancias TBA positivas) .....	103
A. Preparación de muestras .....	103
B. Peroxidación <i>in vivo</i> . Método del ácido tiobarbitúrico .....	103
C. Peroxidación tisular <i>in vitro</i> .....	105
7.- Sistema del glutatión .....	105
8.- Valoración de ácido ascórbico por HPLC .....	107
A. Preparación de muestras .....	107
B. Soluciones estándar .....	109
C. Condiciones cromatográficas .....	109

## Indice

---

9.- Valoración de MDA por técnicas de HPLC .....	110
A. Condiciones cromatográficas .....	110
B. Soluciones estándar .....	110
C. Preparación de muestras .....	112
10.- Técnicas de microscopía óptica .....	112
A. Fijación .....	112
B. Inclusión .....	113
C. Cortes .....	113
D. Tinción .....	113
11.- Técnicas de microscopía electrónica .....	113
A. Fijación .....	113
B. Inclusión .....	114
C. Preparación y observación de rejillas .....	115
12.- Métodos estadísticos .....	116
A. Características muestrales .....	116
B. Análisis estadístico de los datos .....	116
Análisis de varianza de doble vía .....	116
Test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD) ..	116
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>118</b>
<b>I. PESO DE ANIMALES, ORGANOS E INDICE ORGANO-SOMATICO .....</b>	<b>119</b>
1.- Peso de animales .....	119
2.- Peso de órganos .....	119
3.- Índice órgano-somático .....	119
<b>II. CONSUMO DE OXIGENO .....</b>	<b>127</b>
<b>III. ESTUDIO ANUAL POR ORGANOS .....</b>	<b>130</b>
1.- 2,5 meses de tratamiento .....	130
A. Hígado .....	130

## Indice

---

Actividades enzimáticas .....	130
Peroxidación tisular .....	132
Sistema del glutatión .....	132
B. Pulmón .....	132
Actividades enzimáticas .....	132
Peroxidación tisular .....	135
Sistema del glutatión .....	135
C. Cerebro .....	135
Actividades enzimáticas .....	135
Peroxidación tisular .....	138
Sistema del glutatión .....	138
D. Curva de supervivencia .....	138
2.- 14,5 meses de tratamiento .....	138
A. Hígado .....	138
Actividades enzimáticas .....	138
Peroxidación tisular y MDA .....	142
Sistema del glutatión y ácido ascórbico .....	142
B. Pulmón .....	142
Actividades enzimáticas .....	144
Peroxidación tisular .....	144
Sistema del glutatión .....	144
C. Cerebro .....	144
Actividades enzimáticas .....	144
Peroxidación tisular .....	148
Sistema del glutatión .....	148
D. Riñón .....	148
Actividades enzimáticas .....	148
Peroxidación tisular .....	151
Sistema del glutatión y ácido ascórbico .....	151
E. Curva de supervivencia .....	151
3.- 26,5 meses de tratamiento .....	151

## Indice

---

A. Hígado . . . . .	151
Actividades enzimáticas . . . . .	154
Peroxidación tisular y MDA . . . . .	154
Sistema del glutatión y ácido ascórbico . . . . .	154
B. Pulmón . . . . .	154
Activides enzimáticas . . . . .	157
Peroxidación tisular . . . . .	157
Sistema del glutatión . . . . .	157
C. Cerebro . . . . .	157
Actividades enzimáticas . . . . .	157
Peroxidación tisular . . . . .	161
Sistema del glutatión . . . . .	161
D. Riñón . . . . .	161
Actividades enzimáticas . . . . .	161
Peroxidación tisular . . . . .	161
Sistema del glutatión y ácido ascórbico . . . . .	164
E. Curva de supervivencia . . . . .	164
IV. ESTUDIO LONGITUDINAL POR ORGANOS . . . . .	164
1.- Hígado . . . . .	164
A. Actividades enzimáticas . . . . .	164
B. Peroxidación tisular y MDA . . . . .	170
C. Sistema del glutatión y ácido ascórbico . . . . .	170
2.- Pulmón . . . . .	175
A. Actividades enzimáticas . . . . .	175
B. Peroxidación tisular . . . . .	175
C. Sistema del glutatión . . . . .	175
3.- Cerebro . . . . .	182
A. Actividades enzimáticas . . . . .	182
B. Peroxidación tisular . . . . .	182
C. Sisistema del glutatión . . . . .	182

## Indice

---

4.- Riñón. ....	188
A. Actividades enzimáticas .....	188
B. Peroxidación tisular .....	188
C. Sistema del glutatión y ácido ascórbico .....	188
<b>V. ESTUDIO A MICROSCOPIA OPTICA DEL TIROIDES .....</b>	<b>188</b>
1.- Visualización .....	188
<b>VI. ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRONICA DEL CEREBRO .....</b>	<b>188</b>
1.- Estado general de los tejidos .....	195
2.- Tipo de gránulos de lipofuscina .....	195
3.- Acumulación de lipofuscina después de 14,5 meses de tratamiento ...	195
4.- Acumulación de lipofuscina después de 26,5 meses de tratamiento ...	201
<b>DISCUSION .....</b>	<b>203</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>227</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>229</b>

## **INTRODUCCION**

## **I. EL ENVEJECIMIENTO**

El envejecimiento es definido por muchos gerontólogos como la disminución progresiva de la eficacia de la homeostasis. Datos que corroboran esta definición los encontramos en el descenso lineal y mantenido, dependiente de la edad, de la capacidad máxima de la mayor parte de las funciones fisiológicas, que se produce en el hombre a partir de los 20 años (Cutler, 1984). Frente a esta pérdida del rendimiento funcional, el término senescencia suele hacer referencia a los procesos de deterioro que llegan a constituir causas naturales de muerte (Martin, 1985).

Aunque a algunos nos cueste aceptarlo, el proceso del envejecimiento es, en el fondo, tan natural como el de respirar. Sin embargo, aparte de su propia naturaleza, la gran diferencia entre ambos procesos radica en que entendemos perfectamente cómo es el mecanismo de la respiración, pero en el caso del envejecimiento sabemos muy poco de cómo se produce y casi nada de por qué ocurre.

Lo que quizá ya no resulte tan natural es el elevadísimo número de personas de edad que viven en la actualidad en cualquier sociedad desarrollada y que es fruto de los avances técnicos en medicina, sanidad pública y nutrición. Esto no ocurre con la mayor parte de las especies en la naturaleza, que mueren generalmente antes de, o en cuanto comienzan a aparecer los síntomas de envejecimiento. Parece lógico pensar que la selección natural utilice un amplio abanico de opciones y combinaciones de procesos que garanticen la desaparición de un individuo, ya que ésta es básica para evitar la competencia por la comida y el espacio.

En poblaciones primitivas (como ocurría hace cientos de años) hay pocos individuos que alcancen la longevidad máxima porque mueren antes debido a enfermedades infecciosas, accidentes, predadores o falta de alimento; ésto no ocurre en sociedades desarrolladas en las que los individuos jóvenes mueren en accidentes normalmente y son los ancianos los que suelen padecer distinto tipo de enfermedades, muchas de las cuales

---

conducen a la muerte. Por tanto, en las sociedades avanzadas se ha producido un aumento de la vida media (rectangularización de la curva de supervivencia), pero la vida máxima es, probablemente, la misma.

La investigación sobre envejecimiento en la actualidad, presenta el aspecto de un amasijo caleidoscópico. Existen multitud de teorías distintas y el número continúa aumentando. Esto se debe al rápido progreso de los conocimientos sobre fenómenos biológicos, así como a la aplicación de nuevas técnicas y métodos de investigación. Resulta obvio que hoy, con el nivel de conocimientos actual, no se espera la aparición de una teoría única, o una causa principal responsable del fenómeno de envejecimiento. Varias teorías pueden coexistir, porque no se contradicen, o también porque son capaces de explicar distintos aspectos o formas de envejecimiento (Medvedev, 1990). El intento de simplificación que supone el defender una y sólo una de las teorías posibles sobre envejecimiento recuerda a la historia de los ciegos y el elefante que relata John Saxe, poeta norteamericano del siglo XIX: cada uno de los sabios ciegos defendía su propia definición de cómo era un elefante tras tocar una parte distinta del cuerpo de éste. Todos tenían razón, pero al mismo tiempo todos estaban equivocados (Barash, 1983).

Lo que sí está claro entre la comunidad científica es que cualquier teoría moderna de envejecimiento debe ser capaz de explicar, no sólo por qué los organismos envejecen con el tiempo y llegan a morir, sino también las diferencias evolutivas de longevidad entre especies y la razón por la que estos procesos de envejecimiento tienen velocidades tan diferentes en distintas especies, tejidos o incluso células (Medvedev, 1990). Cualquier teoría de envejecimiento debería explicar el que, aunque la vida máxima parezca estar fijada genéticamente para cada especie, la longevidad de cada individuo puede ser alterada por condiciones ambientales.

Así por ejemplo, la longevidad puede verse afectada por la temperatura. Se sabe que animales como los reptiles o los insectos viven más a bajas temperaturas. Se piensa que este hecho es debido a la mayor tasa metabólica y mayor consumo de oxígeno a temperaturas altas; esta correlación inversa entre la longevidad y lo que Rubner llamó "tasa de vida" fue propuesta por primera vez en 1908. Aunque esta teoría ha sido muchas

---

veces criticada debido a sus muchas excepciones, el principio que subyace en su planteamiento continúa siendo válido y conecta con otras teorías como, por ejemplo, la de los **radicales libres**; la tasa de metabolismo correlaciona con la tasa de producción de radicales y por tanto con el daño producido por éstos. Los experimentos para intentar aumentar la longevidad máxima mediante dietas de restricción calórica fueron estimulados en un principio por estas teorías de "tasa de energía metabólica" (McCay *et al.*, 1943; McCarter *et al.*, 1985; Masoro, 1988).

Se ha intentado clasificar todas estas diferentes teorías de distintas formas. Así, las clasificaciones más tradicionales intentan subrayar las diferencias entre unas y otras. Hoy parece hacerse un esfuerzo por encontrar puntos de complementariedad y solapamiento entre ellas para conseguir así una clasificación más racional. Existen diversas clasificaciones, pero podemos dividir las en dos grandes grupos: teorías de envejecimiento genéticamente programado y de envejecimiento por acumulación de errores o daño (teorías estocásticas).

### **1.- Teorías de envejecimiento genéticamente programado**

Esta teoría propone una serie de sucesos que estarían codificados en el genoma. La existencia de un control genético del envejecimiento parece desprenderse del hecho de que existan diferencias específicas de longevidad y que tendencias longevas sean hereditarias en determinadas poblaciones. De la misma forma, las diferencias de longevidad entre machos y hembras tienen una base genética. Podemos encontrar evidencias que apoyan este tipo de control genético en ejemplos muy concretos, como el de los salmones, que mueren poco después de reproducirse debido a una serie de procesos degenerativos que se encuentran bajo control hormonal. Así, si los individuos inmaduros son castrados se consigue retrasar la puesta en marcha de dichos procesos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

El caso de la enfermedad denominada progeria o síndrome de envejecimiento prematuro, así como el síndrome de Werner, demuestran cómo unos pocos genes pueden resultar determinantes en el proceso de envejecimiento. Se especula con la posible existencia de unos genes destructores de expresión tardía. Otros investigadores postulan que

---

el control lo ejercerían unos genes reguladores que mantendrían suprimidos a los genes destructores. Con la edad la inhibición descendería, permitiendo que los genes autodestructores se expresasen (Cutler, 1984).

En contra de esta teoría genética estaría el hecho de que muy pocos animales salvajes llegan a edades avanzadas pues mueren antes. Por ello no parece lógico que la naturaleza haya favorecido el desarrollo de un envejecimiento genéticamente programado.

Una hipótesis alternativa es que sea la longevidad la que haya evolucionado y no un mecanismo de envejecimiento. Esto podría explicar la invariabilidad de la vida máxima de los individuos de cada especie. Se ha propuesto una correlación entre la eficacia de los procesos reparadores del DNA y la longevidad de las especies. Esta y otras observaciones hacen sugerir la existencia de genes determinantes de la longevidad (Halliwell y Gutteridge, 1989).

## **2.- Teorías de envejecimiento por acumulación de errores**

Estas teorías se basan en la acumulación de errores, debido a que la eficacia de los sistemas reparadores y de mantenimiento es siempre inferior a la que se necesitaría para sobrevivir indefinidamente (Kirkwood, 1984). Las macromoléculas defectuosas se pueden acumular fruto de un proceso de "usar y romper" o por errores en su síntesis.

Podemos, a su vez, subdividir las en distintas familias atendiendo al carácter de los errores (post-transcripcionales, acumulación de entrecruzamientos diversos, errores a nivel de biosíntesis, etc.), al tipo de moléculas al que se da prioridad (proteínas, RNA o DNA) o al nivel de organización (genoma y cromosomas, células, tejidos y órganos).

En este grupo se incluyen teorías como la propuesta por Orgel en 1963 (error catastrófico). El postulaba que, con la edad y debido a errores en la transcripción del RNA y su traducción a proteínas, se producía una acumulación de proteínas alteradas y no funcionales en las células. Dicha acumulación, en último extremo, conducía a un error catastrófico que impedía por completo un normal funcionamiento, originando una pérdida

---

de la homeostasis celular y provocando la muerte de la célula. Al alterarse proteínas de la maquinaria de síntesis se amplifican los errores en la siguiente generación de proteínas. Este es un concepto distinto al de las teorías de mutación somática; la idea básica es que la habilidad de una célula para producir proteínas normales y funcionales no depende sólo de una correcta especificación genética de las secuencias polipeptídicas, sino también, de la competencia y fidelidad del aparato de síntesis (Arking y Dudas, 1989).

Procesos de envejecimiento de tejidos específicos como pueden ser la piel, el tejido conectivo o el ojo, responden perfectamente a estas características. Así por ejemplo, se ha observado en este último caso cómo las proteínas se agregan y presentan entrecruzamientos que dan lugar a la opacidad del ojo. En esta ocasión se piensa que el problema no está a nivel de transcripción o traducción, lo que ocurre es que el "turnover" o tasa de recambio de estas proteínas no es suficientemente rápido y las que están dañadas no son reemplazadas a tiempo.

Otro factor a tener en cuenta por su posible implicación, es el mecanismo proteolítico celular, encargado de degradar proteínas anormales y que podría perder eficacia con la edad.

También aquí incluiríamos una de las teorías que en la actualidad cuenta con más seguidores, la **teoría de envejecimiento debido a radicales libres**, propuesta por Harman (1956) hace menos de 40 años. Según él, el envejecimiento se debe al daño que producen los radicales libres en los tejidos.

Lo que en la actualidad parece estar claro para biólogos y gerontólogos es que el envejecimiento no es debido a una sola causa o factor. Por ejemplo, nadie duda que los radicales libres representan un producto peligroso del metabolismo del oxígeno, y que si no son inmediatamente eliminados por enzimas especializadas como la superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa, pueden producir mutaciones somáticas, errores en la síntesis de proteínas, peroxidación de las membranas o daño al DNA. Sin embargo, esto no significa que los radicales puedan explicarlo todo. De la misma forma, las teorías de error y mutación tampoco tienen respuesta para todo, aunque no por ello dejan de ser

---

importantes. La existencia de muchos casos de envejecimiento morfogénico y de envejecimiento genéticamente programado, no quita validez a los fenómenos al azar como los errores y las mutaciones.

La complejidad de los procesos de envejecimiento lleva a sugerir teorías globales que tomen muchos factores y procesos en consideración. Estas teorías deben concentrarse en buscar regiones de interacción y solapamiento entre teorías más puntuales y conseguir métodos de análisis mejores y más definitivos. El envejecimiento, al igual que la morfogénesis o el cáncer pertenece a esa clase de procesos biológicos cuyos resultados son obvios, pero cuyo mecanismo permanece todavía oscuro.

## **II. TOXICIDAD DEL OXIGENO**

### **1.- Antecedentes históricos**

En la actualidad casi todos los científicos están de acuerdo en que la vida en la Tierra tuvo su origen bajo una atmósfera reductora compuesta principalmente por hidrógeno, amoníaco, metano y vapor de agua (Gilbert, 1981). En esta primitiva atmósfera terrestre con elevados niveles de radiación, temperaturas altas y abundante superficie de agua, el oxígeno molecular sólo estaba presente en una cantidad insignificante debido a su extraordinaria reactividad química. Fue hace unos 2.000 millones de años cuando su concentración comenzó a aumentar coincidiendo con la aparición de los primeros organismos fotosintéticos y la capa de ozono en la alta atmósfera (Herbig, 1981). El oxígeno liberado como subproducto en la fotosíntesis empezó a acumularse en la atmósfera y fue este aumento gradual de su concentración el que llevó a la aparición de organismos con un metabolismo aerobio (Cloud, 1983).

Este cambio en las condiciones ambientales debió suponer una fuerte presión evolutiva sobre todos los organismos, viéndose favorecidos los mejor adaptados a la nueva situación, es decir, aquellas formas de vida más capaces de hacer frente al ataque oxidativo de una atmósfera cada vez más rica en oxígeno. Para ello necesitaron de una serie de sistemas de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos.

---

El estudio de organismos anaerobios actuales nos da una idea de lo que ocurrió con numerosas especies primitivas que no fueron capaces de adaptarse y desaparecieron ante la presión ambiental (Halliwell y Gutteridge, 1989). Algunos organismos lo que han hecho es, simplemente, evitar el contacto con el oxígeno molecular desarrollándose en ambientes anaerobios o como algunas cianobacterias, proteger su enzima nitrogenasa en células especiales de paredes muy gruesas y resistentes al oxígeno denominadas heterocistos. Otros, aerotolerantes, no lo utilizan en su metabolismo; pero los organismos aerobios, debido a su necesidad metabólica de utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones para la oxidación de sustratos y obtención de energía, han recurrido a otros mecanismos de defensa.

Entre ellos podemos citar la estrategia de ligar el oxígeno a moléculas transportadoras como la hemoglobina, mioglobina o el citocromo P<sub>450</sub>; la reducción multivalente del oxígeno, lo que en sistemas biológicos implica la utilización de metales de transición como el Fe(II) y el Cu(II) y de enzimas como la citocromo c oxidasa, ascorbato oxidasa o tirosinasa; la compartimentalización de la célula para relegar determinadas reacciones peligrosas a orgánulos concretos (Cutler, 1984); mecanismos de "quenching" (extinción) capaces de eliminar las especies tóxicas derivadas del oxígeno impidiendo la propagación de reacciones oxidativas; sistemas reparadores del daño celular producido por estos intermediarios tóxicos resultado de la reducción univalente del oxígeno; y por último, sistemas enzimáticos específicos para eliminar estos productos (Gilbert, 1981). El oxígeno ha resultado ser útil para la obtención de mayor cantidad de energía, sin embargo los sistemas de defensa antioxidante no son eficaces al 100% y éste es el precio que la biosfera debe pagar.

No fue hasta finales del siglo XVIII cuando dos científicos, Priestley (1775) y Scheele (1777), de manera independiente, descubrieron el oxígeno. Algunos años más tarde, Seguin y Lavoisier señalaron las semejanzas entre el proceso de combustión y la respiración de los animales. Prácticamente desde su descubrimiento pueden encontrarse referencias respecto a la toxicidad de este gas. Así, sus mismos descubridores, en experiencias realizadas con plantas, señalaban cómo una atmósfera de oxígeno puro impedía el crecimiento. De manera similar, Priestley realizó posteriormente experimentos con ratones,

---

observando cómo el oxígeno provocaba la muerte de éstos. Análogos resultados obtuvo Lavoisier con cobayas, y años más tarde Pasteur, al observar cómo la presencia de oxígeno era suficiente para matar a ciertos microorganismos.

Sin embargo, estos hechos no fueron muy tenidos en cuenta hasta que Paul Bert (1878) con sus estudios demostró de forma inequívoca la toxicidad del oxígeno y la universalidad de estos efectos tóxicos. Desde entonces han sido muchos los trabajos realizados sobre este tema, de una manera especial en las dos últimas décadas, después de que Rebeca Gerschman (Gerschman *et al.*, 1954) implicase a los radicales libres del oxígeno en el mecanismo de toxicidad y, sobre todo, tras el descubrimiento de la actividad superóxido dismutasa por McCord y Fridovich en 1968 (McCord y Fridovich, 1969). Hoy día muchos autores piensan en esa toxicidad del oxígeno como una de las principales causas del envejecimiento animal (Cutler, 1984; Sohal y Allen, 1986; Miquel 1991), así como de muchas enfermedades y procesos degenerativos entre los que se pueden citar el cáncer, inflamación, Parkinson, problemas de isquemia-reperusión, etc.(Jamieson, 1989).

## **2.- Fisiología comparada de la toxicidad del oxígeno.**

El oxígeno resulta esencial para la vida de los organismos aerobios y al mismo tiempo es una sustancia tóxica. Esta toxicidad ha sido observada en la mayoría de los organismos. Durante el siglo pasado y la primera mitad de éste se han ido acumulando datos descriptivos sobre la letalidad y las consecuencias patológicas de la exposición a altas presiones parciales de oxígeno. El oxígeno a concentraciones superiores a las normales en aire resulta tóxico para plantas, animales, bacterias aerobias como por ejemplo *E. coli* y cultivos celulares.

Así, los animales parecen ser en general más susceptibles que las plantas (Matkovics, 1977). Pero en tejidos vegetales se ha visto también cómo altas tensiones de oxígeno inhiben el crecimiento de cloroplastos, disminuyen la viabilidad de semillas y el crecimiento de raíces, dañan las membranas, estimulan la abscisión de hojas y aumentan la incidencia de anormalidades en el crecimiento (Halliwell, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1989).

---

La susceptibilidad al oxígeno en los animales es muy variable. Esto resulta obvio y así podemos hablar de organismos anaerobios estrictos, como la bacteria *Treponema denticola* y varias *Clostridia*, que sólo crecen en ausencia total de oxígeno, anaerobios moderados, que se desarrollan en atmósferas con hasta un 10% de oxígeno, o microaerófilos, como *Treponema Pallidum*, que necesitan una pequeña concentración de oxígeno para crecer pero no toleran una concentración del 20%. Incluso dentro de los anaerobios estrictos encontramos un amplio espectro de tolerancias, algunos mueren por una breve exposición, mientras que en otros casos lo que se produce es una inhibición del crecimiento (Halliwell y Gutteridge, 1989).

En el caso de *E. coli* y otras bacterias aerobias la exposición a oxígeno puro a una atmósfera de presión hace que disminuya el ritmo de crecimiento hasta alcanzar la inhibición total (Brown y Yein, 1978; Farr *et al.*, 1988).

En general, los invertebrados suelen ser más resistentes que los vertebrados, aunque, por ejemplo, el oxígeno puro a menos de una atmósfera de presión (0,3-0,5 atmósferas) resulta letal para *Drosophila melanogaster* (Balentine, 1982), mientras que existen estudios en humanos en los que se ha utilizado oxígeno puro a una presión entre 0,75 y 2 atmósferas (Clark y Lambertsen, 1971).

Los animales poiquiloterms parecen ser más resistentes al oxígeno que los homeoterms; así por ejemplo, las tortugas son capaces de tolerar oxígeno puro a una atmósfera de presión durante varios meses, aunque esta resistencia disminuye al aumentar la temperatura ambiental (Balentine, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1989). Anfibios adultos son también capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en atmósferas de un 100% de O<sub>2</sub> (Barja de Quiroga *et al.*, 1988; López-Torres *et al.*, 1988), y sin embargo, mamíferos como la rata mueren durante los tres o cuatro primeros días de exposición. Las aves son también especialmente resistentes (Huber y Drath, 1981).

En cualquier caso, los efectos tóxicos del oxígeno varían según el organismo de que se trate, su edad, sexo, tasa metabólica, estado fisiológico y dieta.

---

Así, resulta generalmente aceptado que los animales recién nacidos de distintas especies de mamíferos son más resistentes que los adultos a la toxicidad del oxígeno, debido a la incapacidad para incrementar las defensas antioxidantes en estos últimos (Frank, 1982; Stock *et al.*, 1990).

Además de la edad como un factor natural significativo a la hora de determinar la susceptibilidad a la toxicidad del oxígeno, el sexo también interviene. Las ratas machos parecen ser más sensibles que las hembras (Berry *et al.*, 1977).

En cuanto a la tasa metabólica, existe una correlación positiva entre la susceptibilidad de un organismo al oxígeno y su tasa metabólica (Barthelemy *et al.*, 1981). Es por ello por lo que humanos adultos son menos sensibles al O<sub>2</sub> que ratas adultas (Halliwell, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1989). Esta relación también es válida a nivel de tejidos (Baeyens *et al.*, 1973), de manera que los tejidos con mayor tasa metabólica son también los más susceptibles al oxígeno.

El estado fisiológico está directamente relacionado con el punto anterior y así, por ejemplo, el ejercicio disminuye la tolerancia al oxígeno; por el contrario durante la hibernación se produce un marcado incremento de la resistencia al oxígeno debido al descenso de la tasa metabólica (Gilbert, 1981). Los estados hormonales también influyen en la tolerancia de un organismo: niveles altos de hormonas tiroideas, cortisona y adrenalina hacen que disminuya la resistencia frente a altas concentraciones de oxígeno. Se ha comprobado que la hiperoxia provoca una reacción general de estrés que estimula la actividad de algunas glándulas endocrinas agravándose la situación (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Por último, la toxicidad del oxígeno se ve afectada además por la presencia en la dieta de cantidades variables de vitamina A, E y C, metales de transición (Jenkinson *et al.*, 1984), antioxidantes (Jenkinson *et al.*, 1989; Stone *et al.*, 1989) y lípidos poliinsaturados (Halliwell y Gutteridge, 1984; Sosenko *et al.*, 1988).

### 3.- Toxicidad del oxígeno normobárico e hiperbárico

La exposición a altas concentraciones de oxígeno produce efectos tóxicos cuya severidad depende del grado de hiperoxia y de la duración de la exposición. En los animales superiores los órganos más afectados por el ataque del oxígeno son el pulmón, órgano expuesto a las presiones de  $O_2$  más altas, el ojo y el sistema nervioso central.

El pulmón es el órgano más severamente dañado por la exposición a hiperoxia normobárica (a una atmósfera de presión) y los síntomas observados se reúnen bajo el nombre de "Efecto Lorrain-Smith".

Ratas expuestas a dosis subletales de oxígeno (60-80% de  $O_2$ ) muestran cambios patológicos inespecíficos en el pulmón. Aparece edema, hemorragias alveolares, atelectasia, inflamación, depósitos de fibrina y engrosamiento e hialinización de las paredes alveolares (Crapo *et al.*, 1980). Las células del endotelio capilar parecen ser las más sensibles; se producen cambios en el citoplasma que son seguidos de fragmentación y destrucción celular (Crapo, 1986). Las membranas celulares son las primeras en mostrar los efectos del daño oxidativo (Jamieson, 1989). Estos efectos son similares en distintas especies (Fracica *et al.*, 1988) aunque varíen los tiempos de aparición.



Ilustración 1

También se ha observado cómo la exposición continua de ratas jóvenes a hiperoxia normobárica afecta a todos los parámetros característicos del crecimiento pulmonar como son su peso, volumen, superficie alveolar y número de alveolos, etc. (Balentine, 1982). En ranas (Ilustración 1) se ha comprobado cómo al aumentar el % de oxígeno disminuye de forma muy marcada el crecimiento pulmonar (Barja de Quiroga *et al.*, 1989a).

---

La exposición de humanos a oxígeno puro a una atmósfera de presión durante seis horas provoca la aparición de una variedad de síntomas respiratorios; inicialmente se produce tos y un dolor agudo acompañado de inflamación de la garganta (Bishop, 1978). Se producen lesiones en los alveolos pulmonares que se manifiestan en primer lugar por un engrosamiento de la barrera alveolo-capilar debido al edema. Este edema se debe al aumento de la permeabilidad de los capilares, que parece estar causado por las especies reactivas derivadas del oxígeno (Taylor y Rippe, 1986). Si la exposición a hiperoxia continúa, se produce necrosis del epitelio alveolar y las células alveolares tipo I son sustituidas por las tipo II, que proliferan (Freeman *et al.*, 1986). En un estado posterior se suma a esta sustitución celular la producción de elevadas cantidades de colágeno y elastina, apareciendo finalmente fibrosis pulmonar (Balentine, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los efectos de la hiperoxia hiperbárica (hiperoxia a una presión superior a una atmósfera) sobre los pulmones son similares a los anteriormente descritos, pero su aparición es más rápida (Clark, 1988). En el hombre, los síntomas de toxicidad provocada por el oxígeno aparecen entre las 6 y 12 primeras horas de exposición a 100% de oxígeno y dos atmósferas de presión. Se produce irritación traqueobronquial y disminuye la capacidad de difusión, la capacidad vital y el volumen sanguíneo en los capilares pulmonares (Frank y Massaro, 1980; Jackson, 1985).

En los mamíferos, es el pulmón el órgano más severamente dañado por tensiones elevadas de oxígeno. En los animales de respiración acuática ocurre algo similar con las branquias. En truchas (*Salmo gairdneri*) y anguilas (*Anguilla anguilla*) expuestas en agua, a 15 atmósferas de oxígeno durante 90 minutos, se ha observado un aplanamiento de la superficie lamelar secundaria de los filamentos branquiales, reduciéndose así el área funcional de intercambio respiratorio (Barthelemy *et al.*, 1981).

Además del pulmón, el ojo es otro órgano particularmente sensible al oxígeno. En 1942 fue definida la fibroplasia retrolental como una de las principales causas de ceguera infantil (Terry, 1942). Unos años después se apreció cómo esta patología se correlacionaba con el uso terapéutico de O<sub>2</sub> en el tratamiento en incubadoras de niños prematuros (Balentine, 1982). Inicialmente se produce una constricción de los capilares

---

oculares y necrosis a nivel de la retina, para posteriormente, en una segunda fase, darse una proliferación de nuevos capilares anormales cuya permeabilidad es elevada y que se extienden hacia el humor vítreo, produciéndose una opacidad que impide la visión y en algunas ocasiones desprendimiento de retina, lo que ocasiona ceguera (Halliwell, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1989). Por otro lado, se ha comprobado que el uso terapéutico de oxígeno hiperbárico provoca la opacidad del cristalino (Padgaonkar *et al.*, 1989) y cataratas (Giblin *et al.*, 1988).

Además del pulmón y del ojo, hay otros órganos o tejidos que se ven afectados por su exposición a elevadas tensiones de oxígeno. Entre ellos destaca el sistema nervioso central. La hiperoxia hiperbárica (2-3 atm.) produce una toxicidad aguda sobre el sistema nervioso central que se manifiesta en estados convulsivos similares desde varios puntos de vista a la "epilepsia de gran mal" (con unos registros encefalográficos parecidos) y lesiones crónicas que se conocen con el nombre de "Efecto Paul Bert".

Si la exposición a oxígeno hiperbárico es continua puede llegar incluso a producir la muerte del individuo. También la repetición de breves e intermitentes exposiciones puede llegar a provocar una parálisis irreversible acompañada de rigidez, ataxia y pérdida de reflejos. Todos estos síntomas se conocen como "Efecto John Bean".

Aunque en un principio parecía que el sistema nervioso central presentaba una mayor resistencia a la toxicidad del oxígeno, pues los efectos tóxicos sólo aparecían tras la exposición a hiperoxia hiperbárica, hoy sabemos que el tejido nervioso es altamente sensible, y que su aparente mayor resistencia respecto al tejido pulmonar, por ejemplo, se debe a que soporta un menor grado de hiperoxia debido en parte a la caída arteriovenosa de  $pO_2$  cuando se extrae  $O_2$  de la hemoglobina. Por ello es necesario llegar a la hiperbaria para elevar las presiones en el sistema nervioso e igualar los niveles soportados por el pulmón con hiperoxia normobárica. Se piensa que esta susceptibilidad del sistema nervioso es fruto de su alto metabolismo combinado con unos niveles bajos de enzimas antioxidantes, principalmente catalasa y glutatión peroxidasa, así como de otros antioxidantes no enzimáticos y un elevado contenido de lípidos (Scott y Lew, 1988; Jamieson, 1989) y de Fe (Halliwell y Gutteridge, 1989). Además, también se han descrito alteraciones profundas del

cerebro en estado de desarrollo de animales inmaduros asociadas a hiperoxia normobárica (Balentine, 1982).

Se han observado lesiones en el corazón, músculo esquelético (Barja de Quiroga, 1981) y en casi todos los tejidos de una gran variedad de animales (Halliwell, 1981).

Todos estos hechos hacen que exista un enorme interés por conocer los mecanismos de toxicidad del O<sub>2</sub>. A nivel clínico (Gabb y Robin, 1987) se utiliza con fines terapéuticos en el tratamiento de la gangrena gaseosa, o de la intoxicación por monóxido de carbono; también parece estar implicado en la necrosis que se produce en los tejidos cuando, tras un periodo de isquemia, vuelven a tener riego sanguíneo (Marklund, 1988; Wolbarsch y Fridovich, 1989; Mickel, 1990), con los consiguientes problemas en trasplantes y otras intervenciones quirúrgicas. Lo mismo ocurre con su posible papel en enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide o su papel defensivo frente a infecciones. Finalmente, resulta importante para una completa comprensión de la fisiología del buceo e hiperbárica en general (Lambertsen, 1988).

#### **4.- Causas de la toxicidad del oxígeno**

A pesar de la gran acumulación de datos descriptivos sobre los efectos nocivos del oxígeno, durante mucho tiempo se careció de teorías que explicasen los mecanismos de toxicidad. Diversas hipótesis han intentado explicar el mecanismo molecular responsable de la toxicidad del oxígeno. En la actualidad existen dos posibilidades:

- Inactivación de enzimas
- Radicales libres (especies de O<sub>2</sub> activo)

##### **A. Inactivación de enzimas**

Fue la primera propuesta (Stadie y Haugaard, 1945) que se hizo de un

---

mecanismo general para intentar explicar la toxicidad del oxígeno. Esta teoría (Haugaard, 1968) sugería una interacción directa del  $O_2$  con proteínas, principalmente enzimas celulares y especialmente aquellas que presentaban grupos tiólicos esenciales para su actividad en su forma reducida. Se observaba cómo varias enzimas, tanto de organismos aerobios como anaerobios, se inactivaban de forma irreversible cuando el organismo era sometido a altas tensiones de  $O_2$ . Así, por ejemplo, la actividad de la enzima nitrogenasa de la bacteria anaerobia *Clostridium pasteurianum* depende de que sus cofactores se mantengan en estado reducido. Al exponer la bacteria al oxígeno, estos cofactores se oxidan de manera irreversible y la enzima se inactiva (Halliwell, 1981).

Algunas enzimas de organismos aerobios también se inactivan cuando éstos se exponen a tensiones elevadas de  $O_2$ . Normalmente se trata de un proceso lento, pero hay excepciones, como es el caso de la bacteria *E. coli*, cuyo crecimiento cesa casi inmediatamente cuando se somete a  $O_2$  puro a 4,2 atmósferas de presión; se produce una inhibición rápida de la enzima dihidroxiácido hidratasa (Brown y Yein, 1978) implicada en la síntesis del aminoácido valina.

La exposición de homogenados de cerebro de pollo a tensiones elevadas de  $O_2$  provoca la rápida inhibición de la glutamato descarboxilasa (Tunncliff y Wood, 1974), y esta inactivación parece jugar un papel fundamental en las convulsiones observadas en animales expuestos a hiperoxia, pues la disminución del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) podría ser su causa. Resultados semejantes se han obtenido con tejido de cerebro humano. Podría ser, pues, esta interferencia con el metabolismo del GABA, un mecanismo básico de las convulsiones en hiperoxia (Wood, 1975).

Quizá el mejor ejemplo de efecto directo del oxígeno lo encontremos en las plantas. La primera enzima del ciclo de Calvin, la ribulosa difosfato carboxilasa, combina  $CO_2$  con un azúcar de 5 carbonos (Ribulosa 1,5-difosfato) para producir dos moléculas de ácido fosfoglicérico. El oxígeno es un inhibidor de esta reacción, pues compite con el  $CO_2$  y por eso con concentraciones elevadas de oxígeno hay menos fijación de  $CO_2$  y menos crecimiento.

El mecanismo exacto de inhibición de enzimas por tensiones elevadas de  $O_2$  está por establecer, aunque frecuentemente la inhibición de enzimas de organismos aerobios por  $O_2$  se debe a la oxidación de grupos tiólicos esenciales para la enzima. Así ocurre con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Tjioe y Haugaard, 1972). Otra enzima que también se inactiva es la amido fosforribosil transferasa (Fee, 1982). Trabajos recientes señalan cómo la exposición de proteínas a radicales libres provoca grandes modificaciones estructurales, fragmentación, agregación, incremento de la susceptibilidad a la proteólisis, alteraciones de la estructura primaria (algunos aminoácidos parecen más sensibles a la modificación), secundaria y terciaria (Davies y Delsignore, 1987).

Sin embargo, aunque el mecanismo de inactivación enzimática se ha demostrado experimentalmente para algunas enzimas, todos estos datos no parecen suficientes para explicar la toxicidad del oxígeno; sólo explicarían una pequeña parte de los procesos celulares alterados por el oxígeno. No todas las enzimas se inhiben; tampoco en todas las especies. Cuando lo hacen, el porcentaje de inhibición no es a veces suficiente para explicar la toxicidad final, pues se trata de inhibiciones lentas y de extensión limitada (Halliwell y Gutteridge, 1989). Además, hoy sabemos que el efecto agudo de la toxicidad del  $O_2$  no sólo ocurre a nivel de proteínas, sino que también se produce un ataque oxidativo a lípidos, DNA e hidratos de carbono. Parece necesaria, pues, una teoría más general como la de los radicales libres.

### **B. Radicales libres (especies de $O_2$ activo)**

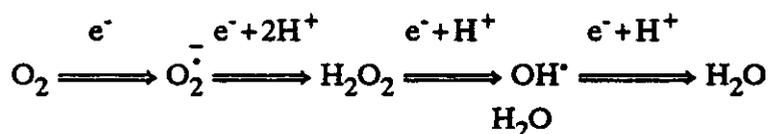
La teoría de los radicales libres fue propuesta por Rebeca Gerschman en 1954. Postula que la toxicidad del oxígeno a nivel molecular se debe a la existencia de radicales libres derivados de la propia molécula de  $O_2$  (Gerschman *et al.*, 1954). Esta teoría descarta al  $O_2$  molecular como responsable directo de la toxicidad apuntando como causantes a estos metabolitos mucho más reactivos que él. De esta forma, la inactivación de enzimas sería una consecuencia y no la causa, como sostenía la hipótesis anterior, de la toxicidad del oxígeno. Gerschman comprobó las semejanzas entre los efectos nocivos causados por las radiaciones X y los producidos por el oxígeno, lo que le llevó a pensar en un mecanismo de acción común (Gerschman *et al.*, 1954). Además observó cómo muchos agentes químicos

que protegían de los efectos tóxicos de la radiación eran eficaces para evitar el daño causado por el oxígeno (Gerschman *et al.*, 1979). Si los radicales libres eran los responsables de los efectos de las radiaciones X, la toxicidad del oxígeno podía deberse también a ellos.

Un radical libre se define como un átomo o molécula que posee uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Se originan por ganancia o pérdida de un electrón y también por fisión homolítica de un enlace covalente. Se trata de una definición amplia que incluye, entre otras especies químicas, al átomo de hidrógeno (con un electrón desapareado) y a la mayoría de los metales de transición. En sentido estricto, la molécula de oxígeno puede considerarse un radical libre, pues tiene dos electrones desapareados de espines paralelos. Esta última característica le impone, a la hora de aceptar dos nuevos electrones, una restricción: estos electrones deben tener espines paralelos entre sí y antiparalelos a los de los electrones desapareados del O<sub>2</sub> (lo cual no es frecuente). Por ello el O<sub>2</sub> tiende a aceptar los electrones de uno en uno (Halliwell y Gutteridge, 1984), dando lugar a una serie de especies derivadas entre las que se cuentan:

- el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>)
- el oxígeno en estado singlete (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>)

Los tres primeros surgen de la reducción incompleta del oxígeno molecular al aceptar uno, dos o tres electrones respectivamente (Del Maestro, 1980). Estas reducciones monovalentes del O<sub>2</sub> pueden esquematizarse de la forma siguiente:



Los metales de transición que se encuentran en los centros activos de muchas oxidasas y oxigenasas tienen la habilidad de facilitar la transferencia de electrones, de uno en uno, al oxígeno molecular. Por último, el oxígeno molecular puede sufrir una redistribución de los electrones situados en sus orbitales externos, alcanzando un nuevo

---

estado más reactivo conocido como  $O_2$  en estado singlete (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La teoría propuesta por Rebeca Gerschman retoma el concepto clásico de Michaelis (1940): "toda oxidación (o reducción) sólo puede producirse en pasos de oxidaciones (o reducciones) de carácter univalente", que fue desechado a principios de siglo debido a la oposición y gran autoridad de Otto Warburg, quien defendía el carácter tetravalente de las oxidaciones biológicas, que como hoy sabemos ocurre a nivel de la citocromo c oxidasa mitocondrial.

Sin embargo, fue necesario el descubrimiento de la superóxido dismutasa (que ha sido encontrada en casi todos los organismos aerobios y no en la mayoría de los anaerobios) para dar un impulso definitivo a esta teoría, al ponerse de manifiesto la existencia y relevancia de un radical libre, el radical superóxido, en las células aerobias.

### **III. PRODUCCION CELULAR DE RADICALES LIBRES**

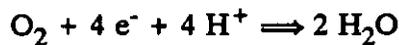
Hoy sabemos que la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. Los radicales libres se producen debido a procesos fisiológicos normales o por la influencia de compuestos exógenos como el ozono, el etanol, u otros xenobióticos, etc. (Pryor, 1986; Videla *et al.*, 1990).

Una gran variedad de enzimas y complejos multienzimáticos implicados en el metabolismo celular tienen la capacidad de transferir electrones al oxígeno. Cofactores enzimáticos como derivados de flavinas, nicotinamidas y quinonas son también capaces de reaccionar con el oxígeno aunque éste no sea su sustrato fisiológico. Pero los principales blancos celulares de reacción con el oxígeno son los transportadores de electrones de los complejos multienzimáticos de mitocondrias y microsomas. Se ha demostrado generación de especies activas de oxígeno por parte de enzimas y autooxidación de moléculas en prácticamente todas las fracciones celulares incluyendo la citosólica, mitocondrial, peroxisómica, microsómica, así como en las membranas plasmática y nuclear (Boveris *et al.*, 1972). El 93% del oxígeno celular se consume en la cadena respiratoria mitocondrial que

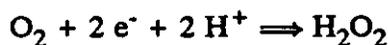
representa uno de los lugares principales de activación del oxígeno (Nohl, 1986). Estos centros metabólicamente activos, y las zonas cercanas a estructuras capaces de almacenar metales, son los principales focos celulares de radicales (Chevion, 1988; Saran y Bors, 1990).

### 1.- Peróxido de hidrógeno

La mayor parte del O<sub>2</sub> consumido por los organismos aerobios es reducido a agua mediante la adición de 4 electrones a cada molécula de O<sub>2</sub>:



Esta reacción está catalizada por la citocromo c oxidasa de la membrana interna mitocondrial o la membrana plasmática en el caso de las bacterias. Existen sin embargo una serie de enzimas celulares que transfieren dos electrones a cada molécula de O<sub>2</sub> produciéndose entonces peróxido de hidrógeno:

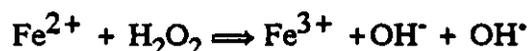


Entre estas enzimas que llevan a cabo la reducción divalente están la urato oxidasa, la D-aminoácido oxidasa, glicolato oxidasa, acil-CoA oxidasa, NADH oxidasa, monoamino oxidasas, glutatión oxidasa (Sies y Cadenas, 1983), el sistema xantina/xantina oxidasa (Link y Riley, 1988) y otras. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, son productos secundarios de la acción principal de estas enzimas que se distribuyen por los distintos compartimentos celulares. La K<sub>M</sub> de todas estas enzimas es muy superior a la concentración de O<sub>2</sub> que prevalece en el ambiente celular en que trabajan; no están saturadas y por ello generan más radicales en condiciones de hiperoxia (Turrens *et al.*, 1982).

Además, la autooxidación de algunos de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y del cloroplasto genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* (Boveris y Chance, 1973; Halliwell, 1978; Nohl y Hegner, 1978). En el caso de la mitocondria se postulan dos puntos de producción de peróxido de hidrógeno, la región ubiquinona-citocromo b y la NADH deshidrogenasa (Boveris *et al.*, 1976; Cadenas *et al.*, 1977; Chance

*et al.*, 1979). Se calcula que entre el 1% y 7% del oxígeno (según las condiciones del medio celular) no da lugar a agua sino a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ . Se ha observado generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante la fotosíntesis y los procesos de fagocitosis. Los microsomas aislados e incubados con NADPH producen también elevadas cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sin embargo, la producción por parte del retículo endoplásmico *in vivo* parece ser menor (Sies *et al.*, 1978). Otra vía de formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la reacción de dismutación del  $\text{O}_2^-$ . Por ello, cualquier sistema biológico que genere  $\text{O}_2^-$  es capaz de producir también  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tanto el  $\text{H}_2\text{O}_2$  como el  $\text{O}_2^-$  se generan por reacciones fotoquímicas en la superficie de aguas naturales al ser iluminadas (Cooper y Zika, 1983), debido al material orgánico disuelto. También de esta forma se genera el radical hidroxilo (Mopper y Zhou, 1990), al estar expuestas superficies de agua a las radiaciones ionizantes.

El peróxido de hidrógeno en concentraciones elevadas puede provocar la muerte celular. Así por ejemplo, las células animales en cultivo (Bozzi *et al.*, 1979) y algunas bacterias como *Neisseria gonorrhoeae* (Ismail *et al.*, 1977) son muy sensibles al  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, existen otras bacterias como *E. coli* que son mucho menos sensibles a este compuesto y un tercer grupo que excreta  $\text{H}_2\text{O}_2$  por lo que obviamente tolera su presencia. Por tanto, no existe un patrón uniforme de toxicidad producida por el agua oxigenada en distintos organismos. Esto puede deberse a las propiedades químicas de esta molécula. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puro, que en realidad no es un radical libre, es poco reactivo, pero puede inactivar enzimas directamente oxidando grupos tiólicos esenciales, como ocurre con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; por tanto, la exposición de células a elevadas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede llevar a una deficiencia de ATP al inhibirse la glucólisis. En presencia de metales de transición el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se descompone dando el radical hidroxilo de elevada reactividad:

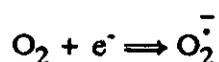


Esta reacción se conoce con el nombre de reacción de Fenton (Walling, 1982). La disponibilidad de metales de transición puede influir en la mayor o menor toxicidad del peróxido de hidrógeno, al igual que la radiación ultravioleta. Independientemente de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sea tóxico *per se* o bien a través de la formación de especies más reactivas como

el radical hidroxilo, lo que sí se ha observado es que en condiciones de hiperoxia se incrementa la producción de  $H_2O_2$  en fracciones mitocondriales aisladas (Turrens *et al.*, 1982). Este incremento se ha observado *in vivo* en hígado (Oshino *et al.*, 1975) y cerebro (Yusa *et al.*, 1987) de rata. Además, el hecho de ser una molécula pequeña, sin carga y relativamente estable (Link y Riley, 1988) le permite difundir y producir daño lejos de su punto de formación. Los efectos deletéreos del peróxido de hidrógeno dependerán de la presencia de iones metálicos, así como de la capacidad de determinadas enzimas celulares para metabolizar este compuesto.

## 2.- Radical superóxido

Como ya se ha señalado anteriormente, la mayor parte del oxígeno que consumen las células se reduce hasta agua. Sin embargo, existen varias enzimas celulares que catalizan reacciones de oxidación en las que se transfiere un solo electrón desde un sustrato hasta la molécula de oxígeno, formándose así el radical superóxido:

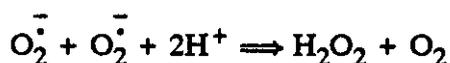


Entre estas enzimas están la xantín oxidasa, aldehído oxidasa, flavín deshidrogenasas, triptófano dioxigenasa y peroxidasas (Halliwell, 1981). El radical superóxido puede producirse también durante la autooxidación de formas reducidas de algunas biomoléculas presentes *in vivo* como son las catecolaminas, flavinas y ferredoxina (Del Maestro, 1980), hemoglobinas, mioglobina, citocromos y otras.

Además, el radical superóxido se genera en las mitocondrias (Boveris, 1977) en la región ubiquinona-citocromo b de la cadena respiratoria (Turrens *et al.*, 1985) en unos casos, y en ésta y en la región del complejo NADH deshidrogenasa en otros (Turrens *et al.*, 1982). En cloroplastos también se ha observado su generación (Asada *et al.*, 1977) a partir de la oxidación de los componentes de la cadena de transporte electrónico, al igual que en glioxisomas (Sandalio *et al.*, 1988). El retículo endoplásmico de las células (Chance *et al.*, 1979) puede producir radicales superóxido. Así mismo, estos radicales se generan como consecuencia de la irradiación de tejidos vivos (Benon *et al.*, 1977). Por último, células

intactas de tipo fagocítico, como son leucocitos polimorfonucleados y macrófagos liberan grandes cantidades de radical superóxido cuando están activadas (Fridovich, 1981).

El comportamiento químico del radical superóxido varía según se encuentre en un medio acuoso o en un disolvente orgánico. En solución acuosa el radical superóxido actúa como base, aceptando protones, dando lugar de esta forma al radical hidropéroxilo  $\text{HO}_2^\cdot$ , pero a pH 7 predomina la forma superóxido. En este tipo de solución puede actuar como un potente agente reductor, cediendo su electrón extra, o como agente oxidante débil, reduciéndose hasta  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Así, el radical superóxido puede reducir el ion Fe (III) presente en el centro activo del citocromo c o los Cu (II) de la plastocianina (Halliwell y Gutteridge, 1984); pero también es capaz de oxidar moléculas como el ácido ascórbico, el  $\text{Fe}^{2+}$ , catecolaminas, compuestos que contengan grupos tiólicos y la adrenalina. Su forma protonada,  $\text{HO}_2^\cdot$ , es un agente reductor y oxidante más potente, aunque su concentración no sea alta. Podrá oxidar al NADH ligado a la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, al  $\alpha$ -tocoferol y reducir al citocromo c. Además el radical  $\text{O}_2^\cdot$  en solución acuosa es capaz de reaccionar consigo mismo; esta reacción se conoce con el nombre de dismutación y cualquier reacción del  $\text{O}_2^\cdot$  tendrá que competir con ella:



La reacción directa de dos radicales superóxido es muy lenta a pH fisiológico, posiblemente debido a la repulsión electrostática. Por este motivo el radical superóxido formado en los sistemas biológicos tiene una vida media significativa, lo que le permitiría difundir desde el lugar de su formación hasta otras estructuras celulares, aunque mucho menos que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Cuando el radical superóxido se encuentra en solventes orgánicos su capacidad para funcionar como base y agente reductor se incrementa. En cuanto a su capacidad oxidante en este tipo de medio, sólo se observa con compuestos capaces de donar protones, como son el ascorbato, catecol y  $\alpha$ -tocoferol.

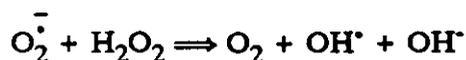
El  $\text{O}_2^\cdot$  en soluciones acuosas es muy poco reactivo si se compara con especies

como el radical hidroxilo o el oxígeno en estado singlete. A pesar de ésto, y aunque no se conozca el mecanismo exacto, se ha observado que sistemas generadores de radicales superóxido ocasionan la muerte de bacterias, inactivan virus, dañan enzimas y membranas como las de los lisosomas (Kalra *et al.*, 1988) o las del sarcolema (Kaneko *et al.*, 1989) y destruyen células en cultivo. Flujos de radicales superóxido generados enzimática o fotoquímicamente son capaces de despolimerizar polisacáridos, degradar el colágeno (Monboisse *et al.*, 1988), oxidar lípidos poliinsaturados, lisar eritrocitos y producir daños en el DNA (Fridovich, 1981). Es posible que parte del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se produzca en el interior de membranas, donde puede resultar más peligroso (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Sin embargo, hoy se sabe que el radical superóxido, contrariamente a puntos de vista anteriores, carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas y se ha llegado a proponer un posible papel de mensajero celular para él (Saran y Bors, 1990). Pero en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la reacción de Haber-Weiss da lugar al radical hidroxilo. El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  necesita al  $\text{H}_2\text{O}_2$  para producir la especie oxidante  $\text{OH}^{\cdot}$ , mientras que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no necesita al  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para poder hacerlo. Esto, junto con la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las células a concentraciones unas mil veces superiores a las del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , convierte al peróxido de hidrógeno en una especie con gran capacidad para generar daño oxidativo a pesar de no ser un radical libre.

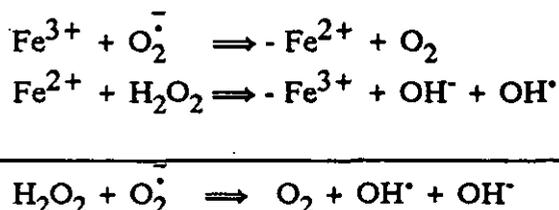
### 3.- Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es una especie química de una gran reactividad. Puede generarse a partir del peróxido de hidrógeno, bien por rotura homolítica de esta molécula, causada por calor o por radiaciones ionizantes (Halliwell y Gutteridge, 1984), o bien por la ya citada reacción de Fenton. Además existe otra vía de producción, la reacción de Haber-Weiss:



La reacción tal y como está descrita tiene una constante de velocidad muy

pequeña por lo que a las concentraciones en que se encuentran el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vivo*, no se produciría (Halliwell, 1981). Sin embargo, la presencia de trazas de metales de transición permite que se formen radicales hidroxilo por esta vía:

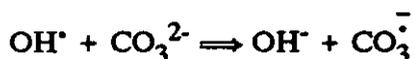


La segunda reacción es una reacción tipo Fenton. La reacción final se denomina a veces "reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro". Se ha demostrado que esta reacción ocurre rápidamente *in vitro* (Koppenol, 1981). Los metales de transición están ampliamente distribuidos en los seres vivos y además del hierro, el cobre podría ser también un candidato para catalizar esta reacción de Haber-Weiss. En estas condiciones se ha comprobado que la adición de histidina o albúmina en concentraciones fisiológicas impide la catálisis. Por ello puede que ni en suero sanguíneo ni en las células se produzca esta catálisis mediante cobre, ya que en ambos casos existen proteínas en una concentración suficiente para impedir la misma (Halliwell y Gutteridge, 1984). Complejos de Fe con quelantes de bajo peso molecular como el ADP, ATP, EDTA incrementan la formación de radical hidroxilo  $\text{OH}^{\cdot}$  (Kappus, 1985); proteínas como la hemoglobina también promueven su formación (Puppo y Halliwell, 1988).

El radical hidroxilo es considerado hoy el principal iniciador del ataque a todo tipo de macromoléculas, aunque existan otros iniciadores propuestos. Esta especie sin carga neta es una de las más reactivas presentes en el organismo. Su electrón desapareado reacciona inespecíficamente con cualquier tipo de molécula a 2-3 diámetros moleculares de su lugar de formación y resulta ser mucho más reactivo que el radical superóxido.

El radical hidroxilo ataca y daña casi a cualquier molécula existente en una célula. Puede hidroxilar las bases púricas y pirimidínicas del DNA favoreciendo la aparición de mutaciones (Ames *et al.*, 1982; Floyd, 1990). Así mismo, puede provocar daños en las membranas celulares o inactivar ciertas enzimas (Del Maestro, 1980). Es responsable de

la degradación del ácido hialurónico *in vitro* y posiblemente intervenga *in vivo* en los cambios patológicos que se producen en las enfermedades inflamatorias (McCord, 1974). La reactividad de este radical es tan grande que tiene una vida media muy corta, lo que impide su difusión, reaccionando rápidamente con cualquier molécula vecina y dando lugar a radicales secundarios de reactividad variable y que pueden mediar su toxicidad (Halliwell y Gutteridge, 1984; Pryor, 1986). Así, los radicales  $\text{OH}^\bullet$  pueden reaccionar con iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) dando lugar al radical carbonato ( $\text{CO}_3^\bullet$ ), que es una especie bastante reactiva pero con una vida media más larga



A pesar de que el radical  $\text{OH}^\bullet$  una vez generado reacciona rápidamente y su vida en los sistemas biológicos es muy corta, podría mediar en la toxicidad del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido a partir de los cuales se forma. Estos dos compuestos, por su menor reactividad pueden difundir en la célula llegando hasta lugares más o menos alejados, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede incluso atravesar membranas fácilmente y generar allí los radicales  $\text{OH}^\bullet$  que reaccionarán con las moléculas próximas. (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La presencia simultánea del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno o sólo del último asegura la generación del radical hidroxilo en la mayoría de los rincones celulares.

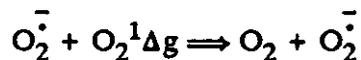
#### 4.- Oxígeno en estado singlete

Existen algunas pruebas experimentales que indican que parte de la toxicidad del  $\text{O}_2$  podría ser debida a la formación del oxígeno singlete. Las moléculas de oxígeno poseen en sus orbitales externos dos electrones desapareados de espines paralelos y en orbitales distintos. La absorción de una cierta cantidad de energía hace posible otras distribuciones de los electrones externos del  $\text{O}_2$ , por lo que pueden existir otros estados de la molécula de oxígeno.

El oxígeno en estado basal (triplete) puede por tanto captar energía y

reorganizar su configuración electrónica. Con energía suficiente, uno de sus dos electrones desapareados sufre una inversión de espín quedando ambos antiparalelos y dando lugar al oxígeno en estado de singlete; éste puede existir en dos formas que se diferencian por su distinto nivel energético. La primera forma de  $O_2^1\Sigma_g^+$  posee dos electrones desapareados con espines antiparalelos en orbitales distintos y se sitúa 155 KJ sobre el estado basal mientras que la otra,  $O_2^1\Delta_g$  (92 KJ sobre el estado basal) posee dos electrones con espines antiparalelos en un mismo orbital, por lo que no puede considerarse como un radical libre aunque su reactividad es también elevada.

La vida media de la primera forma  $O_2^1\Sigma_g$  es corta y suele pasar a  $O_2^1\Delta_g$  antes de haber reaccionado con cualquier otro átomo o molécula. El  $O_2^1\Delta_g$  puede ser uno de los productos de la reacción de dismutación de los radicales superóxido o del  $H_2O_2$  en la reacción de la catalasa, de modo que en lugar de  $O_2$  en estado fundamental se formaría oxígeno en estado singlete, pero no está claro en ninguno de los dos casos y también puede producirse en la reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro (Kobayashi y Ando, 1979). No obstante las cantidades que se obtendrían por cualquiera de estas vías son pequeñas y difíciles de detectar (Halliwell y Gutteridge, 1984). Además, el propio radical  $O_2^{\cdot}$  puede reaccionar con el oxígeno singlete reduciendo aún más sus niveles



La energía necesaria para que el oxígeno alcance el estado singlete pueden cedérsela ciertos pigmentos biológicos que hayan sido previamente excitados por la luz. Entre estos pigmentos están las clorofilas, porfirinas, flavinas y el retinal (Halliwell, 1981). *In vivo* se ha detectado la formación de oxígeno singlete en cloroplastos iluminados y en retina de mamíferos (Halliwell, 1981).

El  $O_2^1\Delta_g$  tiene una vida media relativamente corta en solución acuosa pues rápidamente pierde su exceso de energía, pero este tiempo se prolonga cuando se encuentra en medios hidrofóbicos (Foote *et al.*, 1978), como es el caso del interior de las membranas. Esto le permitiría reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas contribuyendo así a la formación de peróxidos lipídicos. La formación de oxígeno en estado

---

singlete podría causar daños en el cloroplasto, provocando la pérdida del color verde al dañar la clorofila. Lo mismo ocurriría en la retina, donde se conoce cómo la exposición prolongada a altas intensidades de luz causa daño en la retina y la acumulación de peróxidos lipídicos. La retina es especialmente sensible al oxígeno singlete pues los segmentos externos de conos y bastones contienen un alto porcentaje de lípidos poliinsaturados. En células animales en cultivo se han descrito efectos mutagénicos del oxígeno singlete (Ames *et al.*, 1982).

Las reacciones oxidativas en las que interviene el oxígeno singlete se manifiestan y son cuantificables por la emisión espontánea de quimioluminiscencia de baja intensidad en todo tipo de células. Sin embargo, en la actualidad ha dejado de considerarse al singlete como especie capaz de iniciar el daño oxidativo y se contempla a las especies quimioluminiscentes más como consecuencia que como causa de la oxidación de macromoléculas.

La participación del oxígeno en estado singlete en muchos de los procesos biológicos en los que se le ha intentado implicar no es del todo clara, puesto que ninguno de los métodos empleados para demostrarlo ofrece resultados totalmente concluyentes (Halliwell, 1981).

#### **IV. PEROXIDACION LIPIDICA**

Las especies activas derivadas del  $O_2$  provocan en las células una serie de alteraciones; entre éstas destaca la inactivación de enzimas, de la que ya se ha hablado brevemente. Pero no sólo las proteínas son el blanco del ataque oxidativo, también los lípidos y ácidos nucleicos son sensibles al mismo.

El proceso de deterioro de los lípidos debido al oxígeno o rancidificación se conoce desde hace mucho tiempo, aunque su relevancia en sistemas biológicos se determinó más recientemente.

##### **1.- Proceso de peroxidación**

### A. Estructura de la membrana

Los principales componentes de las membranas biológicas son los lípidos y las proteínas. Los fosfolípidos de las membranas contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y esto les convierte en blancos perfectos del proceso de peroxidación. El número de proteínas varía de unas membranas a otras, así como su localización, que puede ser extrínseca, cuando están adosadas a la superficie de la membrana, o intrínseca, cuando están fuertemente unidas a ella, parcial o totalmente incluidas o transmembranares. En cualquier caso, el proceso de peroxidación lipídica será capaz de dañar tanto a los lípidos como a las proteínas de la membrana.

### B. Iniciación, propagación y terminación

Todo proceso de peroxidación de macromoléculas ocurre en tres etapas bien definidas: iniciación, propagación y terminación. En el caso hasta ahora más estudiado y quizá más importante desde el punto de vista de la toxicidad aguda, de la peroxidación lipídica, ésta puede iniciarse con el ataque de una especie química, suficientemente reactiva, que extraiga un átomo de hidrógeno unido a un carbono contiguo a un doble enlace de un ácido graso poliinsaturado. Como ya hemos comentado, las membranas celulares poseen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, de ahí la importancia de este proceso.

Tras la extracción del átomo de hidrógeno se genera un radical alquil y tiene lugar una redistribución electrónica en la molécula para conseguir una mayor estabilidad que conduce a la formación de un dieno conjugado, el cual reacciona rápidamente con el oxígeno. El resultado es un radical peroxil ( $L-OO^{\bullet}$ ). Este radical puede aceptar un hidrógeno y dar lugar a un hidroperóxido lipídico ( $L-OOH$ ):



Se pueden, por tanto, distinguir varias fases: una primera de "iniciación" en la que tiene lugar la extracción monoelectrónica; una segunda fase de "propagación" en la que lo que suele ocurrir es que el radical peroxil capta un hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente continuando así la cadena de reacciones (Kappus, 1985). La propagación explica el carácter de reacción en cadena de la peroxidación lipídica, mediante el cual una sola iniciación puede dar lugar a daño en gran número de moléculas (Niki, 1987).

El proceso de peroxidación lipídica, una vez iniciado, es autocatalítico. Las defensas antioxidantes se encargan de detenerlo, aunque incluso sin ellas existen reacciones de "terminación", como el establecimiento de puentes cruzados por reacción entre radicales contiguos, o la fragmentación del ácido graso en gran cantidad de productos.

TERMINACION:  $L^{\bullet} + L^{\bullet} \Rightarrow L - L$  (establecimiento de un puente cruzado)

Esta última reacción podría en principio considerarse como "beneficiosa" porque detiene el proceso, pero también puede perturbar la funcionalidad de la membrana al dar lugar a la formación de puentes cruzados entre ácidos grasos contiguos.

En cuanto a qué especie es la encargada de iniciar este proceso, no parece haber acuerdo entre distintos autores. El radical superóxido es incapaz de iniciar la peroxidación lipídica (Fee, 1981), pero es posible que su forma protonada ( $HO_2^{\bullet}$ ) que aparece a pHs inferiores al fisiológico pueda hacerlo (Bielski *et al.*, 1983).

El peróxido de hidrógeno *per se* tampoco puede oxidar un ácido graso. Sin embargo, en presencia de metales de transición es un agente dañino para las membranas (Rubin y Farber, 1984).

Se ha sugerido que el oxígeno en estado singlete que se forma durante las reacciones de degradación de la peroxidación de los lípidos podría contribuir a la reacción en cadena iniciando de nuevo el proceso (Halliwell y Gutteridge, 1984), sin embargo no se

tiene certeza de ello (Halliwell, 1981).

Los metales de transición, posiblemente también el oxígeno en estado singlete y el  $\text{HO}_2^{\cdot}$ , puede que sean capaces de reaccionar con los hidroperóxidos lipídicos y a su vez inicien la peroxidación de otras moléculas de ácidos grasos (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La hipótesis clásica de la peroxidación lipídica considera al radical hidroxilo como iniciador, pues sí es capaz de extraer átomos de hidrógeno de una membrana lipídica. En la actualidad se han propuesto otros posibles iniciadores entre los que destacan los complejos de oxígeno y Fe como son el radical perferril  $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^{\cdot-}$  (Aust y Svingen, 1982), aunque algunos autores mantienen que no es muy reactivo. El radical ferril  $\text{FeO}^{2+}$  podría ser otro candidato (Halliwell y Gutteridge, 1984) al igual que complejos quelante -  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$  y oxígeno (Bucher *et al.*, 1983; Minotti y Aust, 1987a).

### C. Importancia de los metales en la peroxidación lipídica

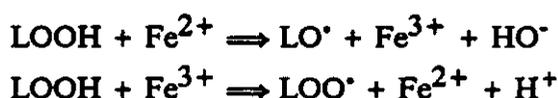
Los metales de transición, y especialmente el hierro, juegan un papel fundamental en el proceso de peroxidación lipídica, aunque algunos aspectos no hayan sido totalmente aclarados.

En primer lugar, los iones de Fe van a catalizar la formación del radical hidroxilo a partir de otras especies como el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido. Pero además, en experimentos en los que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el radical  $\text{OH}^{\cdot}$  han sido eliminados, continúa produciéndose peroxidación, lo que ha llevado a algunos autores a postular que son el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Fe}^{3+}$  los responsables de la iniciación de la peroxidación (Minotti y Aust, 1987b) y sería el cociente  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$  el que determinaría la velocidad y la extensión de ésta (Braugher *et al.*, 1986). Esto explicaría también los resultados contradictorios muchas veces obtenidos con quelantes de metales, que inhibirán o estimularán la peroxidación según sea la relación quelante/metal.

Sin embargo, otra interpretación de esta falta de efecto de agentes quelantes

del radical  $\text{OH}^\bullet$  sería que la formación de éste se produce en lugares específicos, en los que habría iones de Fe unidos a la membrana y una vez formado reaccionaría casi inmediatamente, sin dar lugar a ser eliminado por los agentes quelantes. Esta teoría del daño en lugar-específico no se limita al caso de la peroxidación lipídica. A pesar de todo, de lo que no hay duda es que la oxidación alternativa del  $\text{Fe}^{2+}$  y reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  resultan necesarias para la iniciación del proceso de peroxidación lipídica en los sistemas biológicos.

Además, los metales de transición desempeñan otro importante papel en el proceso de peroxidación. Los hidroperóxidos lipídicos no son muy estables y se descomponen en aldehídos y otros productos como alcanos, entre ellos etano y pentano, que pueden ser detectados en el aire exhalado (Frank *et al.*, 1980). Esta descomposición está catalizada por metales de transición, y complejos de éstos, como las sales de Fe y Cu que la aceleran (Enesco *et al.*, 1989). Además de complejos de Fe sencillos, pueden participar en la descomposición hemoproteínas, metahemoglobina, citocromo  $\text{P}_{450}$  y otros citocromos y la proteína almacenadora de hierro, ferritina, si está totalmente cargada. Esta situación no suele producirse *in vivo*, por lo cual, lo que haría la ferritina parcialmente cargada es secuestrar parte de los iones hierro presentes en la célula, impidiendo así que catalicen la descomposición de hidroperóxidos:



Un complejo de Fe reducido puede reaccionar con un hidroperóxido lipídico dando lugar a un radical alcoxil y complejos  $\text{Fe}^{3+}$ , al reaccionar con el hidroperóxido lipídico generarán el radical peroxil. Tanto el radical alcoxil ( $\text{LO}^\bullet$ ), como el radical peroxil ( $\text{LOO}^\bullet$ ), pueden estimular la reacción en cadena de la peroxidación lipídica extrayendo más átomos de hidrógeno (Halliwell y Gutteridge, 1989), aunque el radical alcoxil resulte más efectivo por su mayor reactividad.

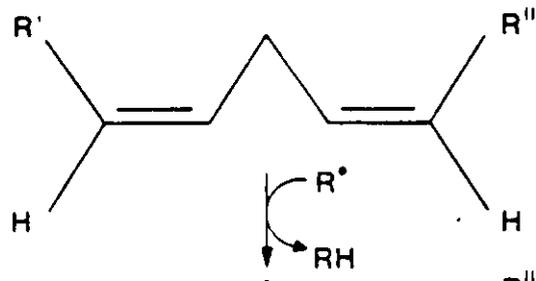
#### D. Productos de la peroxidación

Durante la fase de propagación pueden ocurrir una serie de reacciones complejas que determinan la formación de compuestos cíclicos, endoperóxidos, los cuales al descomponerse forman productos como el malondialdehído. Además, el radical alcoxil se fragmenta dando lugar a una variedad de compuestos, aldehídos como el butanal, hexanal, propanal o nonenales etc. Como resultado de la reacción de sales de Fe y Cu con hidroperóxidos lipídicos se generan epóxidos, compuestos que contienen un grupo carbonilo y gases como etano y pentano. Muchos de estos compuestos con grupos carbonilos son aldehídos, entre los que destaca el malondialdehído (Esqema 1). El MDA es capaz de reaccionar con distinto tipo de macromoléculas dando lugar a derivados, pero también es cierto que se metaboliza generando una serie de aductos detectables en orina, hecho que puede proporcionar un segundo método no invasivo para el estudio de la peroxidación del organismo en su conjunto junto con el análisis de gases exhalados como el pentano (Draper y Hadley, 1990; Janero, 1990).

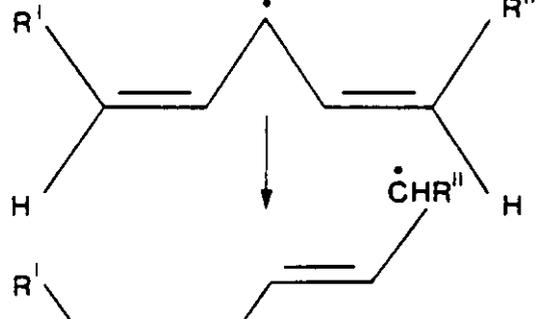
El proceso de peroxidación lipídica altera e incluso destruye las membranas biológicas en las que tiene lugar; afecta tanto a la membrana plasmática celular como a las membranas internas de los distintos orgánulos. Así por ejemplo, las membranas de las mitocondrias se ven especialmente afectadas (Ilustraciones 2a y 2b) por su alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados y por ser la mitocondria una de las principales fuentes de radicales (Barja de Quiroga, 1981). La peroxidación lipídica provoca un aumento del orden y viscosidad de las membranas, descensos en su resistencia eléctrica, facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas y, al aumentar los entrecruzamientos con proteínas, disminuye la movilidad lateral y rotacional de las mismas (Richter, 1987). Como consecuencia de la peroxidación se producen en las membranas alteraciones en su ultraestructura que conducen a pérdida de la fluidez y cambios en la permeabilidad. Esto se traduce en aumentos o descensos en el flujo en un sentido u otro de diversos componentes extra o intracelulares, perdiéndose, por ejemplo, los gradientes iónicos y las funciones secretoras (Southorn y Powis, 1988).

Uno de los efectos deletéreos de la peroxidación es la liberación de enzimas

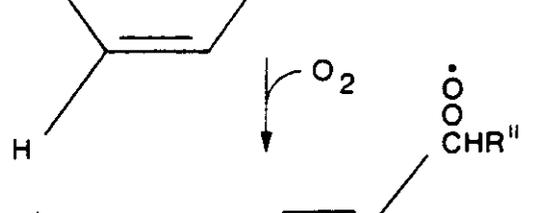
Acido graso poliinsaturado



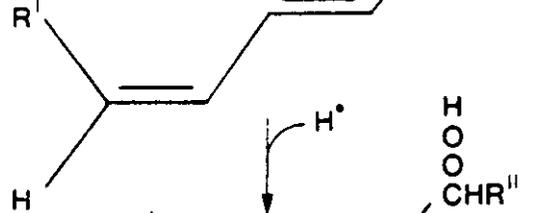
Dieno conjugado



Radical peroxil

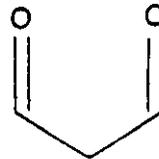


Hidroperóxido lipídico



Productos de fragmentación

Malondialdehído



PROCESO DE PEROXIDACION LIPIDICA

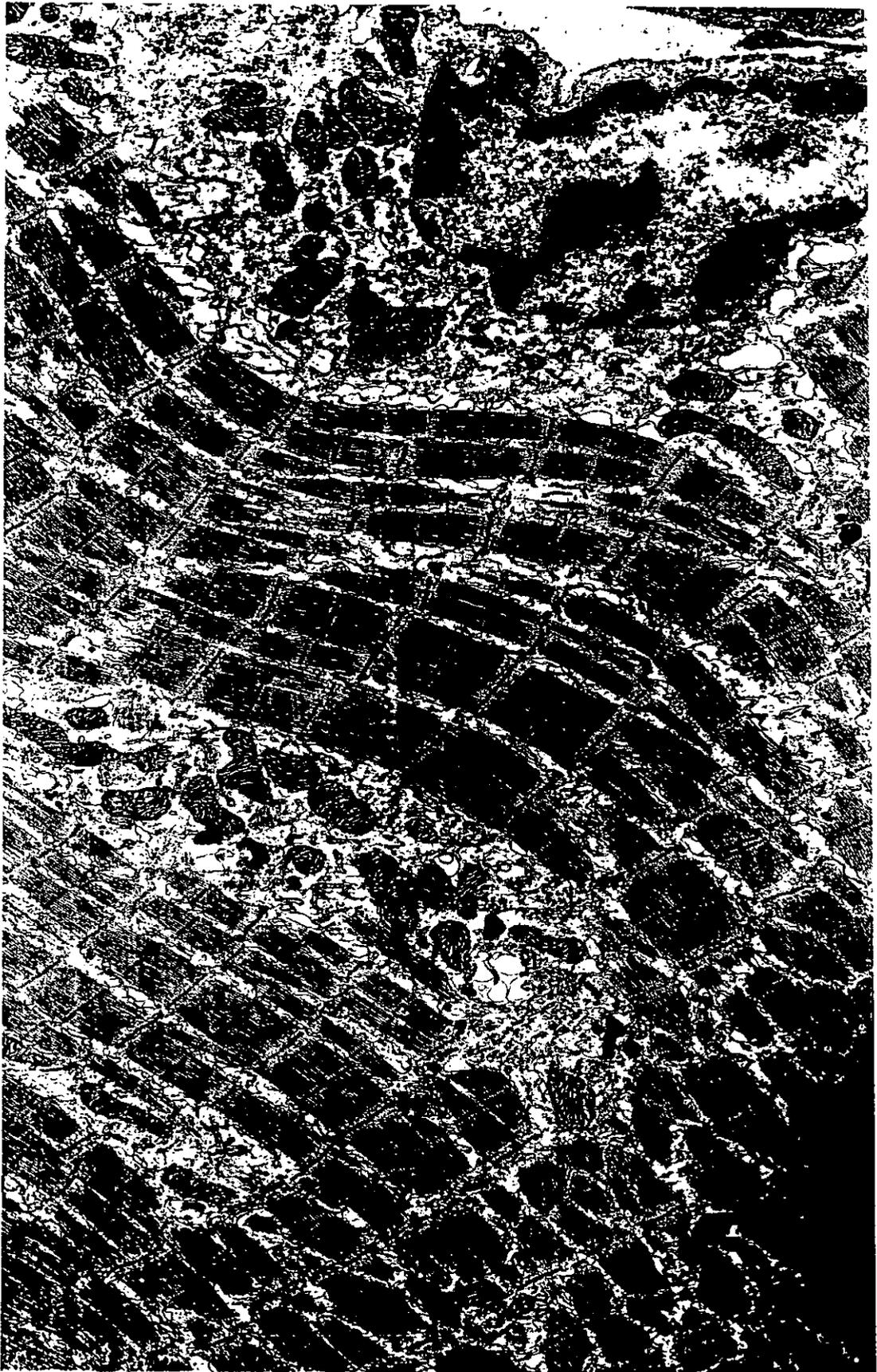


Ilustración 2a. Mitocondrias en normoxia



Ilustración 2b. Mitocondrias en hiperoxia

---

hidrolíticas debido a la rotura de los lisosomas, con la consiguiente digestión celular. La lisis celular también puede suceder si la membrana plasmática resulta seriamente dañada. La peroxidación lipídica inactiva enzimas de membrana y receptores proteicos. Esta inactivación puede deberse a la pérdida de la estructura de la membrana impidiendo los cambios conformacionales necesarios para su funcionalidad. También puede producirse un ataque directo de radicales, peróxidos lipídicos o productos de la degradación de éstos. Algunas enzimas y otras proteínas alejadas de la zona donde tiene lugar la peroxidación pueden ser destruidas por productos estables de ésta. Un ejemplo sería la reacción del malondialdehído con proteínas, concretamente con el grupo amino de éstas, dando lugar a entrecruzamientos, pero los resultados aún no son concluyentes. Lo mismo ocurre con proteínas estructurales intra o extracelulares.

Los hidroperóxidos lipídicos y algunos de sus productos de degradación son altamente citotóxicos. Si la peroxidación lipídica ocurre en regiones extensas de la membrana celular, los productos de esta peroxidación pueden ser liberados en el espacio extracelular, lo cual puede afectar a la permeabilidad vascular y a la quimiotaxis de los leucocitos. Los peróxidos lipídicos además estimulan la síntesis de prostaglandinas y la agregación de plaquetas (Del Maestro *et al.*, 1980).

El proceso de peroxidación lipídica parece implicado en el fenómeno de envejecimiento, hipótesis apoyada por la acumulación de gránulos de lipofuscina en la matriz celular durante el envejecimiento, así como de GSSG, productos TBA -positivos o aumento de liberación de alcanos en dípteros viejos (Sohal, 1986) y a otro nivel parece responsable del envejecimiento y pérdida de funcionalidad de los eritrocitos (Einsele *et al.*, 1987).

Los sistemas biológicos contienen cantidades significativas de "promotores de peroxidación". Parece lógico pensar que la peroxidación lipídica ocurre en las células aerobias aún bajo tensiones de O<sub>2</sub> atmosféricas, pero los peróxidos resultantes no se acumularán a menos que los mecanismos protectores de la célula estén saturados por un exceso de O<sub>2</sub> o por la presencia de cantidades anormales de promotores. Así, se ha comprobado que la exposición a elevadas concentraciones de O<sub>2</sub> produce un incremento

de peróxidos lipídicos. Otro problema causado por el proceso de peroxidación lipídica es el consumo de grandes cantidades de  $O_2$ , lo cual puede llevar a condiciones críticas en las células. Además, la peroxidación provoca una disminución de los mecanismos de defensa antioxidantes.

En general, la peroxidación es un proceso altamente destructivo, cuya especificidad es bastante baja, destruyendo una gran variedad de biomoléculas, aunque parte de los cambios observados podrían ser provocados únicamente por los radicales libres sin necesidad del ataque a los lípidos. Además de los lípidos de las membranas existen otras moléculas con dobles enlaces susceptibles de ser peroxidadas. Entre ellas podemos citar el retinol o vitamina A, algunos antibióticos que pierden su carácter antimicótico al ser oxidados y sobre todo, por su reciente implicación en la formación de la placa aterosclerótica, las lipoproteínas de baja densidad (Steinbrecher *et al.*, 1990).

## **2.- Protección contra la peroxidación lipídica**

### **A. Mediante organización estructural de los lípidos**

Los ácidos grasos insaturados dispersos en disolventes orgánicos son peroxidados fácilmente. Lo mismo ocurre con los fosfolípidos en estructuras micelares simples, cuya peroxidación es más rápida que cuando se encuentran formando parte de una bicapa lipídica. Algunos autores piensan que ésto es debido a que los radicales peroxil son más polares y tienden a moverse y situarse en la superficie de la bicapa, reduciendo de esta manera la eficacia de la iniciación .

La presencia de colesterol en las membranas también modifica su susceptibilidad a la peroxidación. Probablemente intercepte parte de los radicales presentes y afecte a la estructura interna de la membrana mediante la interacción de su gran anillo hidrofóbico con las cadenas de los ácidos grasos.

Al avanzar la peroxidación, muchos de los productos que se generan (ej. lisofosfolípidos) tienen actividad detergente y contribuyen a aumentar el deterioro de la

---

membrana. La unión a la membrana de especies con carga positiva puede también alterar el grado de peroxidación en uno u otro sentido según las condiciones.

Por último, los cambios en la composición lipídica de una membrana son determinantes del grado de susceptibilidad a la peroxidación. La relación fosfolípidos/colesterol, así como el tipo de fosfolípidos presentes y los ácidos grasos que contienen, especialmente % insaturados/saturados, van a contribuir a la integridad estructural de la membrana. Cualquier cambio en estas variables supondrá una variación de la sensibilidad de la membrana al estrés oxidativo.

## **B. Antioxidantes**

En este apartado vamos a incluir cualquier sustancia capaz de detener o retardar la peroxidación lipídica. Mencionaremos brevemente los antioxidantes más importantes relacionados con ésta, pero será en el apartado dedicado a las defensas antioxidantes donde los describiremos con mayor profundidad.

Los antioxidantes pueden actuar a distintos niveles. Cabe incluir aquí mecanismos que reduzcan la concentración de  $O_2$ , que eliminen los radicales responsables de la iniciación antes de que se produzca, agentes quelantes de iones metálicos, aminas aromáticas o fenoles capaces de eliminar radicales como el peroxil y alcoxil, impidiendo de esta manera la propagación, etc. Los agruparemos en dos grandes categorías, antioxidantes preventivos y antioxidantes que interrumpen la cadena de reacciones (Niki, 1987).

### **- Vitamina E**

La vitamina E o mejor, la familia de los tocoferoles, desempeñan un importante papel antioxidante. Se conocen cuatro tocoferoles de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es el más importante en sistemas biológicos, aunque los otros también tienen cierta actividad antioxidante (Miyazawa *et al.*, 1990).

La vitamina E tiende a concentrarse en el interior de las membranas debido

a su carácter hidrofóbico. También se encuentra en las lipoproteínas sanguíneas y en las glándulas adrenales. Esta situación le permite un fácil acceso a los hidroperóxidos lipídicos formados.

### **· - Glutación peroxidasa**

Durante mucho tiempo no ha habido acuerdo entre distintos autores sobre su papel. A pesar de la acumulación de datos que ponían de manifiesto la importante función protectora desempeñada por esta enzima no estaba demasiado claro el mecanismo, ya que se trataba de una enzima citosólica. La glutación peroxidasa es una enzima dependiente de Se que se localiza fundamentalmente en el citosol y también en la mitocondria. Existe además otra actividad glutación peroxidasa no dependiente de Se que parece ser debida a algunas enzimas glutación transferasas. Ambas son capaces de descomponer hidroperóxidos *in vitro*, pero debido a su localización se desconocía cómo podían llevar a cabo esta función para descomponer los hidroperóxidos lipídicos de la membrana.

Se ha propuesto la existencia de un factor citosólico dependiente de glutación que sería capaz de actuar en la interfase citosol-membrana. Otros autores mantienen que la fosfolipasa A<sub>2</sub> ligada a la membrana, y activada por el proceso de peroxidación, sería la encargada de liberar los ácidos grasos peroxidados dejándolos accesibles a la acción de las glutación peroxidases (Van Kuijk *et al.*, 1987). A esto contribuiría la mayor polaridad de los hidroperóxidos que tienden a moverse hacia la superficie de la membrana, además del "turnover" normal de los lípidos de la membrana que los irá liberando. Por último, ha sido aislada por el grupo de Ursini y recientemente determinado el 75% de su secuencia, una enzima Se dependiente distinta de la citosólica que sí actuaría directamente sobre los hidroperóxidos de la membrana (Schuckelt *et al.*, 1991). También se ha encontrado en el núcleo una glutación transferasa con actividad contra los hidroperóxidos lipídicos (Ketterer y Meyer, 1989). En cualquier caso lo que sí está claro es que la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de la glutación peroxidasa Se dependiente contribuye a disminuir la formación del radical OH<sup>·</sup>.

## V. DAÑO AL DNA Y PROTEINAS

### 1.- Daño oxidativo y DNA

Durante muchos años los estudios sobre daño oxidativo se han centrado casi exclusivamente en los lípidos. Hoy se piensa que quizá ha sido un error exagerar la importancia de éstos como blanco principal del ataque oxidativo, y aunque se siga creyendo que el efecto agudo de la toxicidad del oxígeno se lleva a cabo vía lípidos, a largo plazo el daño a proteínas y ácidos nucleicos es fundamental, de ahí la reciente proliferación de trabajos sobre este nuevo aspecto (Ames *et al.*, 1982; Davies *et al.*, 1987b; Floyd, 1990).

Todos los componentes celulares son sensibles al ataque oxidativo; proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono sufren modificaciones y los productos de la peroxidación se irán acumulando. La importancia de estos procesos dependerá del carácter cualitativo del daño y de la mayor o menor dificultad de reparación del mismo.

Hace ya una década se sugirió que los radicales hidroxilo, superóxido y el oxígeno en estado singlete, así como los productos de la peroxidación y descomposición de los lípidos podían causar alteraciones en el DNA (Ames *et al.*, 1982). Hoy sigue sin haber un acuerdo total sobre quién es el principal responsable del daño oxidativo sobre el DNA.

Algunos autores mantienen que el oxígeno en estado singlete, radicales ferrilo o el peróxido de hidrógeno son capaces de ello, pero la mayoría coincide en señalar al radical hidroxilo como causa directa, aunque a veces medie en la acción de especies capaces de difundir, como es el caso del peróxido de hidrógeno, (Dizdaroglu *et al.*, 1991) y por ello la presencia de metales de transición resulte imprescindible (Aruoma *et al.*, 1989; Halliwell y Aruoma, 1991). Por otro lado, parece cada vez más clara la relación entre peroxidación lipídica y daño al DNA. Productos resultado de la peroxidación lipídica, así como radicales generados en el curso de la misma son capaces de dañar no sólo al DNA, sino también a proteínas nucleares (Fraga y Tappel, 1988; Vaca y Harms-Ringdahl, 1989). Además, el estrés oxidativo es capaz de activar enzimas con actividad nucleasa y, así por ejemplo, se habla de que éste incrementaría las concentraciones de  $Ca^{2+}$  libre intracelular lo que

activaría unas endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Halliwell y Aruoma, 1991).

De los principales componentes del DNA, las pirimidinas son las más sensibles al ataque oxidativo, pero también purinas y azúcares pueden resultar dañados, así como proteínas histonas y no histonas. Los radicales provocan cambios de bases, roturas en las cadenas de DNA, degradación de la desoxirribosa, aberraciones cromosómicas, etc.; si esto sucede *in vivo*, la célula pondrá en juego los mecanismos reparadores correspondientes, aumentando con ello el riesgo de mutagénesis. Muchas de estas alteraciones pueden impedir la replicación del DNA, obstruir la transcripción y reducir la síntesis de proteínas (Saul *et al.*, 1987). Además, el ataque de radicales como el hidroxilo, puede dar lugar a la formación de puentes cruzados entre ácidos nucleicos y entre éstos y proteínas (Dizdaroglu y Gajewski, 1989).

La mejor prueba de que el ataque oxidativo sobre el DNA tiene lugar *in vivo*, es la existencia de enzimas encargadas de reparar el daño causado por los radicales (Ames, 1989) y sobre todo la aparición de productos de oxidación del DNA (Kasai y Nishimura, 1984). El desarrollo de un método de HPLC para la determinación de la 8-hidroxi guanina primero (Floyd *et al.*, 1986) y el descubrimiento de la aparición en la orina de estos productos para determinar el daño sobre el DNA (Ames, 1989; Fraga *et al.*, 1990) después, han conducido al desarrollo de este campo. Se trata de productos del ataque oxidativo a bases de los ácidos nucleicos como la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, el 5-hidroxiuracilo o la timina-glicol, pero existen más de una veintena de aductos descritos en tejidos y orina de varias especies. El mejor método para su medida es la espectrometría de masas acoplada a un cromatógrafo de gases, pero su difícil disponibilidad en muchos laboratorios hace necesaria la adopción de técnicas de HPLC, cuyos problemas técnicos con muestras *in vivo* aún no han sido claramente resueltos. Se ha calculado que en humanos se producen como media 10.000 impactos de daño oxidativo por célula y día (Fraga *et al.*, 1990), cantidad cientos de miles de veces superior a la causada por la radiación natural de fondo, lo que pone de manifiesto la importancia de los radicales libres de origen endógeno como causantes potenciales de muchas alteraciones de la función celular.

Los radicales libres derivados del oxígeno han sido implicados en el proceso de

carcinogénesis por diversos autores (Masoti *et al.*, 1988). Su papel dual provocando roturas en las cadenas de DNA y dando lugar a la formación de aductos resulta básico; éstos últimos son responsables en muchos casos de la disminución en la fidelidad de replicación del DNA (Floyd, 1990). Así, se ha comprobado que la 8-hidroxiguanina es un marcador muy útil para el seguimiento del daño al DNA en estudios de carcinogénesis (Ames, 1991). En células tumorales se han detectado alteraciones en la actividad de enzimas implicadas en el control de los niveles de especies activas de  $O_2$ . Así, los niveles de enzimas como la catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa se ven modificados en muchas células tumorales. También se sabe que compuestos como el TNF (factor de necrosis tumoral) provocan la inducción de enzimas como la superóxido dismutasa (Del Maestro *et al.*, 1992). Por otro lado, sustancias relacionadas con los mecanismos de protección frente a la toxicidad del  $O_2$  (ácido ascórbico, vitamina E,  $\beta$ -carotenos ...) actúan como agentes anticarcinogénicos (Ames *et al.*, 1982).

Estas alteraciones celulares pueden observarse en los organismos aerobios expuestos a elevadas tensiones de  $O_2$ . Sin embargo, los radicales libres se producen también en los organismos sometidos a presiones de  $O_2$  normales, aunque en cantidades inferiores a las de hiperoxia. Los mecanismos de defensa que posee la célula son, en este caso, eficaces para evitar los daños que pueden ocasionar. Pero existe la posibilidad de que parte de estas especies activas no sean neutralizadas por los mecanismos de defensa y de ahí que ciertas manifestaciones del proceso de envejecimiento y patologías relacionadas sean el resultado de una exposición crónica a tensiones de  $O_2$  normales para el organismo (Fraga *et al.*, 1990).

## **2.- Daño oxidativo y proteínas**

Las proteínas son otro de los componentes celulares vulnerables al ataque oxidativo. Al igual que ha ocurrido con el DNA, los trabajos sobre este aspecto del daño oxidativo se han llevado a cabo recientemente.

En este campo hay que destacar la labor realizada por el grupo de Kelvin Davies en California. Tras observar cómo células sometidas a estrés oxidativo sufrían un

proceso de proteólisis, se propusieron averiguar si ello era debido a la activación de enzimas proteolíticas latentes o si lo que ocurría era que aumentaba la susceptibilidad a la proteólisis en las proteínas oxidadas. Con este objetivo iniciaron un estudio profundo de los efectos del ataque oxidativo sobre proteínas.

Comprobaron cómo los radicales de oxígeno son capaces de producir grandes modificaciones en las proteínas. Observaron disminuciones de la fluorescencia nativa debido a la destrucción del triptófano y la tirosina, cambios en los puntos isoeléctricos por modificaciones de carga, aumentos de peso molecular debido a la formación de asociaciones intermoleculares covalentes o hidrofóbicas, o descensos del peso molecular por fragmentación de los péptidos, etc.

Analizando por separado el efecto de distintos radicales, hoy se piensa en el radical hidroxilo como principal responsable del daño. Dicho radical es capaz de producir agregados covalentes aunque rara vez da lugar a productos de fragmentación; también provoca cambios en la carga eléctrica neta, pérdida del triptófano y producción de bitirosina. Resultados similares se obtienen al combinar el radical hidroxilo con radical superóxido y oxígeno, aunque en este caso no suele producirse agregación y sí fragmentación. El radical superóxido por sí solo no es capaz de provocar ninguno de estos efectos, por lo que el radical hidroxilo es la especie iniciadora en todos los casos; el oxígeno y el radical superóxido, lo que harían es modificar el daño causado por éste (Davies, 1987). En cuanto al  $H_2O_2$  *per se* no parece capaz de provocar modificaciones y necesitaría la presencia de metales de transición (Davies, 1986).

Todos los aminoácidos de una proteína son susceptibles de modificación por el ataque del hidroxilo o su combinación con otros radicales, mientras que el radical superóxido sólo es capaz de reducir residuos de cistina. Entre los aminoácidos más sensibles se encuentran triptófano, histidina y cisteína, además de la tirosina formada por reacción del  $OH\cdot$  con fenilalanina. Las modificaciones de la estructura primaria se inician por el ataque del hidroxilo, que al reaccionar con residuos de ciertos aminoácidos puede dar lugar a otros radicales. El oxígeno y el radical superóxido pueden transformar los productos de la reacción del hidroxilo, aumentando el daño como en el caso de la pérdida de triptófano

---

o disminuyéndolo, como ocurre con la prevención de la formación de bitirosina por parte del superóxido. Las modificaciones oxidativas en la estructura primaria de las proteínas son responsables de las alteraciones en la estructura secundaria y terciaria (Davies *et al.*, 1987a).

La exposición al radical hidroxilo provoca desnaturalización y un aumento del grado de hidrofobicidad seguidos de un proceso de agregación covalente. Este aumento de entrecruzamientos entre moléculas de proteínas dando lugar a dímeros, trímeros, tetrameros, etc., se explica por la formación de bitirosinas intermoleculares aunque, esencialmente, cualquier radical aminoácido de la cadena polipeptídica puede formar un puente con otro en otra molécula de proteína. En el caso de la fragmentación también se produce una desnaturalización y aumento de hidrofobicidad previos. La fragmentación tiene lugar por la abstracción de un hidrógeno de un carbono  $\alpha$  de un aminoácido, más que por rotura del enlace peptídico. Tras la adición de oxígeno se forma un radical peroxil que reaccionará para dar lugar a peróxidos. La descomposición de éstos es responsable de la escisión de la cadena polipeptídica. Los fragmentos resultantes pueden formar conglomerados que se mantienen unidos por fuerzas no covalentes (Davies y Delsignore, 1987).

Tanto en el caso de la fragmentación, como en el de la agregación, se produce una desnaturalización previa y un aumento de hidrofobicidad. Esta desnaturalización implica un desdoblamiento que dejará más accesibles muchos enlaces peptídicos y que explicaría la mayor susceptibilidad a la proteólisis de estas proteínas modificadas por oxidación. Sólo en casos de estrés oxidativo extremo, en los que la formación de puentes cruzados es elevada, no se produce este incremento de susceptibilidad a la proteólisis característico, debido a que los enlaces covalentes que se forman son resistentes a la proteólisis y las moléculas del interior de los agregados serán menos accesibles. Los fragmentos o las proteínas desnaturalizadas resultan ser sustratos inmejorables para la proteólisis e incluso se ha llegado a sugerir que el daño oxidativo podría ser un mecanismo para marcar y controlar la degradación de determinadas proteínas, siendo el simple proceso de desnaturalización la señal para la degradación de proteínas oxidadas (Davies *et al.*, 1987b).

Tanto la formación de entrecruzamientos tras la oxidación de proteínas, como la susceptibilidad a la proteólisis, van a estar directamente implicadas en fenómenos como el desarrollo, con la edad, de cataratas en el ojo (Taylor y Davies, 1987) y, sobre todo, por su importancia como marcador de envejecimiento, en la aparición de gránulos de lipofuscina. Estos son acúmulos de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas con abundantes entrecruzamientos.

En cuanto a la procedencia del daño oxidativo, además de las fuentes de radicales ya mencionadas, hay que destacar el hecho de que la glucosa al autooxidarse produce radicales. Por esta razón, algunos autores atribuyen parte de las alteraciones que se producen en enfermedades como la diabetes *mellitus*, cataratas, aterosclerosis, síntomas relacionados con la edad, etc., al daño oxidativo y no únicamente a la glicosilación de proteínas y consiguiente formación de productos Amadori (Hunt *et al.*, 1988; Van Boekel, 1991). Por otro lado, algunos autores proponen distintos sistemas de oxidasas de función mixta (MFO) como responsables de la oxidación de proteínas (Stadtman, 1988).

## **VI. DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Las células aerobias disponen de una serie de mecanismos que les permiten vivir en una atmósfera con oxígeno, ya que continuamente generan cantidades pequeñas, pero significativas, de radicales de oxígeno. Existen varias posibles clasificaciones de estas defensas antioxidantes. Una de ellas las divide en dos grupos: sistemas de defensa primarios y secundarios.

En el primer grupo se incluyen aquellos sistemas encargados de prevenir la peroxidación lipídica y otros tipos de daño oxidativo. Entre ellos se encuentran proteínas como la transferrina o la ferritina que, al secuestrar iones Fe, impiden que tenga lugar la reacción de Haber-Weiss catalizada, la iniciación de la peroxidación o la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos. La ceruloplasmina es posiblemente un sistema de defensa extracelular. Además, pertenecen a este grupo enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa (CAT), encargadas de eliminar los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno respectivamente y la glutatión peroxidasa (GPx), que contribuye también a

eliminar el  $H_2O_2$ . Se incluyen aquí compuestos como los  $\beta$ -carotenos capaces de eliminar el  $O_2$  en estado singlete, el ácido ascórbico y el glutatión.

Los sistemas de defensa secundarios constituyen ese segundo grupo. Son sistemas más específicos que tienden a detener la peroxidación lipídica una vez que ya se ha iniciado. Entre ellos se encuentra la vitamina E, que comprende cuatro derivados diferentes de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es el más importante. También en este grupo se sitúa la glutatión peroxidasa, que es capaz de reducir los hidroperóxidos lipídicos (Kappus, 1985).

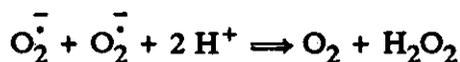
Otras veces, estos mecanismos de defensa se clasifican en sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y según trabajen en la fracción soluble o en la lipídica.

### 1.- Mecanismos enzimáticos

De los tres tipos principales de especies de  $O_2$  activo,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ , sólo existen enzimas detoxificadoras para los dos primeros. Sin embargo, eliminando esas dos especies se limita la formación del dañino radical hidroxilo.

#### A. Superóxido dismutasas (SOD)

La superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1) fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969. Ellos establecieron la existencia de una actividad enzimática capaz de catalizar la reacción de dismutación de los radicales superóxido:



La presencia de esta enzima en casi todos los organismos aerobios y su ausencia en muchos anaerobios indica su importancia en los mecanismos de defensa frente al efecto tóxico del oxígeno.

Se han encontrado tres tipos de superóxido dismutasa (SOD). Todas ellas catalizan

---

la misma reacción y operan con un mecanismo idéntico, pero se diferencian en el metal presente en su centro activo.

La SOD con cobre y zinc se localiza en el citosol de las células eucariotas y algún procarionta. Consta de dos subunidades idénticas, estando cada una de ellas unida a un átomo de cobre y otro de zinc. De estos dos metales sólo requiere el cobre para su actividad catalítica, siendo el zinc puramente estructural. Tiene un peso molecular bajo (30kDa) y se inhibe en presencia de cianuro y dietilditiocarbamato (DDC). El DDC se une al Cu en el sitio activo y elimina el metal de la enzima. El grupo de Marklund (Karlsson y Marklund, 1988) ha descrito otra Cu-Zn-SOD dimérica, presente en el líquido extracelular, que podría ser de especial relevancia en el control de las reacciones inflamatorias.

La SOD unida a manganeso está presente en células eucariotas y procariotas. En las primeras se localiza en la matriz mitocondrial y es un tetrámero. En procariotas se encuentra en forma de monómero, dímero, trímero o tetrámero. Las secuencias de aminoácidos de todas las Mn-SOD, independientemente de que sean de animales, plantas o bacterias, son muy similares y distintas de las de las Cu-Zn-SOD, lo que estaría de acuerdo con la teoría endosimbionte para el origen de la mitocondria. El peso molecular de esta SOD es mayor (80 kDa) y en este caso es el átomo de Mn el que realiza la dismutación.

La SOD unida a hierro se encuentra casi exclusivamente en procariotas y algas. Presenta similitudes considerables con la Mn-SOD, tanto en el número y peso molecular de sus subunidades, como en la secuencia de aminoácidos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

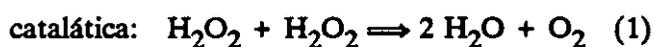
La función fisiológica de la SOD está en relación con la toxicidad de su sustrato. La ausencia de esta actividad enzimática implica un aumento de los niveles de  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , con los consiguientes perjuicios para la célula.

Se ha comprobado la existencia de una correlación positiva entre los niveles de

actividad SOD y la tolerancia a la hiperoxia tanto en bacterias como en organismos superiores. Así, se ha observado un incremento de la actividad SOD cuando se someten a atmósferas hiperóxicas. En la rata se detecta un incremento de la SOD del pulmón cuando se mantiene a los animales en una atmósfera con un 85% de O<sub>2</sub> durante siete días. Posteriormente estas ratas muestran una mayor tolerancia a un nivel de 100% de O<sub>2</sub> (Crapo y Tierney, 1974). En ratas recién nacidas la exposición a O<sub>2</sub> al 95-100% provoca una rápida inducción de la SOD del pulmón. Todos estos datos confirman la participación de la SOD en los mecanismos de defensa antioxidantes y su relación con la tolerancia a la hiperoxia.

### B. Catalasa (CAT)

La catalasa (EC.1.11.1.6), cuya existencia es conocida desde hace mucho tiempo, es una de las enzimas implicadas en la eliminación del peróxido de hidrógeno en los organismos aerobios, aunque existen ciertos anaerobios estrictos que también la poseen. Ha sido aislada y purificada en gran número de tejidos tanto animales como vegetales y también en bacterias. La catalasa puede catalizar dos tipos de reacciones:

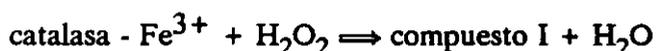


La primera reacción, denominada catalítica (1), es una óxido-reducción bieletrónica en la que a partir de dos moléculas de peróxido de hidrógeno (dismutación) se forman una de oxígeno y dos de agua. La segunda se denomina reacción peroxidativa y en ella la enzima, trabajando como una peroxidasa, puede utilizar como sustrato el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero además requiere otra molécula diferente donadora de electrones (2). El tipo de sustrato donador de electrones (AH<sub>2</sub>) no es específico, por lo que su naturaleza química en la reacción peroxidativa es diversa y puede incluir compuestos fenólicos, alcoholes, nitritos, ácido fórmico y aminas primarias.

En ambas reacciones se ha producido la reducción del peróxido de hidrógeno hasta agua. Sin embargo, las constantes de velocidad indican un predominio de la reacción

catalítica sobre la peroxidativa. La  $V_{\max}$  de la descomposición de  $H_2O_2$  por parte de la catalasa es muy grande cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno son elevadas. Por el contrario, a bajas concentraciones es poco efectiva al poseer una  $K_M$  muy alta y, por tanto, una baja afinidad por el  $H_2O_2$ . Por ello, difícilmente se alcanza la saturación pues, además, altas concentraciones de  $H_2O_2$  provocan la inactivación de la enzima (Aebi, 1974).

En ambos tipos de reacciones (1) y (2) se forma un complejo primario denominado compuesto I entre el peróxido de hidrógeno y el Fe del grupo prostético hemo:

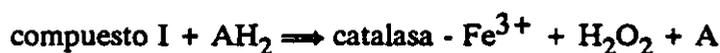


Para que se produzca la reacción catalítica, una segunda molécula de peróxido de hidrógeno debe interactuar con el compuesto I, formándose entonces un compuesto ternario del cual se liberará una molécula de agua y otra de oxígeno:



Un resto de histidina, distal al Fe del grupo hemo, interviene en esta interacción orientando correctamente a la molécula de  $H_2O_2$ . El 3-amino-1,2,4-triazol se une al compuesto I, precisamente por este resto de histidina, inhibiendo así irreversiblemente a la catalasa.

En la reacción peroxidativa, el compuesto I interactúa con una molécula donadora de electrones distinta al  $H_2O_2$ :



La descomposición del peróxido de hidrógeno por la reacción catalítica predomina cuando la concentración de ese compuesto es alta. Si los niveles de  $H_2O_2$  son bajos y además existe una concentración de la molécula donadora ( $AH_2$ ) suficiente, se favorecerá la reacción peroxidativa (Chance *et al.*, 1979).

La catalasa es un tetrámero con cuatro grupos hemo y tiene un peso molecular que oscila entre 210.000 y 280.000 daltons. En las células suele estar asociada a los peroxisomas, aunque se ha indicado su presencia también en el citosol (Roels y Geerts, 1982), pero podría tratarse de una forma vieja de la enzima. Algunos trabajos han demostrado por inmunolocalización al microscopio electrónico que, aunque en la rata la CAT se limita al interior del peroxisoma, en el cobaya está presente en grandes cantidades en el citoplasma. Estudios menos precisos por fraccionamiento celular mediante centrifugación sugieren lo mismo para *Rana lessonae*. La catalasa se encarga de eliminar el peróxido de hidrógeno generado en los peroxisomas. No obstante, parte del  $H_2O_2$  puede salir al citosol puesto que la membrana de los peroxisomas no es una barrera eficaz que evite su difusión. Del mismo modo, el  $H_2O_2$  producido en el citosol puede también entrar al peroxisoma y ser allí degradado por la catalasa. Este  $H_2O_2$ , así como el procedente de otros orgánulos como mitocondrias y retículo endoplásmico y el del propio citoplasma, es eliminado por la acción de la glutatión peroxidasa localizada en el citosol y en las mitocondrias, aunque en algunas especies se ha demostrado también la existencia de catalasa en el citosol.

El papel protector de la catalasa frente al ataque oxidativo se pone de manifiesto en situaciones como la hiperoxia, en la que se produce mayor cantidad de  $H_2O_2$  (Yusa *et al.*, 1987) y que suele asociarse con inducciones adaptativas de la actividad CAT (Frank *et al.*, 1980; Barja de Quiroga *et al.*, 1988); estos incrementos consiguen aumentar la tolerancia de los organismos a la hiperoxia. En este sentido se han realizado interesantes experiencias con inyecciones intravenosas de SOD y CAT incluidas en liposomas, consiguiendo así aumentar la supervivencia de animales expuestos a hiperoxia (Turrens *et al.*, 1984).

El aminotriazol (3-amino-1,2,4-triazol) inhibe la actividad catalasa *in vivo* de forma irreversible. Para ello es necesaria la presencia de  $H_2O_2$ , pues el AT reacciona con el compuesto I, formando un complejo covalente inactivo con la enzima.

AT



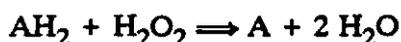
El aminotriazol se sabe que modifica la histidina 74 de la apoproteína de la catalasa. Este aminoácido resulta fundamental para la posterior entrada de otra molécula de  $H_2O_2$ , de ahí la inactivación de la enzima (DeMaster *et al.*, 1986). Este es el mecanismo de acción del AT comúnmente aceptado, aunque se habla de la posibilidad de un mecanismo indirecto del AT a través de un hipotético factor citosólico (Williams *et al.*, 1985). Existen compuestos como el etanol que impiden la inactivación de la catalasa por parte del AT. El etanol reduce rápidamente al compuesto I compitiendo con la reacción del AT con dicho compuesto I (Yusa *et al.*, 1987). Lo mismo sucede con otro inhibidor como la 3-3'-diaminobenzidina, que protege a la catalasa de la inactivación irreversible por AT uniéndose al compuesto I (Darr y Fridovich, 1985). La necesidad de la presencia de  $H_2O_2$  para que se dé la inactivación, permite llevar a cabo el que quizás sea el único método seguro y disponible actualmente para una cuantificación del peróxido de hidrógeno presente *in vivo* en condiciones normales, de manera indirecta, a través del estudio de la tasa de inhibición de esta enzima por AT. Así por ejemplo, el hecho de que la catalasa de eritrocitos de rata no resulte normalmente inhibida por AT se relaciona con la relativa ausencia de  $H_2O_2$  en dichas células.

### C. Glutatión peroxidasas (GPx)

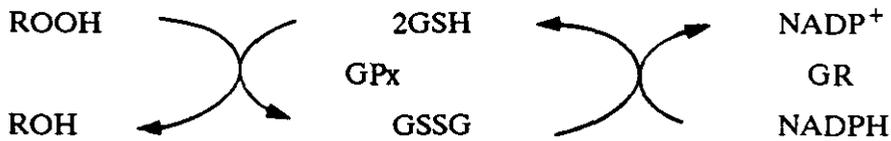
En la célula existe un conjunto de enzimas que eliminan  $H_2O_2$  por la vía peroxidativa. Estas peroxidasas se diferencian de la catalasa en que usan donadores de electrones específicos.

La glutatión peroxidasa (EC.1.11.1.9) se incluye dentro de este grupo de enzimas y es la de mayor poder protector. Esta enzima junto con la glutatión reductasa, que se encarga de regenerar el GSH a partir del GSSG, juegan un papel primordial en el metabolismo del peróxido de hidrógeno en las células animales.

La descomposición del  $H_2O_2$  se realiza según la siguiente reacción:



El  $AH_2$  es un sustrato que se oxida en el proceso. La glutatión peroxidasa es capaz de catalizar la reacción entre un hidroperóxido (ROOH) y el glutatión reducido.



La enzima es específica para el glutatión, pero no ocurre lo mismo con el peróxido. De esta forma la GPx puede catalizar la descomposición de sustancias citotóxicas como el  $H_2O_2$  y los hidroperóxidos orgánicos. Los datos parecen indicar una importante función de la enzima en ambos procesos (Halliwell, 1981).

La glutatión peroxidasa se encuentra en todos los vertebrados. Las plantas, microorganismos y algunos invertebrados, entre ellos los insectos y los oligoquetos, no presentan actividad GPx, pero suelen tener otras peroxidases (Smith y Shrift, 1979). Se trata de un tetrámero (76kDa) con cuatro átomos de selenio por molécula de enzima, unidos covalentemente en forma de selenio-cisteína (Flohé, 1982). Su localización es fundamentalmente citosólica, aunque también hay actividad en mitocondrias. En tejidos de mamífero, además de la glutatión peroxidasa que contiene selenio (Se dependiente), existe una segunda forma dimérica que no lo posee, con un peso molecular menor. Ambas pueden utilizar como sustrato peróxidos orgánicos, pero la no Se dependiente no puede descomponer el  $H_2O_2$  (Lawrence y Burk, 1976). La glutatión peroxidasa sin selenio corresponde a una actividad exhibida por varias glutatión transferasas. De esto se deduce la importancia del selenio, que además de ser fundamental para la actividad de la enzima (Bell *et al.*, 1986), parece implicado en el control de su síntesis (Takahashi *et al.*, 1986).

La GPx trabaja en la fracción soluble de la célula (citosol y matriz mitocondrial); no es capaz de entrar en la membrana, por lo que en ocasiones se ha puesto en duda su capacidad para eliminar los hidroperóxidos lipídicos. Pero se habla de una GPx citosólica que trabajaría en la interfase citosol-membrana, el llamado factor citosólico. Además, el grupo de Ursini ha aislado una GPx Se dependiente distinta de la citosólica, que sí actuaría sobre los hidroperóxidos de la membrana (Van Kuijk *et al.*, 1987).

La eliminación del peróxido de hidrógeno es un factor importante en la defensa frente a la toxicidad del  $O_2$ , pues además de que el  $H_2O_2$  sea tóxico *per se*, de esta forma disminuye el grado de generación de un radical altamente reactivo como es el  $OH^\cdot$  y para el que no existe ninguna enzima encargada de su neutralización en la célula. La glutatión peroxidasa tiene una  $K_M$  y una  $V_{max}$  por el  $H_2O_2$  bajas, lo que las hace idóneas para eliminar concentraciones pequeñas de  $H_2O_2$ .

Al igual que ocurre con otras enzimas antioxidantes, se han observado rápidas inducciones de la actividad glutatión peroxidasa acompañadas de incrementos de SOD y CAT en estudios de tolerancia a la hiperoxia con ratas recién nacidas (Stevens y Autor, 1980). En esta misma línea se encuentran los trabajos de Frank *et al.* (1980), que observaron cómo el pretratamiento de ratas adultas con endotoxina bacteriana tenía un efecto protector frente a la exposición a hiperoxia. Esta acción protectora era debida a que el tratamiento provocaba un aumento de las actividades SOD, CAT y GPx en el pulmón de estas ratas.

#### D. Glutatión Reductasas (GR)

La enzima glutatión reductasa (EC.1.6.4.2) se encarga de reducir el glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH), manteniendo de esta manera unos niveles GSH/GSSG altos en las células. Su papel antioxidante es realmente indirecto y lo ejerce a través de los niveles de GSH que, como veremos más adelante, resultan esenciales para la célula. Puesto que el "pool" de GSH es limitado y la elevación de la tasa GSSG/GSH es altamente tóxica para la célula, esta enzima es de vital importancia para el funcionamiento de la eliminación de  $H_2O_2$  por la vía de la GPx, así como para la reconstitución del GSH oxidado no enzimáticamente.



La GR es también capaz de catalizar la reducción de ciertos disulfuros mixtos, como por ejemplo entre el GSH y el coenzima A. El NADPH que requiere la GR como fuente de equivalentes de reducción, es aportado en la mayor parte de los tejidos animales

por la ruta metabólica conocida como vía de las pentosas. Por esta razón, se considera muchas veces a las enzimas de esta vía de las pentosas, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (productoras citosólicas de NADPH), como una segunda línea de defensa antioxidante.

La glutatión reductasa consta de dos subunidades de 50 kDa cada una, con la flavina FAD unida a su sitio activo y que es esencial para su funcionamiento pues actúa como coenzima. Aparentemente, lo que ocurre es que el NADPH reduce al FAD, que pasa sus electrones a un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína de la proteína. Los dos grupos -SH formados reaccionan posteriormente con el GSSG, reduciéndolo. Se obtienen de esta forma dos moléculas de GSH y se restaura el puente disulfuro de la proteína. Cada subunidad consta, por tanto, de tres dominios: uno de unión a FAD, otro de unión a NADPH y un dominio intermedio. Esta enzima está presente en el citosol y en las mitocondrias (Halliwell y Gutteridge, 1989).

#### **E. Otras peroxidasas**

Además de las glutatión peroxidasas existen otras muchas peroxidasas, presentes en organismos como las bacterias que carecen de las primeras. Entre ellas podemos citar la citocromo peroxidasa que se localiza en levaduras, entre la membrana interna y externa de la mitocondria y en algunas bacterias, la NADH peroxidasa que aparece en varias bacterias, la ascorbato peroxidasa de los cloroplastos de plantas superiores y de algunas algas verdes. Varias peroxidasas no específicas en plantas y bacterias son capaces de utilizar sustratos muy diversos. También se ha aislado alguna en tejidos animales como, por ejemplo la lactoperoxidasa encontrada en leche y saliva, la mieloperoxidasa de células fagocíticas, la peroxidasa tiroidea de la glándula tiroidea, o la peroxidasa uterina. Quizá la más estudiada de todas estas peroxidasas no específicas sea la peroxidasa de rábano.

#### **2.- Mecanismos no enzimáticos**

Existe un número creciente de sustancias de las que se describe una capacidad

antioxidante y que están presentes en el organismo. Sin embargo, en muchos casos las concentraciones necesarias para que esta actividad se muestre no se ajustan a las presentes en los tejidos o la función antioxidante se ha demostrado *in vitro* pero no *in vivo*. Por ello nos centraremos en los antioxidantes de bajo peso molecular cuya actividad *in vivo* está mejor establecida. Desde el punto de vista de la peroxidación lipídica de las membranas conviene distinguir a los antioxidantes hidrosolubles (sin accesibilidad a regiones profundas de la membrana), de los liposolubles.

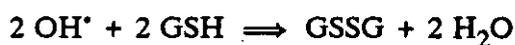
### A. Hidrosolubles

#### - Glutatión

El glutatión es un compuesto tiólico de bajo peso molecular y amplia distribución en los sistemas biológicos. En las células aerobias este tripéptido ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina), que se encuentra en concentraciones milimolares, protege frente al ataque oxidativo. Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiol de su cisteína. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzimáticas (como la de la GPx) o no enzimáticas. En los tejidos el glutatión se mantiene bajo su forma reducida, constituyendo la fuente más importante de poder reductor en la célula (Forman y Fisher, 1981). El glutatión en su estado reducido (GSH) resulta más accesible al  $O_2$  que los grupos -SH de ciertas enzimas, por lo que se oxida preferentemente dando lugar a su forma oxidada (GSS) que contiene un puente disulfuro.



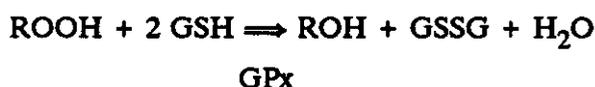
También puede reaccionar con enzimas con grupos tiólicos previamente oxidados, reduciéndolos. La reacción del GSH o de los grupos tiol de las enzimas con el oxígeno es lenta, pero su velocidad se incrementa al ser catalizada por metales de transición (Halliwell, 1981). El glutatión puede interaccionar con radicales como el radical superóxido, el radical hidroxilo y con cualquier molécula orgánica oxidada:



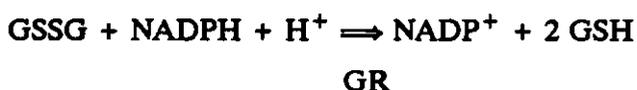
El glutatión, además, interacciona con el oxígeno en estado singlete, en lo que se denomina reacción de "extinción", devolviéndolo a su estado basal no reactivo o triplete:



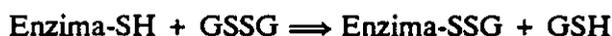
Es posible que para la célula las reacciones anteriores sean sólo parcialmente útiles, puesto que en ellas pueden formarse radicales libres derivados del glutatión ( $\text{GS}^{\bullet}$ ) potencialmente tóxicos. El GSH también contribuye a la eliminación en los organismos aerobios del peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos, catalizada por la glutatión peroxidasa:



El glutatión oxidado (GSSG) puede ser reconvertido a su forma reducida mediante la actividad glutatión reductasa dependiente de NADPH:



De esta forma se mantienen en la célula unos valores GSH/GSSG normalmente altos (Formán y Fisher, 1981). Además del efecto protector directo del glutatión, indirectamente contribuye al reciclaje de las vitaminas C y E (Jamieson *et al.*, 1986; Tirmenstein y Reed, 1989). Cuando las tensiones de oxígeno a las que está sometido un tejido son tan altas que la regeneración de GSH a partir de su forma oxidada o la producción de NADPH no son suficientes, la relación GSH/GSSG disminuye. En estos casos el GSSG puede inactivar ciertas enzimas formando disulfuros mixtos:



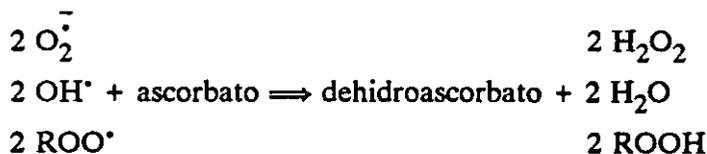
Como consecuencia de esto resultan inhibidas la síntesis de proteínas, la adenilato ciclasa y la fosforilasa fosfatasa. Se han podido detectar disulfuros mixtos del glutatión con otras enzimas celulares (Chance *et al.*, 1979). El GSSG resulta ser una sustancia altamente tóxica para las células y de ahí la importancia de mantener siempre una razón GSSG/GSH enormemente baja, mediante la reducción del GSSG por la GR o por la exportación activa del mismo a través de la membrana. Por esta razón se utiliza la medida de esta tasa GSSG/GSH como uno de los estimadores más fiables del grado de estrés oxidativo tisular. El caso del glutatión es un claro ejemplo de cómo un mecanismo protector puede convertirse en perjudicial cuando la tasa de generación de especies oxidantes es excesiva.

Cabe mencionar también la participación del glutatión en el metabolismo de xenobióticos. Estos procesos detoxificadores suelen incluir una primera fase de conjugación del compuesto de que se trate con el GSH mediante la actividad de enzimas glutatión-S-transferasas.

Hay que señalar que el glutatión no es esencial para todos los organismos aerobios. Algunas bacterias no lo poseen, aunque con frecuencia contienen otros compuestos tiólicos de función similar (Halliwell y Gutteridge, 1989).

#### **- Ácido ascórbico**

El ácido ascórbico (vitamina C) puede ser sintetizado por la mayoría de los animales y las plantas. Sin embargo, en algunas especies (cobaya, primates, etc.) incluido el hombre, no se sintetiza y es un elemento esencial de la dieta. Al ácido ascórbico se le ha asignado una función antioxidante en varias reacciones. Al oxidarse puede hacerlo perdiendo un electrón o dos, dando lugar a semidehidroascorbato (oxidación monoelectrónica) o dehidroascorbato (oxidación bielectrónica) respectivamente.



De esta forma puede reaccionar con los radicales superóxido, hidroxilo o peroxilo. Es necesario que posteriormente se vuelva a reducir para mantener así su capacidad antioxidante. Esto puede suceder no enzimáticamente por reacción con GSH o enzimáticamente mediante la NADH dehidroascorbato reductasa o la GSH-dehidroascorbato reductasa. Además, el ácido ascórbico también puede reaccionar con el oxígeno en estado singlete devolviéndolo al estado basal. Por tanto, el ácido ascórbico participa en la defensa antioxidante directamente, secuestrando especies activas de  $\text{O}_2$  e indirectamente, por su participación en la restauración del "pool" de vitamina E reducida (Forman y Fisher, 1981).

Sin embargo, paradójicamente, el ácido ascórbico en presencia de Fe(III) o Cu(II) puede promover la generación de especies de oxígeno activas ( $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que normalmente se encarga de eliminar. Esta actividad prooxidante deriva de su habilidad para reducir iones Fe(III) o Cu(II) a Fe(II) y Cu(I) y  $\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De esta forma, en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  da lugar al radical hidroxilo. El hecho de que bajo determinadas circunstancias el ácido ascórbico pueda ejercer esta actividad prooxidante hace que el efecto global de la vitamina C dependa de su concentración y, sobre todo, de la disponibilidad de trazas de iones metálicos. Será la relación ácido ascórbico Fe(II)/Fe(III) la que determine su función antioxidante o prooxidante (Niki, 1987; Stadtman, 1991). De todas formas, el efecto prooxidante del ascorbato se manifiesta sólo *in vitro*, careciendo de importancia *in vivo* en el individuo sano, en el que la concentración de Fe libre en las células es enormemente baja o nula.

#### - Ácido úrico

El ácido úrico es otro antioxidante importante. En los primates la ausencia de la enzima uricasa impide la degradación del ácido úrico hasta alantofina. Así, probablemente permite que este ácido úrico, a concentración elevada, reaccione con radicales como  $\text{OH}^{\cdot}$ ,

$\text{O}_2^-$  y  $\text{ROO}^\cdot$  dando lugar a  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{ROOH}$ . Su importante contribución a la actividad antioxidante en el caso particular del hombre se atribuye a su elevada concentración, que en algunos tejidos se acerca a la saturación. Además, el ácido úrico es un buen agente quelante, especialmente de  $\text{Fe}^{2+}$ , protegiendo así al ácido ascórbico de la oxidación por parte de iones Fe y Cu, y es un excelente extintor del oxígeno singlete. Dada la imposibilidad del ácido úrico para acceder y eliminar radicales dentro de la membrana, se propone que lo que hace es eliminar los radicales generados por el iniciador en la fase acuosa, al igual que parece que ocurre con el ácido ascórbico (Niki, 1987).

El ácido úrico, tras su reacción con el radical hidroxilo, puede generar radicales derivados que, aunque son menos reactivos, no son del todo inofensivos. Es otro ejemplo, como ocurre con el GSH o el ácido ascórbico, de que no son antioxidantes "perfectos" (Halliwell y Gutteridge, 1989).

A pesar de ser una sustancia que se suele asociar con situaciones patológicas por su tendencia a precipitar si se encuentra en el límite de saturación, como ocurre en el hombre, dentro de la teoría de los radicales libres como causa del envejecimiento, se ha sugerido incluso, que la gran longevidad de los primates y del hombre podría estar relacionada con la pérdida de la enzima que lo degrada y el aumento notable de su concentración tisular a lo largo de la evolución (Ames *et al.*, 1981).

#### - Otros

Incluimos aquí cualquier sustancia capaz de secuestrar iones metálicos cuyo papel en toda la serie de reacciones que median la toxicidad del oxígeno es fundamental. Entre éstas se encuentran proteínas como la transferrina, ferritina, hemosiderina y ceruloplasmina. Este secuestro no puede ser totalmente efectivo ya que los iones metálicos están siempre en tránsito entre sus lugares de almacenamiento y los de su utilización en la célula (Halliwell, 1981).

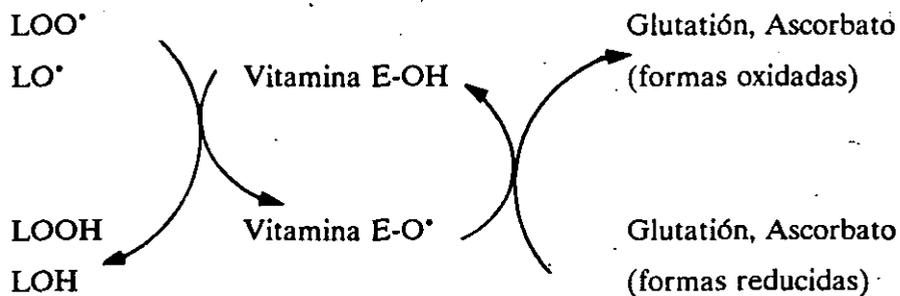
Existen muchas sustancias capaces de actuar como "quenchers" o extintores del  $\text{O}_2$  en estado singlete, entre ellas la molécula de agua, la histidina, el triptófano, cisteína,

tirosina, metionina y otros aminoácidos. El etanol por ejemplo, reacciona rápidamente con el  $\text{OH}^\bullet$ , aunque su concentración en un organismo no sea suficiente como para ser considerado una defensa útil. Muchos azúcares (manitol, glucosa, etc.) son también capaces de reaccionar con radicales hidroxilo al igual que el formaldehído (Forman y Fisher, 1981).

## B. Liposolubles

### - Vitamina E o $\alpha$ -tocoferol

La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol parece ser el principal antioxidante en las membranas celulares animales. Su nombre hace referencia a uno o varios de los compuestos fenólicos relacionados estructuralmente y conocidos como tocoferoles y tocotrienoles. Su actividad suele atribuirse al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol; es una molécula que es capaz de donar un protón. Este hecho, y su alta solubilidad en lípidos, le confiere su poder antioxidante, pues de esta manera puede acceder directamente a los grupos peroxil, que serían reducidos a hidroperóxidos y degradados hasta alcoholes estables por la vía de la GPx, frenando de esta forma la reacción en cadena que se produce en la fragmentación de los hidroperóxidos lipídicos.



La importancia fundamental de esta reacción es que impide la fase de propagaci6n multiplicativa, que es la principal causante del daño peroxidativo. Tambi6n es posible la reacci6n con radicales alcoxil, lo que sería útil en caso de que la degradaci6n de hidroperóxidos por la vía de la GPx no hubiese sido totalmente eficiente.

Los radicales tocoferilo generados pueden ser reducidos de nuevo por varios agentes, entre ellos el ácido ascórbico, generalmente presente en las células. Sin embargo, esta cesión electrónica debe ocurrir en la superficie de la membrana, en la interfase lipídica-citosólica, ya que el ácido ascórbico es una molécula polar que no puede penetrar en el interior hidrofóbico de la membrana. De esta forma se regenera el  $\alpha$ -tocoferol que puede actuar de nuevo (Halliwell, 1981). Esto va a ser vital, ya que el "pool" de vitamina E celular es pequeño y el sistema sólo es funcional si la forma reducida de la vitamina E se regenera a la misma velocidad con la que se degrada. Se plantea así la posibilidad de que ambas vitaminas C y E trabajen en tándem desde el punto de vista rédox. Esta posibilidad se ha demostrado *in vitro*, pero *in vivo* aun no ha sido aclarada.



Los efectos antioxidantes de las dos vitaminas pueden ser aditivos cuando los radicales son generados inicialmente en la fase acuosa, o sinérgicos cuando se generan en el interior de la membrana. Además del ácido ascórbico, el GSH y la cisteína también son capaces de regenerar el  $\alpha$ -tocoferol.

Se ha comprobado cómo ratas alimentadas con dietas deficientes en vitamina E son más susceptibles al ataque oxidativo, presentando incrementos en los niveles de peroxidación tisular (Doni *et al.*, 1984) y distrofia muscular. Por otro lado, el  $\alpha$ -tocoferol es un potente extintor del  $\text{O}_2$  en estado singlete por lo que puede impedir la iniciación o propagación de la peroxidación lipídica por parte de esta molécula. Aunque el radical hidroxilo y el superóxido pueden reaccionar *in vitro* con el  $\alpha$ -tocoferol no hay pruebas suficientes que indiquen que esto ocurra *in vivo* (Forman y Fisher, 1981).

Se ha sugerido también que la vitamina E podría ejercer su protección frente a la peroxidación lipídica modificando la estructura de la membrana, afectando al tipo de ácidos grasos que son incorporados y así, algunos autores hablan de una estabilización física de la membrana (Diplock, 1985).

### - Carotenoides

Los carotenoides presentes en los cloroplastos son de dos tipos fundamentalmente: carotenos y xantofilas, que son derivados oxigenados de los carotenos. Los  $\beta$ -carotenos son constituyentes importantes de las membranas de los cloroplastos y además se encuentran en algunas bacterias y hongos. Estos  $\beta$ -carotenos son efectivos extintores del  $O_2$  en estado singlete; pueden reaccionar con él previniendo la peroxidación lipídica. Esto se comprueba iluminando en atmósferas aerobias plantas deficientes en  $\beta$ -carotenos; se observa entonces cómo se degradan los cloroplastos por destrucción de las clorofilas y de las membranas. Si esta experiencia se repite en condiciones anaerobias (impidiendo de esta forma la generación de  $O_2$  en estado singlete) los daños observados son mucho menores. Además, los  $\beta$ -carotenos pueden absorber directamente la energía de las clorofilas excitadas impidiendo la formación del  $O_2$  en estado singlete (Halliwell, 1981).

Por otro lado, los  $\beta$ -carotenos también actúan como atrapadores de radicales. Son capaces de reaccionar con radicales alcoxil y peroxil, interrumpiendo así la reacción en cadena de la peroxidación lipídica.

Debido a su concentración y a la generación de cantidades importantes de  $O_2$  singlete a nivel de los cloroplastos, son vitales para el mantenimiento de las membranas de los tilacoides en las plantas. En los animales, en los que su concentración es mucho menor, su función antioxidante natural es menos clara. De todas formas, se ha propuesto que la ingestión de  $\beta$ -caroteno en el hombre podría suponer cierta protección contra el desarrollo e incidencia de enfermedades como el cáncer o la arterioesclerosis. Además, el hecho de que la molécula de  $\beta$ -caroteno esté compuesta por dos moléculas de vitamina A ha estimulado también investigaciones sobre el posible papel antioxidante del retinol (Niki, 1987; Halliwell y Gutteridge, 1989).

### - Otros

En este grupo de defensas liposolubles hay que incluir a los estrógenos (estradiol, estriol, estrona), cuyo papel antioxidante está siendo objeto de estudio

últimamente (Sugioka *et al.*, 1987). Como era de esperar por su estructura, la testosterona tiene una escasa actividad antioxidante. Siguiendo el razonamiento realizado para el ácido úrico, se podría también especular que la mayor longevidad de las hembras de muchos vertebrados, incluido el hombre, podría estar relacionada con este papel antioxidante diferencial de los estrógenos respecto a la testosterona.

También se ha comprobado recientemente que la bilirrubina puede funcionar como antioxidante (Niki, 1987). Por último, señalar que existen otros antioxidantes naturales y también sintéticos que están siendo objeto de estudio.

### **3.- Protección mediante secuestro de iones metálicos**

La importancia del Fe y otros metales en sistemas biológicos se demuestra por su presencia en gran cantidad de proteínas que requieren estos metales de transición para su actividad. A lo largo de esta introducción también se ha puesto de manifiesto el papel fundamental que juegan estos metales de transición en la generación de radicales y por tanto, de daño oxidativo. Describiremos ahora algunos de los mecanismos que se han desarrollado para mantener estos metales ligados y la importancia biológica de este "secuestro".

En organismos multicelulares el transporte de Fe está asegurado por la proteína plasmática transferrina. Se trata de una glicoproteína con dos sitios de unión para Fe(III). Normalmente sólo está cargada al 30%, lo que asegura la ausencia de Fe libre en el torrente sanguíneo. Otra proteína similar a la transferrina es la lactoferrina, que aparece en varios fluidos del cuerpo y en la leche.

El Fe transportado por la transferrina debe entrar en la célula para poder ser utilizado. Este proceso se lleva a cabo vía receptores específicos. Tras la unión al receptor, el complejo es internalizado mediante un proceso de endocitosis. La acidificación permite la liberación del Fe, que pasa al citoplasma celular, mientras que el complejo receptor-apotransferrina es reciclado a la membrana plasmática. La apotransferrina, en contacto con

el fluido extracelular, de pH neutro o ligeramente alcalino, perderá afinidad por su receptor y será liberada de nuevo a la circulación para ser reutilizada.

El Fe que no es inmediatamente utilizado por la célula pasa a almacenarse en compuestos intracelulares cuyo prototipo es la ferritina. Esta, rara vez llega a saturarse *in vivo* y evita de esta forma la acumulación de Fe no ligado a proteínas en la célula. La deposición de Fe(II) en el interior de la ferritina implica su oxidación a Fe(III). El Fe puede ser liberado por la acción de quelantes de Fe(III) o de Fe(II) en presencia de agentes reductores y esto ocurre más fácilmente a pH ácido (Halliwell y Gutteridge, 1984; Crichton, 1987).

Además de la ferritina, existe otra importante proteína almacenadora de Fe, la hemosiderina. Se forma por modificación lisosómica de la ferritina. En tejidos normales la ferritina almacena la mayor parte del Fe y sólo una pequeña parte se encuentra como depósitos de hemosiderina. Sin embargo, en condiciones de exceso de Fe puede llegar a ser predominante. El pH ácido favorece la liberación de Fe por parte de esta proteína, lo que en situaciones como la inflamación o la hipoxia la convierten en una posible fuente de Fe, implicándola en la producción de radicales y el daño tisular (Ozaki *et al.*, 1988).

Existe un pequeño "pool" de Fe no ligado a proteínas en tránsito desde los lugares de almacenamiento, en los que abunda, a los de utilización, donde es requerido; pero diversos mecanismos se encargan de que éste sea lo más pequeño posible.

En cuanto al Cu, se encuentra unido a la proteína sérica albúmina, en equilibrio con complejos de Cu. En el hígado el Cu se incorpora a la proteína ceruloplasmina, y ligado de esta forma es liberado a la circulación. La ceruloplasmina además tiene propiedades antioxidantes, pues es capaz de oxidar el Fe(II) a Fe(III). La mayor parte del Cu plasmático se encuentra unido a esta glicoproteína y el resto se une a albúmina, histidina y pequeños péptidos. La ceruloplasmina no libera Cu fácilmente y parece ser necesaria su degradación para que el cobre quede libre. No parece que en condiciones fisiológicas los iones Cu den lugar a la formación de radicales, debido a las altas concentraciones de proteínas y de albúmina, pues en caso de encontrarse libres se unirían rápidamente a ellas; pero siempre

---

cabe el daño en un lugar específico de la macromolécula antes de ser "secuestrados".

Además de todas estas proteínas, también otras moléculas como el ácido ascórbico y el úrico son capaces de unir iones Fe y Cu, impidiendo su participación en la producción de radicales (Halliwell y Gutteridge, 1989; Stadtman, 1991).

De todos estos datos se desprende que los organismos han evolucionado intentando minimizar en la medida de lo posible la cantidad de iones metálicos disponibles de forma libre.

#### **4.- Sistemas reparadores**

Incluimos aquí lo que podríamos llamar una segunda línea de defensa contra el daño oxidativo. La mayor parte de los antioxidantes anteriormente descritos, intentan eliminar los radicales antes de que se produzca el daño y podrían considerarse como la primera línea de defensa antioxidante. La segunda línea se encargará de eliminar el daño una vez producido. Ya hemos citado los mecanismos que intentan reparar los problemas generados por la peroxidación lipídica y ahora nos centraremos en los sistemas de reparación del daño al DNA y proteínas.

En el caso del DNA, por su vital importancia, existen varios niveles de defensa. En primer lugar, el DNA nuclear está compartimentalizado en el núcleo lejos de mitocondrias y peroxisomas donde son generados gran cantidad de radicales. Además, la mayor parte del DNA que no se está replicando se encuentra rodeado por histonas y poliaminas que lo protegen de los radicales, y la propia estructura de doble hélice deja las bases más reactivas menos accesibles a los agentes oxidantes. Por último, la mayoría de las alteraciones que se producen en el DNA como consecuencia del ataque oxidativo son eliminadas por eficaces sistemas de reparación enzimáticos.

Se tienen evidencias de que existen varias enzimas procariotas y eucariotas capaces de reparar el daño oxidativo sobre el DNA por mecanismos directos y por escisión. Algunas exo y endonucleasas reparan preferentemente el DNA oxidado. Entre estas

---

enzimas reparadoras de daño oxidativo en procariotas destaca la endonucleasa III. En eucariotas los estudios están más atrasados; sin embargo parece existir cierto paralelismo con lo descubierto en procariotas. Se han caracterizado varias glicosilasas que actúan sobre productos de oxidación del DNA. También se ha aislado una endonucleasa de mamíferos muy parecida a la endonucleasa III bacteriana. Se ha propuesto el término "redoxiendonucleasas" para designar a todas estas endonucleasas que intervienen en la reparación del DNA oxidado (Pacifi y Davies, 1991).

Además de los mecanismos de reparación por escisión, puede existir reparación directa de bases alteradas del DNA por oxidación. Se han descrito glutatión transferasas y peroxidasas que utilizan hidroperóxidos de timidina como sustratos (Ketterer y Meyer, 1989).

Se ha sugerido que el daño oxidativo podría ser un mecanismo por el cual las células controlarían la degradación de determinadas proteínas, pues se ha comprobado que la oxidación da lugar a un importante incremento de la susceptibilidad a la proteólisis. La oxidación en residuos de aminoácidos discretos serviría de marcador para los sistemas proteolíticos. Hoy se sabe que se trata de sistemas proteolíticos no dependientes de ATP ni de Ca para los que se ha propuesto el nombre de macroxiproteinasa (M.O.P.). Se trata de un gran complejo de unos 670 kDa, cuyo sustrato preferente son proteínas modificadas por oxidación. El complejo es inhibido por compuestos con grupos sulfhidrilos y serinas y por quelantes de metales de transición. Su pH óptimo está dentro del rango alcalino (7,8). Parece tener sitios catalíticos múltiples (al menos tres) y estar formado por 8 subunidades polipeptídicas distintas. Todas estas características han llevado a identificar este complejo con los complejos de proteinasas neutras/alcalinas que habían sido aisladas en una gran variedad de células eucariotas y de las que no se conocía una función clara. Se propone que estos sistemas habrían sido diseñados en la evolución para eliminar proteínas oxidadas (Pacifi *et al.*, 1989; Pacifi y Davies, 1991).

Este tipo de sistemas proteolíticos han sido encontrados también en la matriz mitocondrial (Marcillat *et al.*, 1988) y algunos autores proponen un descenso de actividad proteolítica con la edad, lo que supondría una acumulación de proteínas oxidadas (Starke-

Reed y Oliver, 1989).

## **VII. TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES Y ENVEJECIMIENTO**

La teoría de los radicales libres como causa fundamental del envejecimiento fue propuesta por primera vez por Denham Harman en 1956, aunque ya Rebeca Gerschman había apuntado, cómo una pequeña ineficacia de los sistemas antioxidantes podía ser un factor importante en el fenómeno de envejecimiento (Gerschman *et al.*, 1954). Harman postula que el envejecimiento se debe al daño que los radicales libres del oxígeno producen en los tejidos. Estos radicales son generados durante el metabolismo aerobio normal. Se calcula que entre un 1-7% del flujo de oxígeno (probablemente alrededor de un 1% en condiciones normales), a través de la cadena respiratoria, da lugar a la formación de radicales libres que pueden ser considerados como "escapes". La pequeña proporción de estos radicales que no sea eliminada por las defensas antioxidantes, cuya eficacia no es del 100%, puede dañar los componentes celulares. Este daño será lento pero constante y se acumulará con la edad.

El hecho de que los radicales se generen en las células aerobias como un producto secundario de la reducción del oxígeno en la mitocondria, es el nexo de unión entre la teoría de radicales libres y las de "tasa de vida".

La correlación inversa entre longevidad máxima y tasa metabólica es quizá uno de los principales apoyos de la teoría de radicales como explicación del envejecimiento, como pone de manifiesto Cutler en varios de sus trabajos (Cutler, 1984; Cutler, 1991). Se entiende por longevidad máxima, la longevidad del último individuo en morir de una especie, aunque algunos autores utilicen el último 10% de la población. La longevidad media es la media de las longevidades de los individuos de una especie. El producto de la longevidad máxima (LSP o MLSP) por la tasa metabólica basal (SMR) es un producto bastante constante para muchas especies y se denomina potencial energético vital (LEP). Incidiendo sobre este punto se han realizado trabajos en los que se modifica el metabolismo basal. De esta forma se sabe que situaciones que producen un aumento de la tasa metabólica como pueden ser aumentos de temperatura o, al menos en dípteros el ejercicio

aceleran la tasa de envejecimiento y aumentan la concentración de productos de oxidación como n-pentano, sustancias TBA positivas, GSSG, etc. La relación con los radicales es obvia, a mayor metabolismo mayor generación de especies activas de  $O_2$  y por tanto mayor daño oxidativo (Miquel *et al.*, 1976; Buchan y Sohal, 1981; Sohal y Buchan, 1981). Sin embargo, la relación longevidad máxima-radicales libres no está tan clara.

Lo que si se ha comprobado es que la administración de antioxidantes como la vitamina E, en dosis adecuadas, suele aumentar la vida media en nematodos, moscas, ratas y ratones, produciéndose una rectangularización de las curvas de supervivencia. Sin embargo, algunos autores discuten estos resultados en roedores y mantienen que ésto sólo es así en el caso de animales singénicos, pero no en cepas salvajes.

Por otro lado, sería importante poder medir las concentraciones reales de estas especies activas de oxígeno, sin embargo esto no es fácil debido a su baja concentración *in vivo* y su corta vida media. El que la tasa de generación de radicales aumente con la edad o disminuya el nivel de defensas antioxidantes no es necesario para dar validez a esta teoría, aunque si así fuese, sería otro dato a favor.

En este sentido hay que destacar los trabajos del grupo de Sohal que, utilizando siempre insectos como material biológico, han demostrado cómo con la edad se producen incrementos en los niveles de n-pentano, así como de sustancias TBA positivas (Sohal *et al.*, 1985) y glutatión oxidado (Sohal *et al.*, 1983) al mismo tiempo que se observan descensos de las defensas antioxidantes tanto enzimáticas como no enzimáticas (Sohal *et al.*, 1983).

Sin embargo, en trabajos más recientes, realizados en mamíferos, no obtienen resultados similares y los patrones de descenso con la edad no son tan claros (Barja de Quiroga *et al.*, 1990a; Pérez *et al.*, 1991; Sohal *et al.*, 1990c; Barja de Quiroga *et al.*, 1992). Se han descrito en cambio incrementos en la generación de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot}$  con la edad tanto en insectos (Sohal y Sohal, 1991) como en mamíferos (Sohal *et al.*, 1990d) y la correlación inversa entre longevidad máxima y generación de especies activas de  $O_2$  (Sohal *et al.*, 1990c).

---

Otros trabajos muestran un descenso de la generación de radical superóxido y peróxido de hidrógeno en mitocondrias desde el adulto al individuo viejo (Floyd *et al.*, 1984; Muscari *et al.*, 1990; LeBel y Bondy, 1991). Por otra parte, si los radicales libres están directamente implicados en el envejecimiento, podemos esperar que especies con mayor longevidad máxima tengan niveles superiores de defensas antioxidantes. En esta dirección apuntan los trabajos de Cutler, que muestran como los niveles de la enzima antioxidante SOD correlacionan positivamente con la longevidad máxima de distintas especies. Cutler además ha encontrado correlaciones positivas entre longevidad máxima y concentraciones de ácido úrico, carotenoides,  $\alpha$ -tocoferol y ceruloplasmina aunque sólo hay correlación cuando los resultados se dividen por el consumo de oxígeno basal del animal completo. La resistencia a la autooxidación es otro parámetro que correlaciona positivamente con la longevidad, mientras que los niveles de sustancias TBA-positivas muestran una correlación inversa (Cutler, 1984; Cutler, 1986).

Sin embargo, antioxidantes tan importantes como la glutatión peroxidasa, el glutatión o las glutatión transferasas no correlacionan ni siquiera referidos a consumo de oxígeno, como se ha comprobado recientemente, reafirmando esta disparidad de patrones (Sohal *et al.*, 1990b). Por otro lado existen datos que demuestran cómo dentro de una misma especie, cohortes más longevas de moscas están asociadas a niveles más altos de antioxidantes y menores de productos de reacciones de radicales (Sohal *et al.*, 1986).

A la vista de estos datos Cutler, defensor de los radicales libres como explicación del envejecimiento, propone lo que él denomina hipótesis de envejecimiento por desdiferenciación y determinantes de longevidad. Los radicales libres, por acción sobre el aparato genético celular, provocarían una regulación de los genes inadecuada, alterando el estado de diferenciación celular. Por tanto, el envejecimiento es el resultado de una falta natural de estabilidad de la regulación genética y la longevidad será fruto de procesos que estabilicen la expresión correcta de los genes y, en definitiva, el estado de diferenciación celular. Los antioxidantes serían entonces considerados como determinantes de longevidad (Cutler, 1991).

---

Entre las críticas que recibe la teoría de los radicales como explicación del envejecimiento se encuentra el hecho de que en muchas ocasiones, la administración de antioxidantes exógenos no ha conseguido aumentar la longevidad. A este respecto se puede añadir que la administración de antioxidantes no siempre significa que éstos lleguen al lugar de generación de radicales y por tanto donde se produce el daño, ni que consigan disminuir la concentración de radicales. Además, hoy se acepta que los antioxidantes endógenos se encuentran bajo control homeostático, por lo que incrementos de un antioxidante serían compensados con descensos de otro (Cutler, 1984).

Cuando se comprobó que las dietas de restricción calórica conseguían aumentar la longevidad máxima, pero no provocaban un descenso del metabolismo, se consideró como una nueva contradicción de la teoría de radicales. Sin embargo, se ha constatado que ratas sometidas a dietas de restricción calórica presentan en determinados órganos actividades de SOD y CAT superiores a las de animales alimentados *ad libitum*. Cabe señalar a este respecto la pregunta que se hacen hoy en día muchos investigadores sobre si la restricción calórica es o no es un buen modelo para el estudio del envejecimiento. Quizá los animales restringidos sean el control y estemos estudiando el efecto de la sobrealimentación acortando la esperanza de vida.

Matizando un poco esta explicación del envejecimiento debido al daño que causan los radicales, Miquel y sus colaboradores han propuesto una teoría que atribuye el envejecimiento a la inactivación del genoma mitocondrial de células diferenciadas.

El genoma mitocondrial sería el blanco principal del ataque de los radicales más que las biomembranas. Su síntesis tiene lugar en la membrana interna mitocondrial muy cerca de los lugares de generación de especies activas de oxígeno y de sus productos como son los hidroperóxidos y el MDA. Este hecho junto con el dato de que el genoma mitocondrial, a diferencia del nuclear, carece de la protección de las histonas y de adecuados mecanismos de reparación le hace especialmente vulnerable. Se trata además de un genoma muy comprimido y sintético que prácticamente carece de secuencias que no codifiquen por lo que las mutaciones de éste resultarían muy peligrosas.

---

El genoma mitocondrial controla la síntesis de varias proteínas hidrofóbicas de la membrana interna y es necesario para la división de la mitocondria, por esta razón la mutación o inactivación del mtDNA impedirá una replicación normal de estos orgánulos y dará lugar a un descenso en la producción de ATP. Este proceso afectará fundamentalmente a las células diferenciadas, por su elevado consumo de oxígeno y será el responsable de la pérdida de capacidad para desarrollar las funciones fisiológicas (Miquel y Fleming, 1984; Miquel, 1991).

Fueron también Miquel y sus colaboradores los primeros en demostrar que las células postmitóticas de los insectos acumulan lipofuscina con la edad (Miquel *et al.*, 1977). La lipofuscina es uno de los biomarcadores de envejecimiento más universalmente aceptado. Sin embargo, su significado no acaba de estar claro.

Su formación se ha investigado mediante estudios morfológico-citoquímicos y bioquímicos. La lipofuscina tiene su origen en un proceso de autofagocitosis en el que están implicados lisosomas. La fusión de vacuolas autofágicas con lisosomas primarios y secundarios es seguida de degradación y digestión por parte de enzimas hidrolíticas. Los residuos sin digerir se denominan lipofuscina. Bioquímicamente se implica a bases de Schiff conjugadas como responsables de la fluorescencia de los gránulos de lipofuscina y también se habla de peroxidación de lípidos y puentes cruzados entre distinto tipo de macrobiomoléculas.

Se sabe que la acumulación de lipofuscina está directamente correlacionada con la tasa metabólica (Sohal y Donato, 1979; Lyman *et al.*, 1981; Papafrangos y Lyman, 1982) y también que aumenta con la edad. Lo que no está tan claro, pues no hay evidencias directas *in vivo*, es la relación radicales libres-lipofuscina, aunque existen algunos trabajos que así lo manifiestan (Thaw *et al.*, 1984).

En resumen, muchas de las evidencias que ligan a los radicales libres con el proceso de envejecimiento son circunstanciales. Sin embargo, tampoco existen pruebas que contradigan su posible implicación.

## **OBJETIVOS**

Las evidencias disponibles que apoyan la teoría de los radicales libres como causa fundamental del envejecimiento son de carácter circunstancial. Algunas provienen de estudios descriptivos que comparan niveles basales de parámetros relacionados con los radicales, como antioxidantes o productos de peroxidación, en distintas especies, con diferentes longevidades máximas y tasas metabólicas (Sohal *et al.*, 1990c; Cutler, 1991).

Pero la mayor parte son el resultado de trabajos que comparan estos mismos niveles basales en animales jóvenes y viejos, observando el efecto de la edad. En este sentido no existen patrones claros de variaciones y se han descrito aumentos, descensos y ausencia de cambios en los niveles de antioxidantes (Barja de Quiroga *et al.*, 1990a; Barja de Quiroga *et al.*, 1992).

Sin embargo, un descenso de la capacidad antioxidante con la edad no es necesario para validar esta teoría y sólo supondría una aceleración de la tasa de envejecimiento, caso de ser cierto. El postulado central de la teoría de los radicales libres es que las defensas antioxidantes no tienen una eficacia del 100% y la presencia continua de bajas concentraciones de radicales en los tejidos es la causante del fenómeno de envejecimiento en todas las edades, desde el adulto joven al animal envejecido.

Una tercera aproximación al problema son los estudios experimentales que analizan los efectos sobre la longevidad, de manipulaciones de antioxidantes endógenos a lo largo del ciclo de vida del organismo. Los trabajos de este tipo son muy escasos debido a las dificultades que plantean dada la necesidad de un elevado número de animales para elaborar las curvas de supervivencia y la larga duración de los experimentos. Además, los pocos realizados hasta la fecha en relación con los radicales libres han tenido como objeto a los insectos (animales con una elevadísima respiración basal), usando además, homogenados de animal completo (Sohal *et al.*, 1984) con los consiguientes problemas que éste plantea a la hora de valorar los resultados.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, y en un intento de contribuir a aclarar el posible papel de los radicales en el fenómeno de envejecimiento, acercándonos a los vertebrados, nos planteamos este trabajo con una doble aproximación, descriptiva y experimental, a largo plazo.

La especie elegida, *Rana perezi*, reúne una serie de requisitos que la hacen especialmente interesante. La mayor parte de los trabajos en este campo han sido realizados en insectos y roedores, que tienen tasas de consumo de oxígeno muy elevadas (10-100 veces la del hombre) y una longevidad máxima bastante corta. *R. perezi* tiene una longevidad máxima de siete años, que casi duplica la de los roedores de laboratorio y por otro lado, un consumo de oxígeno de uno a dos órdenes de magnitud inferior al de roedores e insectos y bastante similar al de mamíferos de tamaño medio como el hombre.

Diseñamos el experimento de forma que durante los tres años de duración cubriésemos todo el periodo de envejecimiento de esta especie, desde el individuo adulto maduro de dos años hasta los siete años, longevidad máxima de *R. perezi*.

Partiendo de animales jóvenes y viejos, a lo largo de estos tres años, nos propusimos comprobar el efecto de la edad sobre los distintos sistemas antioxidantes. Esto nos permitiría aclarar si estas defensas antioxidantes disminuyen o no. En segundo lugar y como aproximación experimental, nos propusimos inhibir una de las principales enzimas antioxidantes, la catalasa, para comprobar de esta forma el efecto de la manipulación de un antioxidante sobre la longevidad. Por estudios previos sabíamos que el tratamiento con 3-amino-1,2,4-triazol es un modelo experimental con el que se consiguen animales casi totalmente deficientes en catalasa en todos los tejidos estudiados (Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a) con muy buena tolerancia, al menos a medio plazo.

La medida de un elevado número de antioxidantes se diseñó para comprobar la supuesta capacidad compensatoria entre defensas antioxidantes (Cutler, 1984), así como para evitar la ausencia de detección de cambios de algún antioxidante endógeno importante no incluido en el estudio. Además, se valoraron la actividad citocromo c oxidasa y el consumo de oxígeno del animal completo como controles de capacidad aeróbica máxima

---

y basal, la peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (test del TBA) y los niveles de malondialdehído "verdadero" por HPLC.

Por último, el estudio se ha realizado en cuatro órganos cuya elección ha obedecido a distintos criterios. El hígado y el riñón son dos de los tejidos que muestran mayor tasa de generación de radicales en condiciones normales *in vivo*. El pulmón es el órgano vital expuesto a tensiones de oxígeno más elevadas *in vivo* y sufre importantes cambios con la edad (Thibeault *et al.*, 1990); además, son muy pocos los trabajos sobre este tema en dicho órgano. Y en cuanto al cerebro, éste ha sido elegido anteriormente como órgano central para poner a prueba esta teoría por su carácter post-mitótico, por los importantes cambios que experimenta con la edad y por su papel regulador en relación con todo el organismo. Pero además, presenta otras características adicionales como son su elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados (muy sensibles al ataque oxidativo), la abundancia de sistemas generadores de radicales (catabolismo de neurotransmisores, abundancia de hierro) y sus bajos niveles de antioxidantes endógenos en comparación con otros órganos.

## **MATERIALES Y METODOS**

## **I. DISEÑO EXPERIMENTAL**

En el diseño experimental de este trabajo tuvimos en cuenta dos factores simultáneamente, la edad y el tratamiento con inhibidores de sistemas antioxidantes endógenos.

De los 529 animales adultos de *Rana perezii* capturados en la naturaleza y tras la determinación de la edad individual, se constituyeron dos grupos de 110 animales cada uno: jóvenes (2 años de edad) y viejos (4 y 5 años de edad). Ambos grupos se dividieron a su vez en dos subgrupos de 55 animales cada uno, controles y tratados con inhibidores de enzimas antioxidantes. El resto de los animales fue descartado.

En estos cuatro grupos experimentales se valoraron los siguientes parámetros:

- Peso de animales y órganos.
- Medida del consumo de oxígeno del animal completo.
- Actividad citocromo c oxidasa.
- Actividades de enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.
- Concentración de proteínas.
- Peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* y MDA.
- Sistema del glutatión GSSG y GSH.
- Acido ascórbico.

Estas valoraciones se realizaron en hígado, pulmones, riñones y cerebro. Además, se llevó a cabo un estudio a microscopía óptica de la glándula tiroidea y a microscopía electrónica de la corteza cerebral. Por último, se calculó la tasa de supervivencia a lo largo de todo el periodo experimental.

Las medidas se repitieron durante tres años consecutivos 1989, 1990 y 1991. De este modo obtuvimos los siguientes grupos de trabajo:

	1989 (2,5 meses)	1990 (14,5 meses)	1991 (26,5 meses)
JOVENES (110 animales)	CONTR. (8) TRAT. (8)	CONTR. (6) TRAT. (6)	CONTR. (6) TRAT. (6)
VIEJAS (110 animales)	CONTR. (8) TRAT. (8)	CONTR. (6) TRAT. (6)	CONTR. (6) TRAT. (6)

4 MESES  
FASE ACLIMATACION

33 MESES  
FASE EXPERIMENTAL

Entre paréntesis aparece el número de animales sacrificados cada año para las valoraciones bioquímicas. El resto de los animales fue utilizado para elaborar las curvas de supervivencia.

## II. MATERIALES

### 1.- Productos

- Acetonitrilo (Scharlau)
- Acido ascórbico (Merck)
- Acido clorhídrico (Merck)
- Acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (Sigma)
- Acido nítrico (Panreac)
- Acido ortofosfórico (Merck)
- Acido perclórico (Merck)
- Acido sulfúrico (Panreac)
- Acido 2-tiobarbitúrico (Sigma)
- Acido tricloroacético (Panreac)
- Albúmina bovina (Sigma)
- Aminotriazol (3-amino-1,2,4-triazol) (Sigma)
- Azida sódica (Sigma)
- Bromuro de miristiltrimetilamonio (Aldrich)
- Butilhidroxitolueno (Sigma)
- Carbonato sódico (Merck)
- Cianuro potásico (Merck)
- Cloruro de manganeso (Sigma)
- Cloruro sódico (Panreac)
- EDTA Na<sub>2</sub> (Sigma)
- Etanol (Panreac)
- Ferricianuro potásico (Sigma)
- Ferrocitocromo C (Sigma)
- Filtros de muestras MFS-3, diámetro de poro 0,5 µm y 0,45 µm (MFS)
- Fosfato bipotásico (Panreac)
- Fosfato monopotásico (Panreac)
- Fosfato monosódico (Merck)

- 
- Glicerol-gelatina (Merck)
  - Glutaraldehído
  - Glutati3n oxidado (Sigma)
  - Glutati3n reducido (Sigma)
  - Glutati3n reductasa tipo III de levadura (Sigma)
  - Hematoxilina Ehrlich (Merck)
  - Hidroper3xido de cumeno (Sigma)
  - Hidr3xido pot3sico (Panreac)
  - Hidr3xido s3dico (Merck)
  - Lubrol (Sigma)
  - Malondialdehído (Merck)
  - Membrana de di3lisis Servapor, di3metro de poro 6 mm (Serva)
  - Mercaptoetanol (Sigma)
  - Metanol (Scharlau)
  - NADH (Sigma)
  - NADPH (Boehringer)
  - N-butanol (Sigma, Merck)
  - Nitr3geno-R (SEO)
  - Per3xido de hidr3geno (Merck)
  - Reactivo de Folin-Ciocalteau (Panreac)
  - Sodio fosfato secundario (Scharlau)
  - Sulfato de cobre (Probus)
  - Sulfato de hierro (Panreac)
  - Super3xido dismutasa (Sigma)
  - Tartrato s3dico-pot3sico (Merck)
  - Tris (Merck)
  - Triton-X-100 (Sigma)
  - Vinilpiridina (Aldrich)

**2.- Equipo instrumental**

- Agitador Vórtex HEIDOLPH reax 1D
- Balanzas de precisión SAUTER 404 y SARTORIUS
- Baño termostatzado con agitación GRANT INSTRUMENTS SS 30 A-13838
- Bomba para HPLC GILSON 305 con módulo manométrico 805
- Centrífuga refrigerada KONTRON Hermle ZK 365
- Centrífuga refrigerada SORVALL INSTRUMENTS RC5C
- Colorímetro ATOM Data-test atom 366
- Detector multigas DRÄGER para CO<sub>2</sub>
- Detector UV GILSON 115 de longitud de onda variable
- Electrodo de oxígeno EIL-1521
- Espectrofotómetro MILTON ROY spectronic 1201 y 601
- Homogeneizador mecánico WHEATON INSTRUMENTS
- Homogeneizadores tipo POBEL
- Incubador con agitación DUBNOFF PRECISION SCIENTIFIC
- Integrador MILTON ROY CI-4100
- Inyector para HPLC RHEODYNE (7125)
- Medidor de oxígeno EIL-1520
- Microscopio electrónico ZEISS EM 902
- Microtomo de congelación
- Multiagitador magnético con placa térmica SBS A-08
- Pipetas automáticas GILSON, KARTELL y VARI
- pH/mV-metro CRISON D-501 13145
- Sonicador VIBRA CELL SONICS MATERIALS
- Termostatzador con agitación B. BRAUN 3656 Y P SELECTA tectron 3000543
- Ultramicrotomo REICHERT-JUNG ULTRACUT E

### 3.- Animales de experimentación

Para la realización de este trabajo se han utilizado individuos adultos de ambos sexos de la especie *Rana perezi* (Seoane, 1885).

Esta especie pertenece a la Clase Anuros, Orden Euanuros y Familia Ránidos de la cual se conocen especies fósiles desde el Mioceno. Se incluye dentro del conjunto denominado como "ranas verdes" de Europa y Norte de Africa, en el que figuran entre otras: *Rana ridibunda* (Pallas, 1771), *Rana esculenta* (Linneo, 1758), *Rana saharica* (Boulenger, 1917), *Rana lessonae* etc. Estas especies resultan difíciles de distinguir, por lo que ha habido problemas sistemáticos. Por esta razón, la *Rana perezi* fue considerada durante mucho tiempo como una subespecie de *Rana ridibunda*. Hoy, gracias al empleo de técnicas electroforéticas e inmunológicas (Tunner y Uzzel, 1974; Uzzel, 1982) se ha aceptado su validez específica como *Rana perezi*, siguiendo la denominación original de López Seoane a partir de ejemplares descritos en La Coruña.

Los animales utilizados en este trabajo fueron capturados en Pontevedra (Galicia) durante el verano de 1988. Desde ese momento se mantuvieron en el laboratorio, en acuaterrarios de 16560 cm<sup>3</sup> (23x48x15 cm), con agua desclorada que se renovaba completamente dos veces por semana.

Se controlaron la temperatura ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), el fotoperiodo (12:12), la humedad relativa ( $80 \pm 5\%$ ) y la presión atmosférica ( $710 \pm 20$  mmHg).

Los animales fueron alimentados dos veces por semana con larvas de mosca *Protophormia terranova*. Además, y como suplemento de esta dieta, se les suministró alternativamente hígado de pollo y un complejo vitamínico una vez al mes. La composición por cada 1,3 g de este complejo vitamínico mineral era la siguiente:

- Vitamina A 1500 UI
- Vitamina D<sub>3</sub> 400 UI

- 
- Vitamina E 30 UI
  - Vitamina C 150 mg
  - Nicotinamida 30 mg
  - Vitamina B<sub>1</sub> 10 mg
  - Vitamina B<sub>6</sub> 6 mg
  - Vitamina B<sub>2</sub> 5 mg
  - Vitamina B<sub>12</sub> 12 µg
  - Acido pantoténico 15 mg
  - Acido fólico 0,4 mg
  - Magnesio 100 mg
  - Hierro 18 mg
  - Potasio 5 mg
  - Iodo 0,15 mg
  - Zinc 15 mg
  - Cobre 2 mg
  - Molibdeno 0,2 mg
  - Manganeso 1 mg
  - Calcio 45 mg
  - Fósforo 35 mg
  - Biotina 45 µg
  - Inositol 50 mg
  - Excipiente: lactosa, otros excipientes.

Se suministraron 35,5 mg de este complejo vitamínico por rana, cada dos meses, lo que supone el mantenimiento de los requerimientos mínimos, no una suplementación vitamínica.

El peso de los animales se controló trimestralmente durante todo el periodo experimental.

### III. MÉTODOS

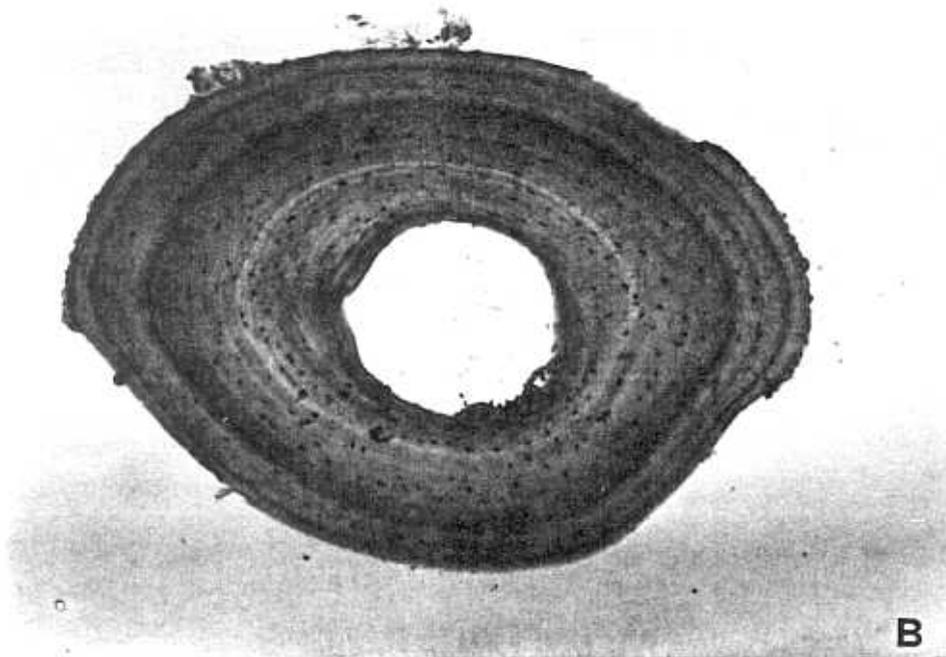
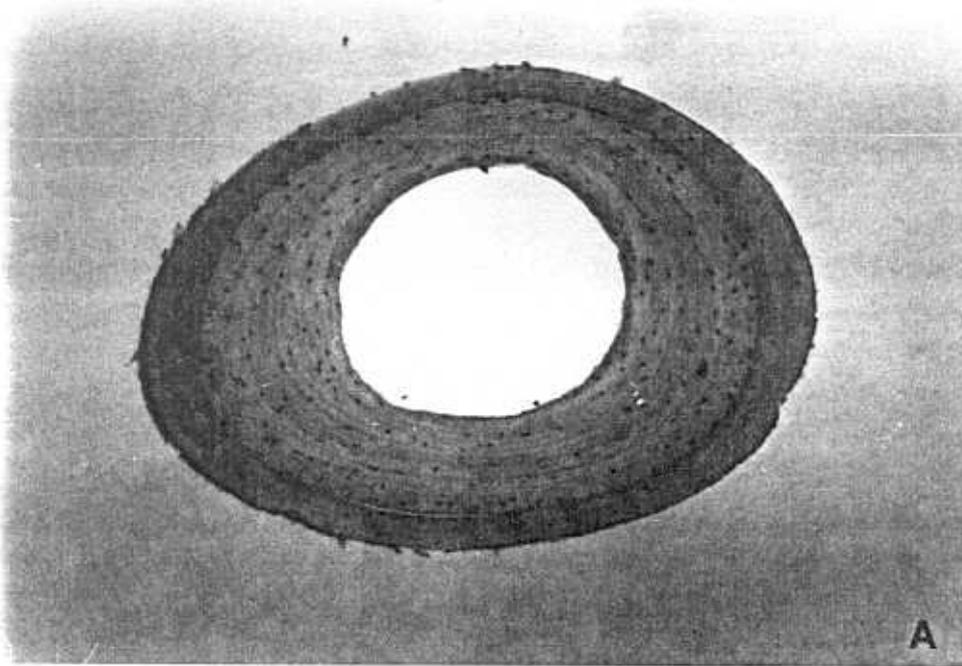
#### 1.- Determinación de la edad por esqueletocronología

Para poner en marcha este estudio resultaba básico e imprescindible conocer la edad de los individuos. De los distintos métodos indirectos que existen para la determinación de la edad, el análisis de la estructura del hueso por esqueletocronología nos pareció un método seguro y apropiado para nuestros animales. Este método se basa en la presencia de líneas de crecimiento en el hueso que pueden visualizarse en cortes histológicos del mismo. Las líneas de crecimiento son claramente visibles en las falanges, por lo que para la determinación de edad basta con amputar un dedo al animal.

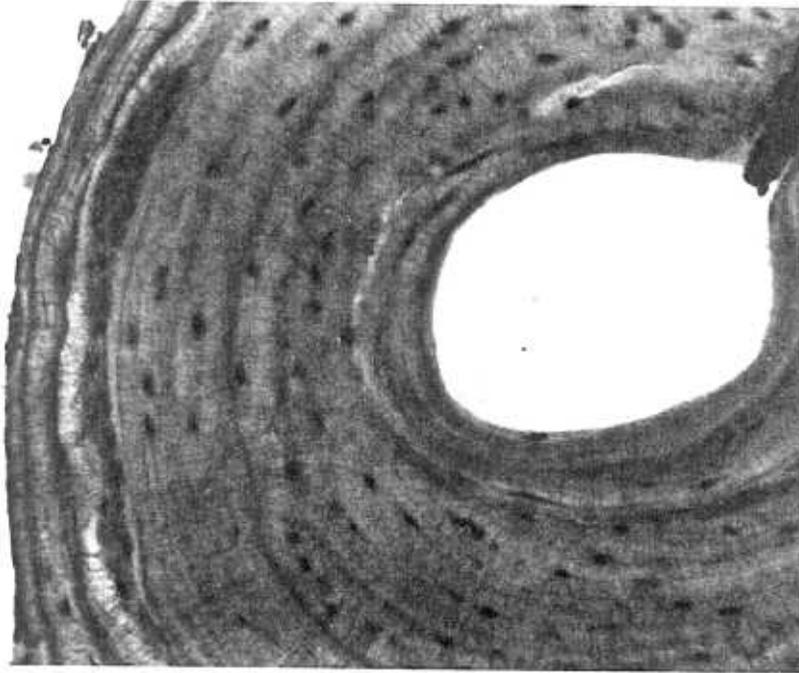
Durante el verano de 1988 se capturó en Pontevedra (Galicia) un total de 529 animales adultos de *R. perezi*, machos y hembras, y se procedió a determinar la edad individualmente mediante esta técnica. Para ello se utilizó la falange terminal del tercer dedo de la pata derecha. Las falanges se descarnaron y se utilizó ácido nítrico al 3% durante 75-90 minutos para descalcificar. Después de lavar durante una hora con un flujo constante de agua para eliminar el agente descalcificante, las zonas centrales de las diáfisis se congelaron para, seguidamente, realizar cortes de 15-25  $\mu\text{m}$  con un microtomo de congelación. Los cortes se sumergieron en agua destilada y se tiñeron con hematoxilina Ehrlich durante 45-60 minutos. Se lavaron de nuevo en agua destilada y se montaron en glicerol-gelatina. Las preparaciones se estudiaron al microscopio óptico.

La edad de cada rana se estableció contando el número de líneas de crecimiento (RL) presentes en los cortes (Smirina, 1972; Castanet, 1975) y considerando el margen externo del hueso como una línea (Figuras 1 y 2).

Además, para comprobar que sólo se deposita una línea de crecimiento por año, se analizaron las falanges de varios animales nada más llegar al laboratorio y después de un año en el mismo. Durante el invierno de ese año en el laboratorio, los animales estuvieron en condiciones simuladas de hibernación ( $10 \pm 2^\circ\text{C}$  y ayuno parcial de Noviembre



**Figura 1.-** Fotomicrografía óptica de secciones de falanges de ranas de la especie *Rana perezii* de: (A) dos años de edad, mostrando una línea de crecimiento. (B) tres años de edad, mostrando dos líneas de crecimiento (hematoxilina Ehrlich, x 100).



**Figura 2.-** Fotomicrografía óptica de una sección de falange de una rana de cinco años de edad de la especie *Rana perezi* mostrando cuatro líneas de crecimiento (hematoxilina Ehrlich, x 200).

a Marzo). En todos los casos se depositó una clara línea de crecimiento después del año en cautividad.

Por otro lado, para detectar posibles casos de reabsorción de anillos de crecimiento, se realizó un estudio morfométrico en una muestra de falanges correspondientes a los distintos grupos de edad. Los diámetros internos del perióstio fueron siempre más pequeños que los diámetros externos de los individuos más jóvenes, lo cual indicaba que no existía reabsorción (Patón *et al.*, 1991).

## **2.- Tratamiento con aminotriazol (AT) y dietilditiocarbamato (DDC)**

El aminotriazol (3-amino-1,2,4-triazol) ha sido utilizado en este trabajo para conseguir animales esencialmente desprovistos de actividad catalasa (CAT). Este compuesto es capaz de inhibir la actividad catalasa debido a que forma un complejo inactivo con la enzima en presencia de  $H_2O_2$  (Allen *et al.*, 1983; Yusa *et al.*, 1987). Esta inhibición es totalmente irreversible.

En un principio y para conseguir inhibir la actividad superóxido dismutasa (SOD) utilizamos dietilditiocarbamato (DDC), un quelante de cobre, capaz de producir una marcada inhibición de la actividad SOD *in vivo* e *in vitro* (Heikkila *et al.*, 1976; Heikkila y Cohen, 1977; Sohal *et al.*, 1984).

Los dos grupos de animales tratados, jóvenes y viejos, recibieron cada dos semanas una inyección intraperitoneal de una solución de AT y DDC en salino fisiológico. Las dosis utilizadas fueron 1 mg/g de peso del animal en el caso del AT y 0,02 mg/g en el del DDC. El volumen total inyectado fue de 0,02 ml/g de peso del animal.

Nuestro equipo ya había utilizado el AT en trabajos anteriores con esta misma especie animal (Figura 3), por lo que las dosis estaban bastante establecidas (López Torres, 1988; Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a). A pesar de ello, en experimentos previos comprobamos que estas dosis de AT y DDC eran capaces de producir

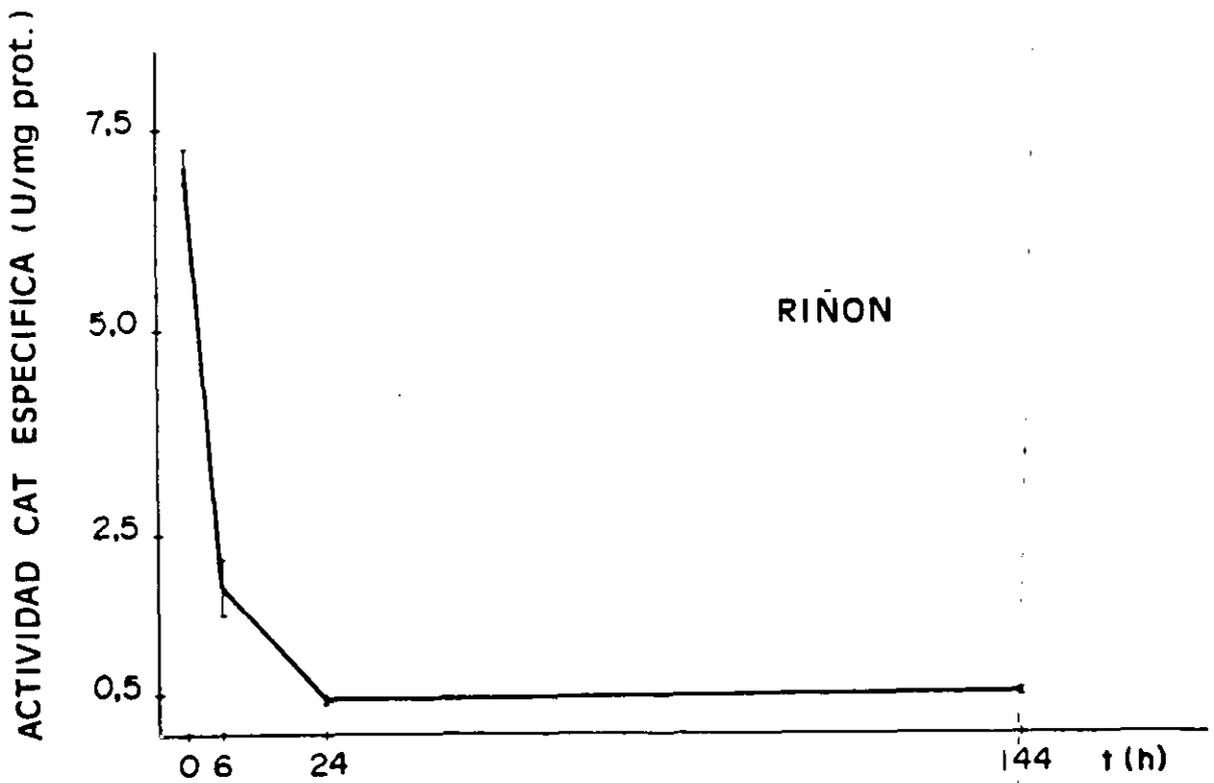
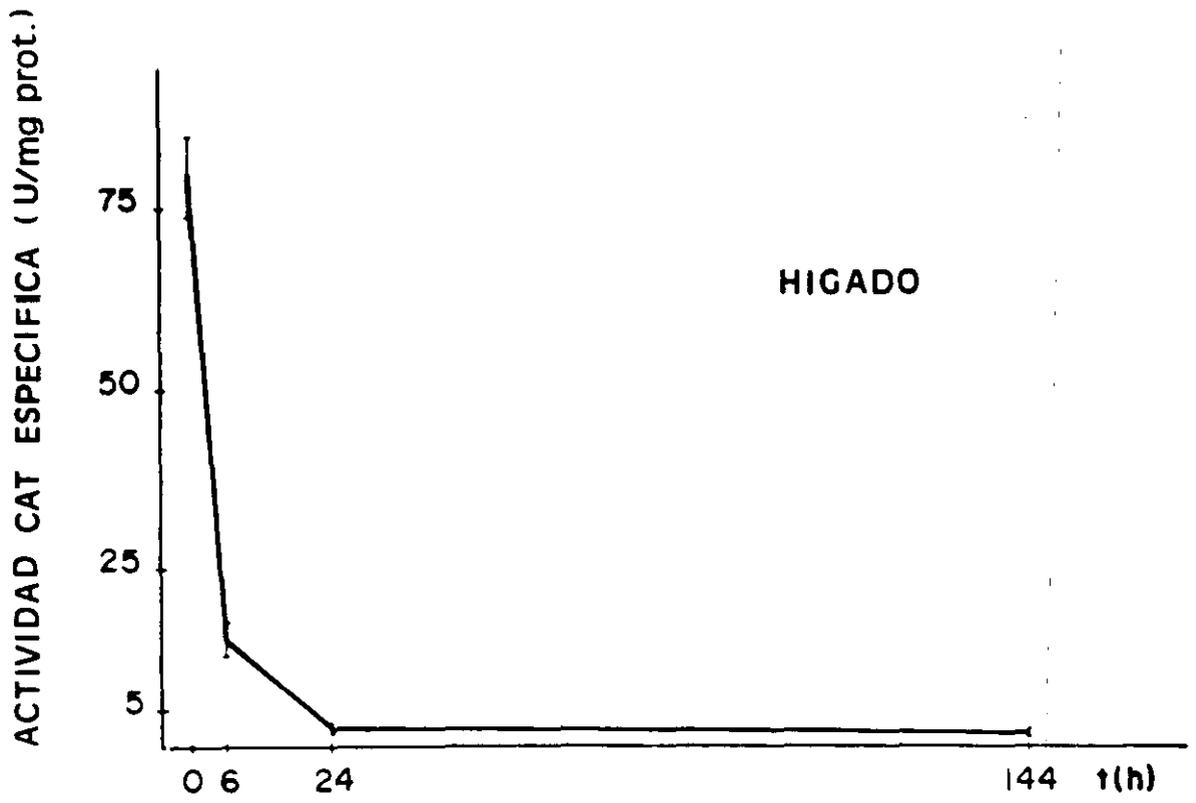


Figura 3.- Representación gráfica de la inhibición de la actividad catalasa específica hepática y renal en función del tiempo en animales adultos de *Rana perezii*.

una inhibición que variaba desde más del 90% en el hígado, al 85% en el pulmón y 75% en el cerebro en el caso de la actividad catalasa, e inhibiciones del 79% en el cerebro, 45% en el hígado y 32% en el pulmón en el caso de la SOD, una semana después de la inyección. Dicha dosis de DDC no tenía efectos letales a medio o corto plazo mientras que al aumentarla se manifestaban estos efectos, produciéndose un descenso progresivo del  $LT_{50}$ .

<u>DDC (mg/g)</u>	<u><math>LT_{50}</math></u>
1	24 h
0,25	60 h
0,1	43 días
0,02	-

Sin embargo, el tratamiento a largo plazo con DDC no resultó eficaz. Se producían recuperaciones de la actividad SOD, por lo que tras 2,5 meses de tratamiento experimental se eliminó este compuesto del volumen inyectado.

### 3.- Medida del consumo de oxígeno

Las medidas de consumo de oxígeno se llevaron a cabo en una cámara termostatzada lo que permitió un control de la temperatura a lo largo del experimento. Además, se realizaron manteniendo el fotoperiodo al que estaban aclimatados los animales y a las mismas horas del día para evitar posibles efectos debidos a los ritmos circadianos.

El consumo de oxígeno del animal completo ( $\dot{V}O_2$ ) se midió a 25°C en respirómetros de 4,85 l, especialmente diseñados para ello y que contenían 50 ml de agua desclorada en la base. Cinco animales en condiciones postabsortivas fueron colocados en la parte inferior del respirómetro para cada serie de medidas. El espacio era suficiente para evitar estresar a los animales, eliminando al mismo tiempo la posibilidad de que realizasen ejercicio. Las medidas representan, por tanto, la tasa metabólica de rutina del animal. En

la parte superior del respirómetro se colocó el electrodo de oxígeno conectado al medidor externo y 50 ml de KOH al 10%, utilizado para absorber el CO<sub>2</sub> que se produce en el interior del respirómetro durante las medidas debido al metabolismo de los animales. Los niveles de CO<sub>2</sub> fueron siempre controlados con un detector multigas Dräger. Para cada serie de medidas se renovaba tanto el KOH como el agua desclorada. En la parte superior del respirómetro se situó también un compresor encargado de recircular el aire dentro del mismo, con un flujo de tres litros por minuto, para conseguir una homogeneidad en la composición de los dos compartimentos, superior e inferior.

Las medidas se iniciaron después de que los animales se habituaran al respirómetro durante la noche. El consumo de oxígeno se midió durante 8 horas y la pO<sub>2</sub> fue registrada cada dos horas. Las medidas se realizaron dentro de un rango en el que el consumo no es dependiente de la pO<sub>2</sub>. Las variaciones de tensión dentro del respirómetro durante todas las medidas fueron: pO<sub>2</sub> mínima = 109±8 mmHg y pO<sub>2</sub> media = 114,6±7 mmHg siendo 139,9 mmHg la pO<sub>2</sub> media del laboratorio durante las medidas. El  $\dot{V}O_2$  se estimó a partir de la caída de pO<sub>2</sub> (entre normoxia y 100 mmHg) durante el periodo de medida.

El  $\dot{V}O_2$  se obtuvo mediante las siguientes expresiones:

$$\text{Vol. } O_2 \text{ inicial (STP)} = V_A \cdot \frac{[O_2]_i}{100} \cdot \frac{273}{T_i} \cdot \frac{P_i - P_{VH_2O}}{760}$$

$$\text{Vol. } O_2 \text{ final (STP)} = V_A \cdot \frac{[O_2]_f}{100} \cdot \frac{273}{T_i} \cdot \frac{P_i - P_{VH_2O}}{760}$$

$V_A$  = volumen de aire en ml

$[O_2]_i$  y  $f$  en %

$P_{VH_2O}$  = presión de vapor de agua

$T_i$  y  $P_i$  = temperatura y presión del laboratorio en el momento del cierre de la cámara

$$VO_2 = \frac{(VO_2 \text{ inicial} - VO_2 \text{ final}) \times 1000}{g \times h}$$

g = peso del animal en gramos

h = tiempo que duró la medida en horas

Los valores se expresaron en  $\mu\text{l O}_2/\text{g.h}$ .

#### 4.- Medidas enzimáticas

##### A. Preparación de muestras

Cada año, se sacrificaron animales a lo largo de un periodo de unos tres meses, en grupos de dos cada semana. Los animales, después de ser pesados, se sacrificaron por desmedulación con un alfiler de cabeza gruesa y a continuación se extrajeron hígado, pulmones y cerebro que fueron utilizados inmediatamente. Tras las medidas del primer año y debido a los resultados que obtuvimos, nos pareció conveniente ampliar el estudio a otro órgano, el riñón. Por ello, el segundo y tercer año se extrajeron también los riñones, que fueron congelados hasta el momento de su valoración. Se separaron distintas porciones de cada órgano, que posteriormente serían utilizadas para los distintos tipos de medidas y valoraciones.

Los órganos fueron pesados en una balanza de precisión y seguidamente se procedió a su homogeneización. Esta se llevó a cabo, en el caso de las medidas enzimáticas y el análisis de peroxidación tisular, en una solución tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 empleándose 1 ml de tampón por cada 50 mg de tejido, excepto en el caso del cerebro, en el que se utilizó 1 ml por cada 25 mg de tejido. La homogeneización se realizó en homogeneizadores de vidrio tipo Pobel (teflón-vidrio) con un homogeneizador automático Wheaton (3 movimientos a 1.000 rpm) en frío. Los homogenados resultantes fueron

sonicados también en frío con un sonicador Vibra-Cell a una potencia de salida de 38 vatios (3 periodos de sonicación de 10 s separados por dos intervalos de 20 s). Seguidamente fueron centrifugados a 3.200 g durante 20 minutos a 5°C. Finalizada la centrifugación, se separaron los sobrenadantes, que fueron utilizados inmediatamente para los ensayos enzimáticos, manteniéndose siempre a 5°C.

Para la medida de la actividad catalasa y citocromo c oxidasa se añadieron a las alícuotas correspondientes Triton-X-100 y lubrol, ambos a una concentración final del 1%. Después de 30 minutos de espera se realizó la medida espectrofotométrica.

Además, del homogenado original se separó otra alícuota que fue dializada durante la noche frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 (300 ml) y que se usó para la medida de las actividades superóxido dismutasa y glutatión reductasa, medidas que se llevaron a cabo al día siguiente.

#### **B. Medida de la actividad catalasa**

La medida de la actividad catalasa se realizó por el método de Beers y Sizer (1952) descrito por Lück (1965). Este método utiliza el descenso de absorbancia por unidad de tiempo durante la descomposición (catalizada por la enzima) del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La  $\lambda$  utilizada fue 240 nm.

Los ensayos se realizaron en microcubetas de cuarzo, en un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm. Cada cubeta contenía, en un volumen final de 0,7 ml:

- 0,67 ml de una solución 14 mM de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4.
- 30  $\mu$ l de muestra que se añadían en el último momento para iniciar la reacción.

Los blancos utilizados contenían 0,67 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 y 30  $\mu$ l de muestra.

Las medidas de la actividad catalasa se realizaron dentro del minuto siguiente al momento de añadir la muestra, en el caso de hígado, pulmones y riñones de los dos grupos control, y durante los tres primeros minutos en el caso de los animales tratados y el cerebro de los controles, donde además dejábamos 10 segundos de retraso inicial.

Los ensayos se efectuaron a 25°C con un espectrofotómetro termostatzado. Es necesario un control estricto de la temperatura a la que se lleva a cabo el ensayo, pues, a diferencia de la catalasa de mamíferos, la CAT de *R. perezii* presenta valores de  $Q_{10}$  moderadamente altos entre 10°C y 30°C (Barja de Quiroga *et al.* 1984). Además, esta enzima fue una de las primeras en ser analizada cada día de medida ya que su actividad disminuye considerablemente a lo largo del tiempo, a diferencia del resto de enzimas valoradas, que son bastante estables.

La actividad total de la enzima se expresó en unidades internacionales (IU) por mg de tejido ( $\mu\text{moles de sustrato}/\text{min.mg tejido}$ ); su cálculo se realizó a partir de la expresión:

$$ACT. TOTAL (\mu\text{moles } H_2O_2/\text{min.mg.tej}) = \frac{\Delta DO/\text{min} \cdot V_t \cdot F \cdot 1,1}{43,6 \times 10^{-3} \cdot V_m \cdot x}$$

siendo:

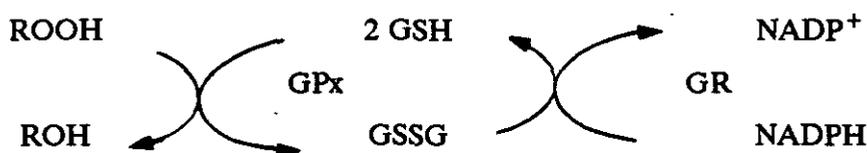
- $\Delta DO/\text{min}$ : incremento de absorbancia en el intervalo de tiempo considerado
- F: factor de dilución de la muestra
- $V_t$ : volumen total en cubeta (0,7 ml)
- e: coeficiente de extinción molar ( $43,6 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- $V_m$ : volumen de muestra (30  $\mu\text{l}$ )
- x: mg de tejido por cada ml de tampón fosfato empleado en la homogeneización (25-50 mg)

Por cada ml de tampón fosfato se añadieron 0,1 ml de Triton-x-100. Por este motivo se introdujo en la expresión anterior el factor 1,1.

Para el cálculo de la actividad específica de la catalasa se determinó la cantidad de proteína en las muestras por el método de Lowry *et al.* (1951).

### C. Medida de las actividades glutatión peroxidasas

La glutatión peroxidasa (GPx) es capaz de catalizar la reacción entre un hidroperóxido (ROOH) y el glutatión reducido.



La enzima es específica para el glutatión, pero no sucede lo mismo respecto al peróxido, pudiendo descomponer sustancias como  $\text{H}_2\text{O}_2$  o hidroperóxidos orgánicos.

Existen dos formas de la enzima. La primera es dependiente de selenio y tiene actividad frente a peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. La segunda, no selenio dependiente, sólo presenta actividad frente a los peróxidos orgánicos.

Las actividades de la glutatión peroxidasa, usando cumeno-OOH y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustratos, se midieron por los métodos acoplados de Lawrence y Burk (1976) y Paglia y Valentine (1967) respectivamente. El primero mide los dos tipos de actividad GPx, mientras que el segundo mide solamente actividad GPx dependiente de selenio.

Las actividades se estimaron por el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH durante cuatro minutos desde el momento de iniciarse la reacción y después de un minuto de retraso inicial. Las mezclas de reacción se preincubaron durante 4 minutos sin sustrato antes de iniciar la reacción. Los ensayos se realizaron a  $25^\circ\text{C}$  en microcubetas de cuarzo y el paso de luz fue de 1 cm. Cada cubeta contenía en un volúmen final de 0,7 ml los siguientes reactivos:

- 0,65 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 conteniendo azida sódica 4 mM, EDTA 1mM, glutatión reducido (GSH) 4 mM, NADPH 0,2 mM y una unidad de glutatión reductasa por ml.
- 25 µl de muestra.
- 25 µl de cumeno-OOH 0,71 mM o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,071 mM como sustratos.

Los blancos se prepararon con 0,675 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 y 25 µl de muestra.

La solución de tampón fosfato fue previamente burbujeada con N<sub>2</sub> para eliminar el O<sub>2</sub> disuelto. Es conveniente tomar esta precaución para evitar la autooxidación del GSH durante las medidas.

Las concentraciones de cumeno-OOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH así como el pH apropiado, fueron el resultado de experimentos previos realizados en nuestro laboratorio a fin de encontrar las condiciones óptimas para medir la actividad GPx en *R. perezii* (López-Torres *et al.*, 1988).

Cada día de medida se realizaron ensayos de la reacción no catalizada en ausencia de muestra de tejido. En estos casos, en lugar de añadir 25 µl de muestra, se añadían 25 µl del tampón fosfato en el que se había realizado la homogeneización del tejido. Como blancos, en este caso, se utilizaron 0,7 ml de tampón de homogeneización. Este procedimiento es necesario debido a la presencia de reacción espontánea entre el ROOH o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el GSH en ausencia de enzima. Los valores de actividad GPx finales se calcularon a partir de la diferencia entre el ΔDO de la reacción catalizada, y el ΔDO de la reacción no catalizada. Los resultados se expresaron como nmoles de NADPH oxidados por minuto por mg de tejido (actividad total), o por mg de proteína (actividad específica), utilizando para su cálculo la expresión:

$$ACT.TOTAL (nmoles NADPH/min. mg tej.) = \frac{\Delta DO/min. F. V_t}{6,22 \cdot 10^{-3} \cdot V_{m-x}}$$

siendo:

- $\Delta DO/\text{min}$ : incremento de absorbancia en el intervalo de tiempo considerado.
- F: factor de dilución de la muestra
- $V_t$ : volumen total en cubeta (0,7 ml)
- $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar ( $6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- $V_m$ : volumen de muestra (25  $\mu\text{l}$ )
- x: mg de tejido por cada ml de tampón fosfato empleado en la homogeneización (25-50 mg)

La concentración de proteínas en las muestras se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951), y de esta forma los resultados se expresaron como actividad específica.

#### D. Medida de la actividad glutatión reductasa

Para el análisis de esta enzima utilizamos tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 conteniendo EDTA 6,3 mM, NADPH 6 mM y GSSG 80 mM. Todos los sustratos de la reacción estaban en concentraciones saturantes para la enzima de *R. perezii*.

La actividad glutatión reductasa se midió siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm en presencia de glutatión oxidado (GSSG) 4 mM y NADPH 0,3 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 conteniendo EDTA 6,3 mM (Massey y Williams, 1965) durante 4 minutos y después de 30 segundos de retraso inicial. Los ensayos se realizaron a 25°C. Como siempre, utilizamos microcubetas de cuarzo y un paso de luz de 1 cm. Cada cubeta contenía en un volumen final de 0,7 ml:

- 0,58 ml de tampón fosfato con EDTA.
- 50  $\mu\text{l}$  de muestra.
- 35  $\mu\text{l}$  de GSSG.
- 35  $\mu\text{l}$  de NADPH.

Debido a que existe una oxidación espontánea en ausencia de enzima, se corrigió la actividad glutatión reductasa del siguiente modo: cada día se sustituyeron los 50

$\mu\text{l}$  de muestra por tampón fosfato. Los valores finales de actividad GR se calcularon a partir de la diferencia entre el  $\Delta\text{DO}$  de la reacción catalizada y el de la no catalizada. Para el cálculo de la actividad se utilizó la siguiente expresión:

$$ACT.TOTAL (nmoles NADPH/min.mgtej.) = \frac{\Delta DO/min \cdot V_t \cdot F}{6,22 \times 10^{-3} \cdot V_m \cdot x}$$

siendo:

- $\Delta\text{DO}/\text{min}$ : incremento de absorbancia en el intervalo de tiempo considerado
- $V_t$ : volumen total en cubeta (0,7 ml)
- F: factor de dilución de la muestra
- e: coeficiente de extinción molar ( $6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- $V_m$ : volumen de muestra (50  $\mu\text{l}$ )
- x: mg de tejido por cada ml de tampón fosfato empleado en la homogeneización

Después de la determinación de proteínas se expresaron los resultados como actividad específica.

### E. Medida de la actividad superóxido dismutasa

La mayoría de los métodos que se utilizan en la actualidad para la medida de actividad superóxido dismutasa en muestras biológicas son indirectos (Spitz y Oberley, 1989). Estos métodos indirectos se basan en la capacidad de la SOD para inhibir una reacción mediada por el radical superóxido. La intensidad con la que la SOD reduce la tasa de esta reacción se toma como medida de la actividad enzimática.

Nosotros hemos utilizado el método de Paoletti *et al.* (1986). Es un método espectrofotométrico basado en la inhibición de la oxidación del NADH debida al radical superóxido. Se trata de una secuencia de reacciones puramente química que conduce a la

oxidación de este NADH y que implica el uso de EDTA, Mn (II), mercaptoetanol y oxígeno molecular (Paoletti *et al.*, 1990). Este método presenta, respecto a otros análogos, las ventajas de su mayor sensibilidad, la ausencia de interferencias (por ejemplo la interferencia de la actividad NADH oxidasa espontánea resulta irrelevante) y la capacidad de la enzima para lograr un 100% de inhibición de la reacción control, lo que no se consigue con otros métodos, porque parte de la reacción es no dependiente de superóxido. Además presenta una buena linearidad con homogenados. Su mayor desventaja consiste en el tiempo mínimo a emplear en cada ensayo.

Tras dializar las muestras como se describe en el apartado 4.A., es necesario eliminar la hemoglobina presente, ya que ésta interfiere en la reacción; se precipitó con cloroformo:etanol (muestra/cloroformo/etanol, 1:0,33:0,18 v/v). Después de agitar, se centrifugó a 1.200 g durante 10 minutos. Tras recoger los sobrenadantes se añadió Triton-X-100 al 1% y después de media hora se realizó la medida espectrofotométrica a 25°C.

La actividad SOD se midió en presencia y ausencia de muestra (reacción control) siguiendo la tasa de oxidación del NADH en presencia de EDTA 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 2,5 mM, NADH 0,27 mM y mercaptoetanol 0,56 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que inhibe al 50% la tasa de oxidación del NADH y corresponde a 40 ng de SOD pura. Al hervir los sobrenadantes durante 15 minutos la actividad SOD desapareció por completo.

Después de 5 minutos de incubación, se realizaron las medidas durante 4 minutos en microcubetas de cuarzo que contenían:

- 0,57 ml de tampón fosfato 50 mM , pH 7,4 previamente aireado.
- 26 µl de NADH.
- 35 µl de Cl<sub>2</sub>Mn.
- 40 µl de muestra o tampón fosfato en el caso de la reacción control.
- 40 µl de mercaptoetanol.

Cada día de medida se realizaban varias reacciones control (en ausencia de muestra). Estos se hicieron según la siguiente expresión:

$$USOD/mg \text{ tej.} = \frac{((V_0/V_1)-1) \cdot V_t \cdot F \cdot 1,1 \cdot 1,5}{V_m \cdot x}$$

siendo:

- $V_0$ : incremento de absorbancia en el intervalo de tiempo considerado de la reacción control
- $V_1$ : incremento de absorbancia en el intervalo de tiempo considerado de la reacción con muestra
- $V_t$ : volumen total en cubeta
- $F$ : factor de dilución de la muestra
- $V_m$ : volumen de muestra (40  $\mu$ l)
- $x$ : mg de tejido por cada ml de tampón fosfato empleado en la homogeneización

Por cada ml de homogenado se añadieron 0,1 ml de Triton-x-100. Por este motivo se introdujo en la expresión anterior el factor 1,1 y por la precipitación de hemoglobina con cloroformo y etanol es necesario añadir el factor 1,5.

Después de la determinación de proteínas los resultados se expresaron como actividad específica.

#### F. Medida de la actividad citocromo c oxidasa

La actividad citocromo c oxidasa fue medida en alícuotas de sobrenadante, a las que se añadió lubrol al 1%, según el método de Smith (1955). El citocromo c comercial 0,81 mM disuelto en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 fue reducido con ascorbato al 0,5%. El ascorbato se eliminó de la solución de citocromo mediante diálisis frente a tampón fosfato (con dos cambios de tampón y en un volumen de unos 300 ml) durante la noche.

Antes de realizar las medidas se comprobaba el porcentaje de reducción del citocromo c, midiendo el cociente de absorbancia a 550/565 nm. Se obtuvieron siempre valores superiores a 9, lo que indicaba que esta reducción era completa (valores superiores a 6 indican una reducción del citocromo c del 90%).

La tasa de oxidación del citocromo c reducido (56  $\mu\text{M}$ ) se siguió a 550 nm utilizándose citocromo c oxidado por ferricianuro potásico 0,9 mM como blanco. La medida se realizó en microcubetas de cuarzo durante medio minuto, registrándose los valores de absorbancia cada 6 segundos. La temperatura a la que se realizaron las medidas fue de 25°C. Los cálculos se hicieron según la expresión:

$$ACT.TOTAL (\mu\text{moles cit. c ox./min.mg tej.}) = \frac{\Delta DO/\text{min} \cdot F \cdot V_t}{18,5 \cdot V_m \cdot x}$$

siendo:

- $\Delta DO/\text{min}$ : incremento de absorbancia en el intervalo considerado
- F: factor de dilución de la muestra
- $V_t$ : volumen total en cubeta
- e: coeficiente de extinción molar (18,5  $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- $V_m$ : volumen de muestra
- x: mg de tejido por cada ml de tampón fosfato empleado en la homogeneización

### 5.- Valoración de proteínas

Para la valoración de proteínas se ha seguido la técnica colorimétrica descrita por Lowry *et al.*, (1951). La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteína. La formación de color se debe al reactivo de Folin (Fosfomolibdotúngstico), que es específico e interacciona con los grupos fenólicos de la tirosina, aminoácido que se encuentra a intervalos regulares en muchas proteínas. Da lugar

así a la formación de compuestos hemiquinónicos coloreados (tonalidad azul). Previamente las proteínas se desnaturalizan de forma que todos los restos de tirosina quedan expuestos al medio acuoso. Para ello es necesaria la presencia de iones cobre que se unen a las proteínas formando un complejo Cu-proteína que deja accesibles las tirosinas al reactivo de Folin. Este complejo reduce al reactivo de Folin dando un compuesto coloreado, siendo máxima la producción de color a pH 10.

Para ello se utilizaron como reactivos:

- reactivo A:  $\text{NaCO}_3$  al 2% en NaOH 0,1 N
- reactivo B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 1%
- reactivo C:  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tartrato Na-K) al 2%

Se tomaron 0,05 ml de muestra, añadiéndose agua destilada hasta completar 1 ml. En el caso de los blancos se utilizó 1 ml de agua destilada.

Se mezclaron 100 partes del reactivo A, 1 parte del reactivo B y 1 parte del C. De esta mezcla se añadieron 5 ml por tubo y se mantuvieron incubando durante 15 minutos a 30°C con agitación. A continuación se preparó reactivo Folin-Ciocalteau al 50% añadiéndose 0,5 ml por tubo. En este caso, el tiempo de incubación a 30°C con agitación fue de 30 minutos. Por último se hizo la lectura colorimétrica a 546 nm.

Para la construcción de la curva de calibrado se preparó una solución patrón con una concentración de 8 mg/ml de albúmina bovina en agua destilada, y a partir de ésta las distintas diluciones. El rango de concentraciones fue de 0,4 mg album./0,05 ml hasta 0,038 mg album./0,05 ml.

Esto dio lugar a la siguiente recta de regresión:

$$\text{mg prot./mg tej.} = \frac{DO-a}{b} \cdot 20 \cdot \frac{1}{x}$$

siendo:

$$a = 0,048265$$

$$b = 1,172546$$

con un coeficiente de regresión  $r = 0,992$

$x$  = mg de tejido por cada ml de tampón empleado en la homogeneización

## 6.- Análisis de la peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (sustancias TBA positivas)

### A. Preparación de muestras

La preparación de los homogenados y la centrifugación se realizó como se describe en el apartado 4.A.

### B. Peroxidación tisular *in vivo*. Método del ácido tiobarbitúrico.

La concentración de productos de peroxidación tisular se midió por el ensayo del TBA (ácido tiobarbitúrico) según Uchiyama y Mihara (1978) con algunas modificaciones.

Además de la peroxidación de lípidos poliinsaturados, el ataque oxidativo de los radicales libres y especies derivadas del  $O_2$  sobre hidratos de carbono, proteínas y DNA también lleva a la formación de sustancias TBA positivas (Kappus, 1985; Sevanian y Hochstein, 1985). Por ello en nuestros resultados se describen como productos de peroxidación tisular en lugar de peroxidación lipídica.

Una vez obtenidos los homogenados se llevó a cabo el ensayo del TBA. Para ello 140  $\mu$ l de cada muestra se mezclaron con:

- 1 ml de ácido fosfórico.
- 33  $\mu$ l de BHT (butilhidroxitolueno) al 0,01% en alcohol etílico.
- 0,3 ml de TBA (ácido tiobarbitúrico) al 0,6%.

Los blancos se prepararon con 140  $\mu$ l de fosfato potásico en lugar de muestra.

La adición de BHT es necesaria para evitar sobreestimaciones del grado de peroxidación tisular, ya que el BHT en la mezcla impide que se produzca una peroxidación adicional de la muestra durante la fase de calentamiento de este método, lo cual provocaría valores de TBA artificialmente altos (Pikul *et al.*, 1983). Trabajos realizados en nuestro laboratorio en tejidos de *R. perezii* (Gil y Barja de Quiroga, 1988) han demostrado que 10  $\mu$ g de BHT en la mezcla de reacción son suficientes para cumplir este objetivo.

Tras hervir las muestras durante 4 minutos y dejar que se enfriaran en un baño de hielo, se llevó a cabo una extracción con n-butanol, añadiéndose 1,4 ml de éste por tubo. Después de agitar con fuerza y centrifugar a 1.700 g durante 15 minutos y a 5°C se recogió la fase orgánica y se midió la absorbancia a 535 nm.

Para construir la curva patrón se preparó una solución madre de 200 nmoles/ml de MDA y a partir de ésta, 8 soluciones de distinta concentración de MDA. El rango de concentraciones de la curva patrón fue de 9,88 nmoles/tubo hasta 0,077 nmoles/tubo.

Para el cálculo de la peroxidación tisular en las muestras, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles MDA/g tej.} = \left( \frac{DO_{535} - a}{b} \right) \cdot \frac{\text{ml fosfato}}{\text{mg tejido}} \cdot \frac{1}{V_m} \cdot 1000$$

siendo:

$$a = 0,0232966$$

$$b = 0,1068536$$

con un coeficiente de regresión  $r = 0,996$

$V_m$ : volumen de muestra (0,14 ml)

hora de incubación en presencia de la vinilpiridina a temperatura ambiente se procedió a la medida del GSSG.

Tanto el glutatión total como el oxidado se analizaron por el método de Tietze (1969). Se trata de un procedimiento de reciclado enzimático en el que el glutatión es secuencialmente oxidado por el reactivo de Ellman (DTNB) y reducido por NADPH en presencia de glutatión reductasa. El DTNB es un cromóforo cuya forma reducida absorbe a 412 nm y por tanto el análisis se realizó siguiendo el cambio en absorbancia a 412 nm en presencia de 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico 0,6 mM, NADPH 0,21 mM y 0,5 U de GR por ml en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 conteniendo EDTA 6,3 mM. Los valores de GSH total y oxidado se corrigieron restando la reacción espontánea en ausencia de muestra y se expresaron en  $\mu\text{M}$  de equivalentes de GSH por g de tejido. El ensayo se llevó a cabo a 25°C.

Para los cálculos se utilizó una curva patrón obtenida al realizar la reacción en presencia de distintas concentraciones de GSH comercial. La curva patrón se construyó a partir de una solución madre de GSH comercial (16 mg de GSH/250 ml de TCA al 5%-HCl 0.01N). El rango de concentraciones fue de 14-448 ng de GSH/cubeta. La expresión que finalmente empleamos para los cálculos fue la siguiente:

$$\mu\text{moles GSH/g tej.} = \frac{(a+b \cdot y) \cdot F \cdot 1000/x}{V_m \cdot 10^6 \cdot 0,36733}$$

siendo:

$$a = 9,7365169$$

$$b = 1500,06938$$

con un coeficiente de regresión  $r = 0,999$

y:  $\Delta\text{DO}/\text{min}$

F: factor de dilución de la muestra

x: mg de tejido por cada ml de tampón

$V_m$ : volumen de muestra (0,07 ml)

### **8.- Valoración de ácido ascórbico por HPLC**

Para la determinación de ácido ascórbico en muestras biológicas se han utilizado diversos métodos colorimétricos y electroanalíticos. Sin embargo, muchos de ellos son pesados y largos y además tienen el inconveniente de que se producen interferencias con otras sustancias presentes en las muestras. Se han observado también interferencias cruzadas entre el ácido úrico y el ascórbico usando estos métodos.

Para solucionar todas estas limitaciones hemos utilizado técnicas de HPLC. La cromatografía líquida de alta resolución presenta la ventaja de combinar una gran sensibilidad y selectividad sin interferencias de otras sustancias endógenas. Por otro lado, nos encontrábamos con el problema de la limitación de volumen de muestra, por lo que resultaba imposible utilizar algunos de los métodos ya existentes en la literatura, en los que la muestra era sometida a un pretratamiento que, además de alargar el proceso, requería grandes cantidades de muestra.

Nuestro método (Barja de Quiroga *et al.*, 1991) permite el análisis eficaz de este compuesto mediante el empleo de cromatografía de par iónico en fase reversa con detección UV (Figura 4).

#### **A. Preparación de muestras**

Las muestras, tras el sacrificio de los animales, fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. Después de ser descongeladas se homogeneizaron, en frío, en ácido perclórico 50 mM en homogeneizadores de vidrio tipo Pobel, utilizándose 200 mg de tejido por ml de ácido perclórico. Los homogenados se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$  y se filtraron los sobrenadantes (con filtros de membrana con diámetro de poro de  $0,5\ \mu\text{m}$ ). Seguidamente fueron inyectados directamente en la columna  $20\ \mu\text{l}$  de muestra.

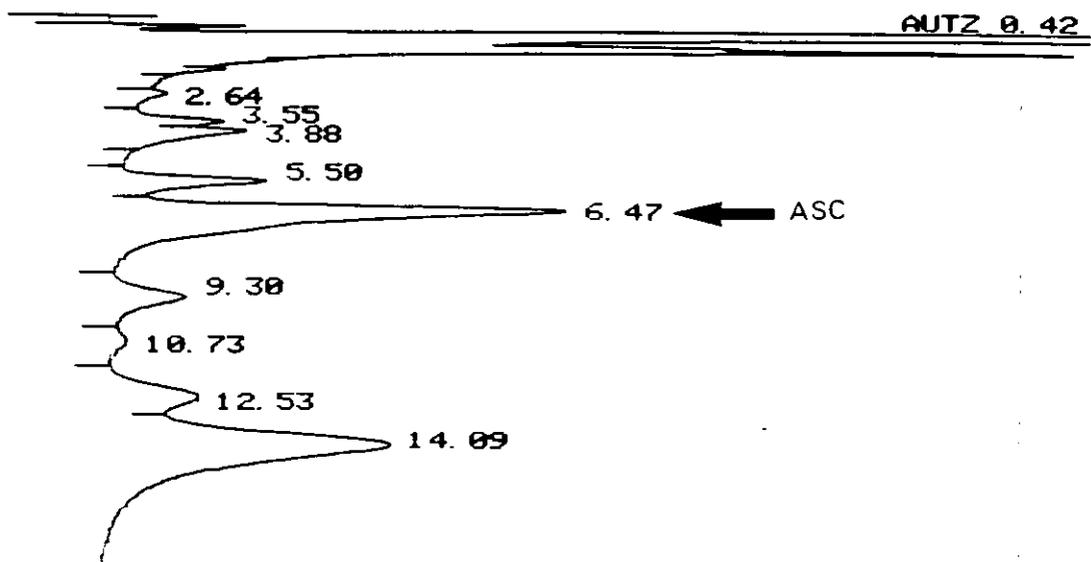


Figura 4.- Separación cromatográfica (HPLC) de ácido ascórbico en hígado de animales adultos de *Rana perezii*.

El cálculo de la concentración de ácido ascórbico se llevó a cabo por relación al área de la solución estándar mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{moles a. ascórbico/g} = \frac{\text{área muestra}}{\text{área estándar}} \cdot s \cdot \frac{1}{x}$$

siendo:

- s: concentración del estándar (0,4  $\mu\text{moles/ml}$ )
- x: g de tejido por cada ml de ácido empleado en la homogeneización

#### **B. Soluciones estándar**

Las soluciones estándar se prepararon cada día justo antes de inyectarlas (ascorbato 0,4 mM) ya que incluso en medio ácido se produce algo de degradación del ácido ascórbico. Esta degradación no tiene lugar en el caso de las muestras, que son estables durante horas a 5°C y en oscuridad.

#### **C. Condiciones cromatográficas**

La cromatografía fue de par iónico en fase reversa y se llevó a cabo isocráticamente utilizando una bomba Gilson 305 con un módulo manométrico 805, un inyector Rheodyne (7125) con un puerto de inyección de 20  $\mu\text{l}$  y una columna Mecherey-Nagel (nucleosil) de 7  $\mu\text{m}$  y 100 Å de diámetro de poro (4,6x100 mm). La fase móvil fue acetonitrilo/agua (12,5/87,5; v/v) y contenía fosfato disódico 4,3 mM y bromuro de miristiltrimetilamonio 1,07 mM como contraión. El pH se ajustó a 5,5 con ácido fosfórico. El flujo fue de 0,75 ml/min y la presión de unos 26 bares. La separación cromatográfica se llevó a cabo a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . La absorbancia se registró a 280 nm con un detector UV Gilson 115 de  $\lambda$  variable (sensibilidad 0,02) y se utilizó un integrador Milton-Roy CI-4100.

## 9.- Valoración de MDA por técnicas de HPLC

### A. Condiciones cromatográficas

Para la determinación del malondialdehído se utilizaron también técnicas de HPLC de par iónico en fase reversa con el mismo tipo de columna empleada en el apartado anterior. Concretamente, el método elegido es una modificación del descrito por Bull y Marnett (1985).

La separación cromatográfica se realizó utilizando una fase móvil que contiene un contraión que permite contrarrestar la carga del malondialdehído. Esto evita tener que utilizar una columna especial de intercambio iónico, pudiendo realizar la separación en columnas C<sub>18</sub> de fase reversa de uso común, útiles también para la separación de sustancias apolares y de bajo costo. La separación es isocrática, lo que permite el uso de una sola bomba impulsora de flujo. En este caso el flujo utilizado fue de 0,5 ml/min y la presión en columna de unos 19 bares. La fase móvil fue acetonitrilo/agua (25/75; v/v) conteniendo fosfato disódico 10 mM y bromuro de miristiltrimetilamonio 2,5 mM como contraión. El pH se ajustó a 7,4 con ácido fosfórico o sosa. La separación se llevó a cabo también a 25±2°C y la detección se realizó mediante la absorción del MDA a 267 nm usando un detector UV (Figura 5).

### B. Soluciones estándar

Para la solución estándar era necesario preparar una solución madre de malondialdehído bis (dimetilacetal), MDA 10 mM el día anterior o al menos unas horas antes de la medida. Esta se preparaba por hidrólisis ácida según describen Esterbauer *et al.* (1984) utilizando MDA comercial en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%. Después de dos horas a temperatura ambiente, la solución se guardaba en la nevera y se utilizaba en el momento de la medida. Partiendo de esta solución madre y diluyendo con Tris y acetonitrilo (1:3:4) se obtenía una solución de MDA 5 µM que era inyectada directamente en la columna.

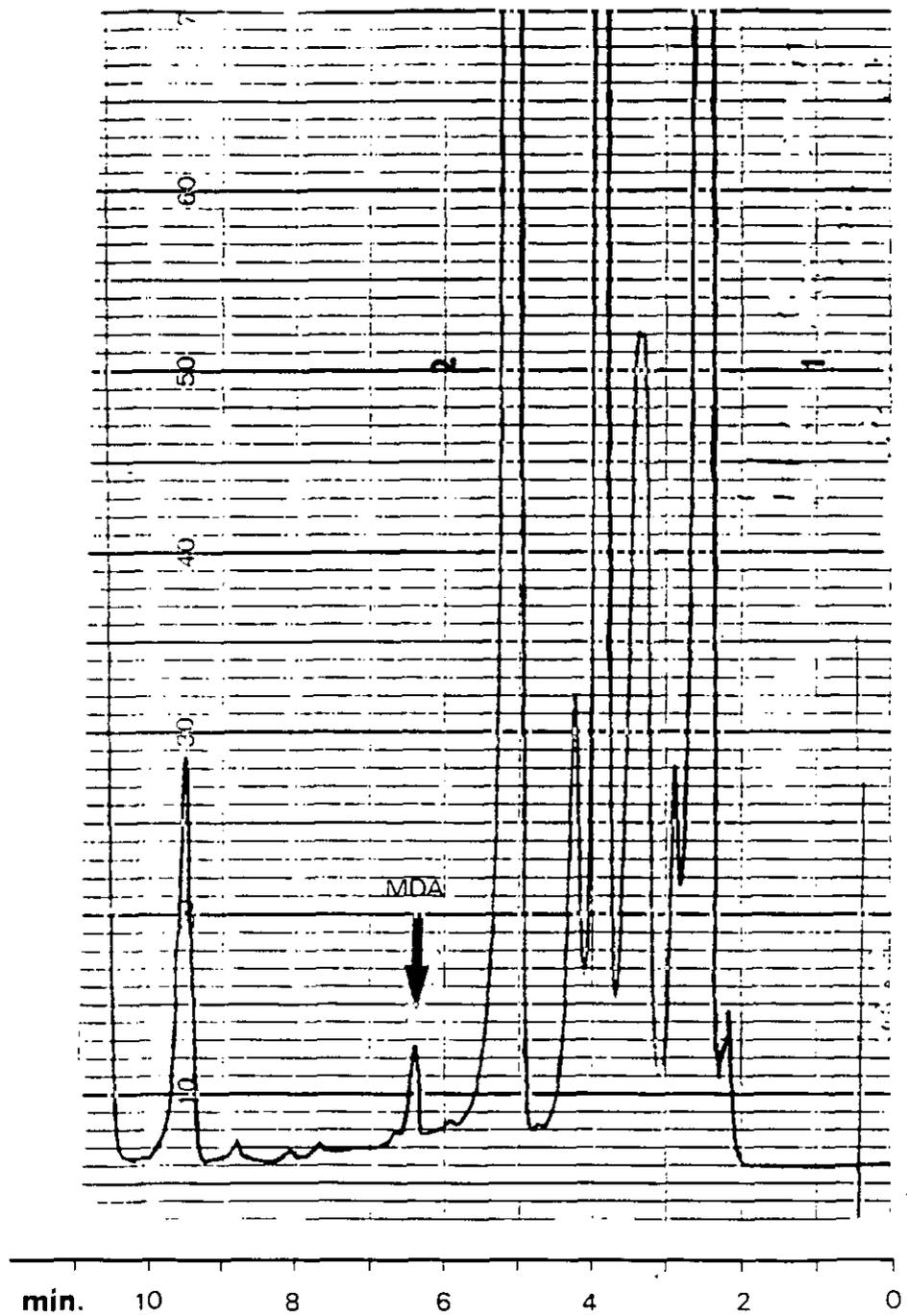


Figura 5.- Separación cromatográfica de MDA (malondialdehído) en hígado de animales adultos de *Rana perezi*.

### C. Preparación de muestras

En cuanto a la preparación de las muestras que se encontraban congeladas a -20°C desde que los animales fueron sacrificados, se homogeneizaron en tampón Tris 30 mM y pH 7,4 ajustado con HCl, empleándose 200 mg de tejido por ml. Al homogenado se le añadió acetonitrilo (1/1; v/v) y, una vez tapados y tras agitar fuertemente durante 30 segundos, se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos y a 5°C. Los sobrenadantes fueron filtrados con filtros de membrana con un diámetro de poro de 0,45 µm (acetato de celulosa) y seguidamente inyectados en la columna.

El cálculo de la concentración tisular de malondialdehído (MDA) se realizó por relación con el área de la solución estándar de MDA con la siguiente expresión:

$$\text{nmoles MDA/g} = \frac{\text{área muestra}}{\text{área estándar}} \cdot s \cdot 2 \cdot \frac{1}{x}$$

- s: concentración del estándar (5 nmoles/ml)
- x: g de tejido por cada ml de tampón empleado en la homogeneización

### 10.- Técnicas de microscopía óptica

Se realizó un estudio a microscopía óptica de la glándula tiroides para comprobar que el tratamiento no había dado lugar a alteraciones histológicas. Tras la extracción de los tiroides, éstos se sometieron a las siguientes etapas:

#### A. Fijación

Se llevó a cabo la fijación del tejido en formol al 10% a pH 7,4; neutralizado con NaOH, isotonzado previamente con ClNa.

**B. Inclusión**

La inclusión se realizó en parafina de 58<sup>o</sup>-60<sup>o</sup> de pureza.

**C. Cortes**

Se utilizó un microtomo para microscopía óptica y se realizaron cortes seriados de 7  $\mu$ m.

**D. Tinción**

La tinción se hizo con hematoxilina de Groat-Eosina.

Se realizaron cortes tanto transversales como longitudinales. La receta de parafinado y de tinción fue la usual en estos casos.

**11.- Técnicas de microscopía electrónica**

Se estudiaron muestras obtenidas a partir de la corteza cerebral del telencéfalo. La microscopía electrónica se realizó en tres fases:

- Fijación con glutaraldehído y post fijación con ácido ósmico.
- Inclusión en araldita.
- Preparación y observación de rejillas.

**A. Fijación**

Para la fijación de los tejidos se utilizó fosfato monosódico al 2,26% (solución A), sosa al 2,52% (solución B) y glutaraldehído al 25% de la siguiente forma:

- 41,5 ml de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  al 2,26%
- 8,5 ml de NaOH al 2,52%

El pH de la mezcla (Milloning) da alrededor de 7,3 y es necesario bajarlo a 7,1 con ácido clorhídrico 1N. Inmediatamente antes de fijar los tejidos, se añadieron 12,5 ml de glutaraldehído y en esta mezcla se dejaron las piezas de tejido de aproximadamente  $1\text{mm}^3$  durante 4-5 horas y en nevera a  $5^{\circ}\text{C}$ . Se cambió el medio por Milloning renovándolo cada media hora 4 veces y dejándolo después toda la noche. Al día siguiente, se cambió a Milloning con ácido ósmico al 1% durante una hora.

## B. Inclusión

1<sup>er</sup> día:

- 1) Lavado con agua destilada de las piezas provenientes del ácido ósmico.
- 2) Acetona al 30% en agua destilada, 30 min.
- 3) Acetona al 50% 30 min.
- 4) Acetona al 70% 30 min.
- 5) Acetona al 70% más contraste (acetato de uranilo), 12 horas.

2<sup>o</sup> día: se pusieron las cápsulas en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ .

- 1) Acetona al 90% 30 min.
- 2) Acetona al 100% 30 min.
- 3) Acetona con sulfato de cobre 30 min.
- 4) Oxido de propileno 1 hora. Se cambió dos veces.
- 5) Oxido de propileno con Araldita I en proporción 3:1, 2 horas.
- 6) Oxido de propileno con Araldita I (2:2), 2 horas.
- 7) Oxido de propileno con Araldita I (1:3), 12 a 24 horas.

3<sup>er</sup> día: se pusieron las cápsulas en estufa a  $70^{\circ}\text{C}$ .

- 8) Araldita I (estufa a  $50^{\circ}\text{C}$ , 2 horas).
- 9) Araldita I (estufa a  $50^{\circ}\text{C}$ , 12-24 horas).

4º día:

10) Araldita II (estufa a 50°C, 1 hora).

11) Araldita II (estufa a 50°C, 1 hora).

Las cápsulas de gelatina se pusieron a secar en estufa a 37°C durante dos días y una hora antes de su empleo se trasladaron a la estufa a 70°C. Las muestras se colocaron en las cápsulas de gelatina secas y se llenaron con Araldita II. Después de cerrar las cápsulas se dejaron en estufa a 70°C durante 48 horas para el endurecimiento.

- Araldita I

Componente B-azul-endurecedor 10 ml.

Componente D-verde-plastificante 0,15 ml.

Componente A/M-rojo-resina epoxi 10 ml.

-Araldita II

Componente B-azul-endurecedor 10 ml.

Componente C-amarillo-acelerador 0,4 ml.

Componente D-verde-plastificante 0,15 ml.

Componente A/M-rojo-resina epoxi 10 ml.

### C. Preparación y observación de rejillas

Se tallaron pirámides en las rejillas. A continuación se hicieron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut E). El espesor aproximado de los cortes fue de 1.000 Å. Se utilizaron cuchillas de diamante y rejillas de cobre. Los cortes se contrastaron con citrato de plomo. Se utilizó un microscopio electrónico Zeiss EM 902 para analizar los cortes. Este estudio se realizó en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

## 12.- Métodos estadísticos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el trabajo experimental se realizaron los siguientes tratamientos estadísticos:

### A. Características muestrales

De cada conjunto de datos se obtuvieron:

- Media aritmética de cada grupo de datos ( $\bar{x}$ ).
- Varianza muestral corregida, ya que n es un valor pequeño ( $s^2$ ).
- Desviación típica de la muestra (s).
- Error típico o estándar de la media (e).

Presentándose siempre los resultados como media  $\pm$  error estándar.

### B. Análisis estadístico de los datos

- Análisis de varianza de una vía.

Se usó este procedimiento para el análisis de los parámetros valorados a lo largo del periodo experimental puesto que en este caso sólo influye un factor, el tiempo de tratamiento.

- Análisis de varianza de doble vía.

Para analizar los parámetros estudiados en los cuatro grupos experimentales se utilizó un análisis de varianza de doble vía (ANOVA de dos vías) ya que en nuestro caso intervienen dos factores: el tratamiento y la edad (Sokal y Rohlf, 1981).

- Test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD).

Este test se aplicó *a posteriori*, a fin de precisar las diferencias entre grupos en los casos que había dado significativo el ANOVA previo. En todos los casos se tomó como grado mínimo de confianza  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## **I. PESO DE ANIMALES, ORGANOS E INDICE ORGANO-SOMATICO**

### **1.- Peso de animales (Figura 6)**

Como ya se ha mencionado en el apartado de Materiales y Métodos, se ha llevado a cabo un seguimiento trimestral del peso de los animales. Este ha permanecido estable a lo largo de los tres años que ha durado el periodo experimental, sin observarse diferencias debidas a la edad o al tratamiento. En la Figura 6 se muestra la evolución del peso en los distintos grupos experimentales. Sólo cabe señalar que los animales viejos controles eran significativamente más grandes que los jóvenes controles ( $p < 0,01$ ) ya al inicio del experimento, diferencia que se mantuvo durante la mayor parte del mismo ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ).

### **2.- Peso de órganos (Figuras 7 y 8)**

El peso húmedo de hígado, riñones, pulmones y cerebro se determinó antes de proceder a la medida de los parámetros bioquímicos. En este caso tampoco se aprecia un efecto de la edad o del tratamiento; los pesos de los distintos órganos son similares en los cuatro grupos experimentales. Del mismo modo, el peso de cada órgano tampoco varía significativamente a lo largo de los tres años que ha durado el periodo experimental.

### **3.- Índice organo-somático (Figuras 9 y 10, Tablas 1-4)**

Para corregir la posible influencia del tamaño del animal sobre el peso de los órganos, se calculó el índice organo-somático. No se detectan diferencias significativas en los dos últimos años, excepto en el caso del riñón. En este caso se observa un descenso del índice en el grupo viejo control ( $p < 0,01$ ) a los 14,5 meses de tratamiento.

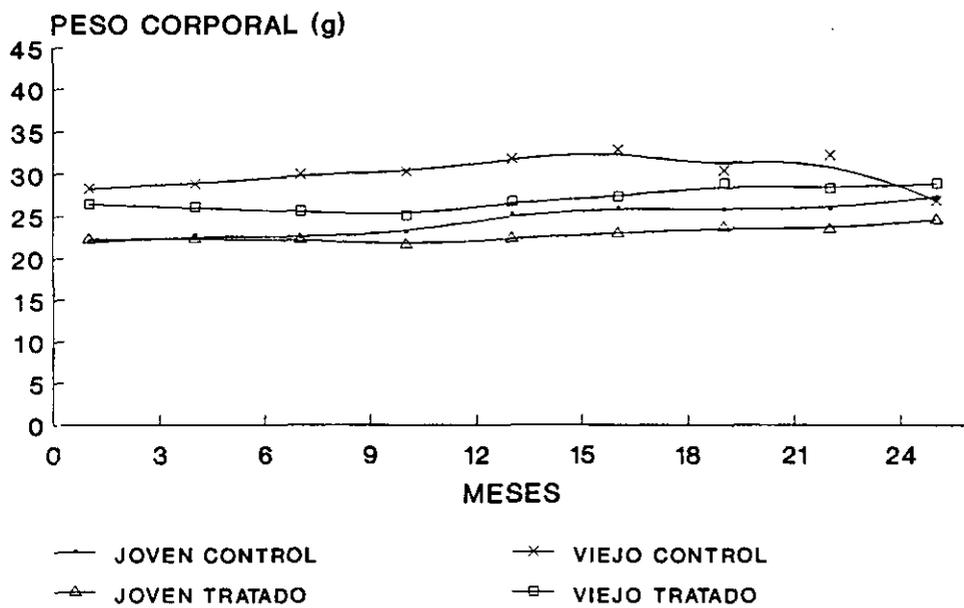
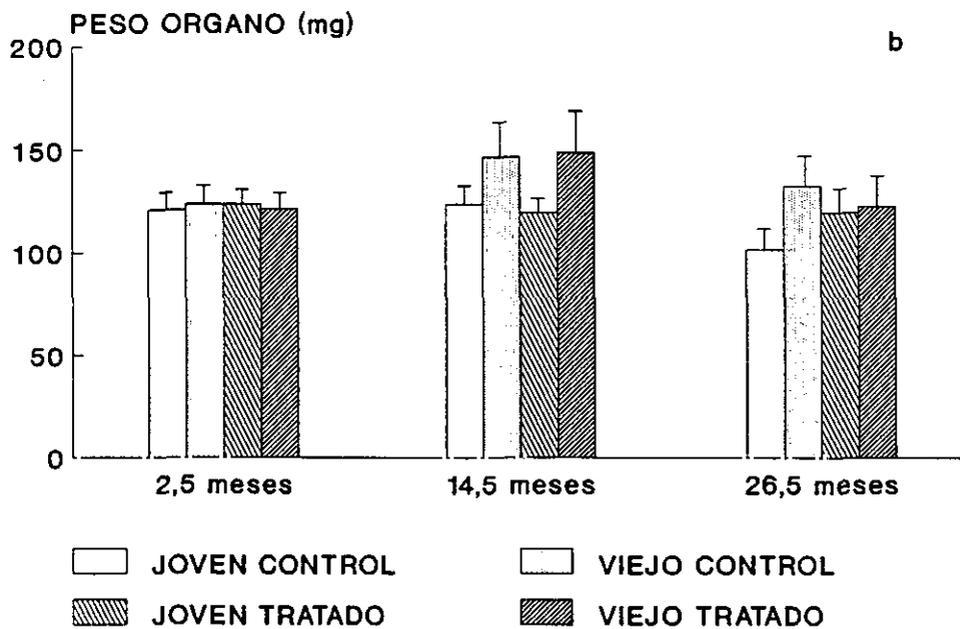
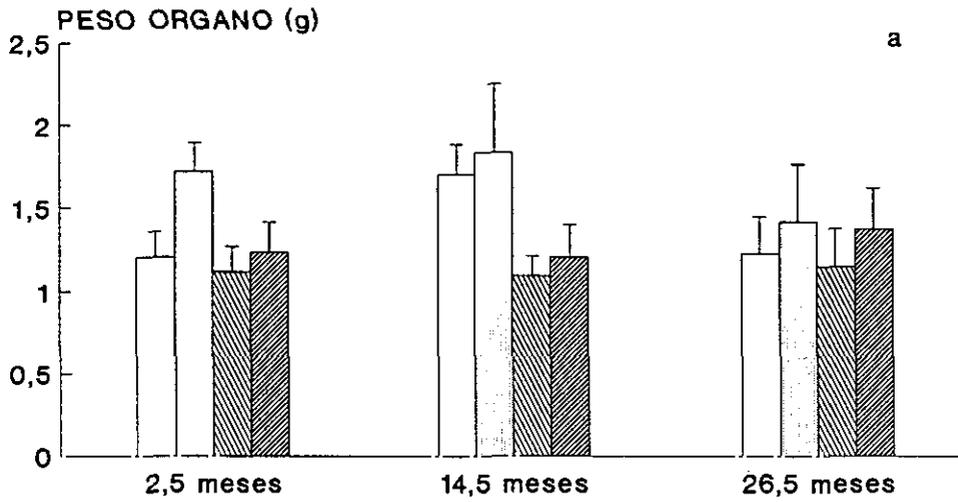
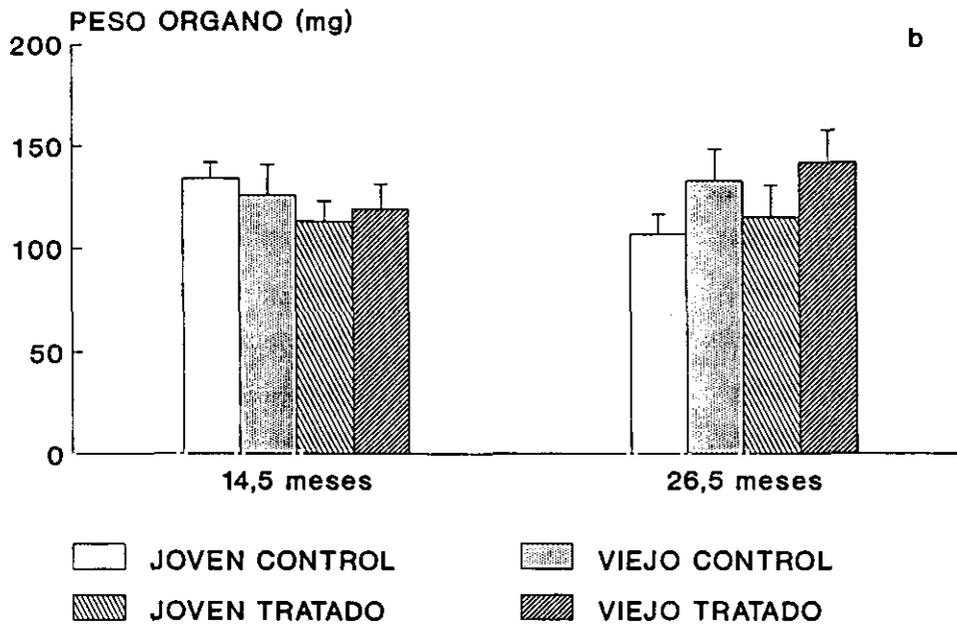
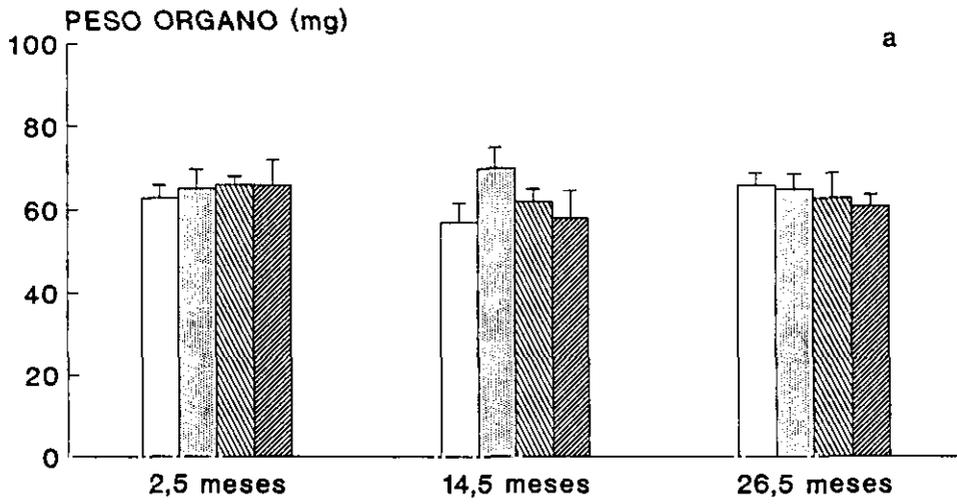


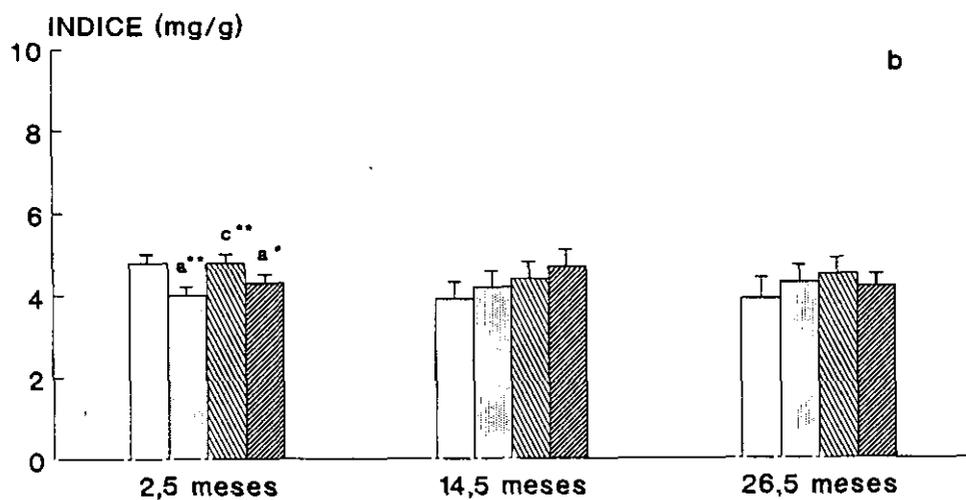
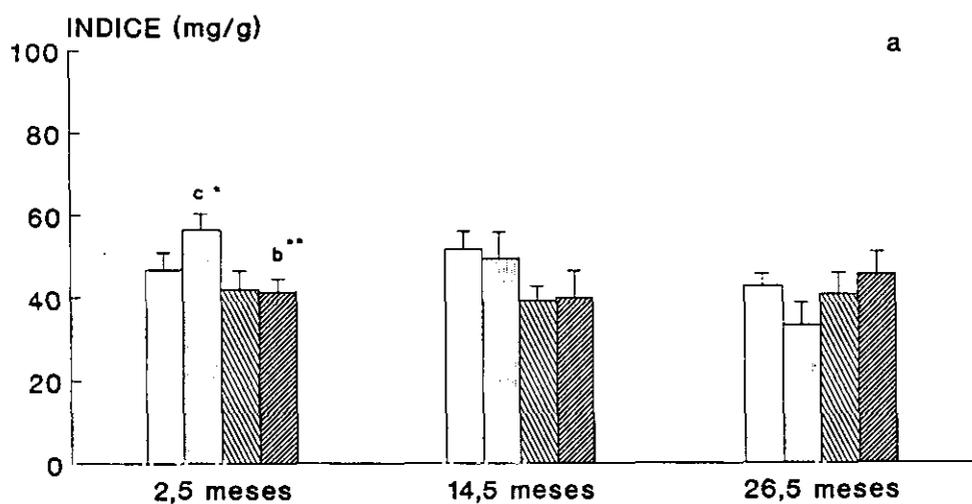
Figura 6.- Variación del peso corporal de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* durante el período experimental. Los resultados se expresan como la media aritmética. El error estándar oscila en todos los casos entre 5-10% de la media.



**Figura 7.-** Peso total de hígado (a) y pulmón (b) de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.



**Figura 8.-** Peso total de cerebro (a) y riñón (b) de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.



JOVEN CONTROL       VIEJO CONTROL  
 JOVEN TRATADO       VIEJO TRATADO

**Figura 9.-** Índice organo-somático de hígado (a) y pulmón (b) de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

a: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos del mismo tratamiento.

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

c: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos de distinto tratamiento.

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ )

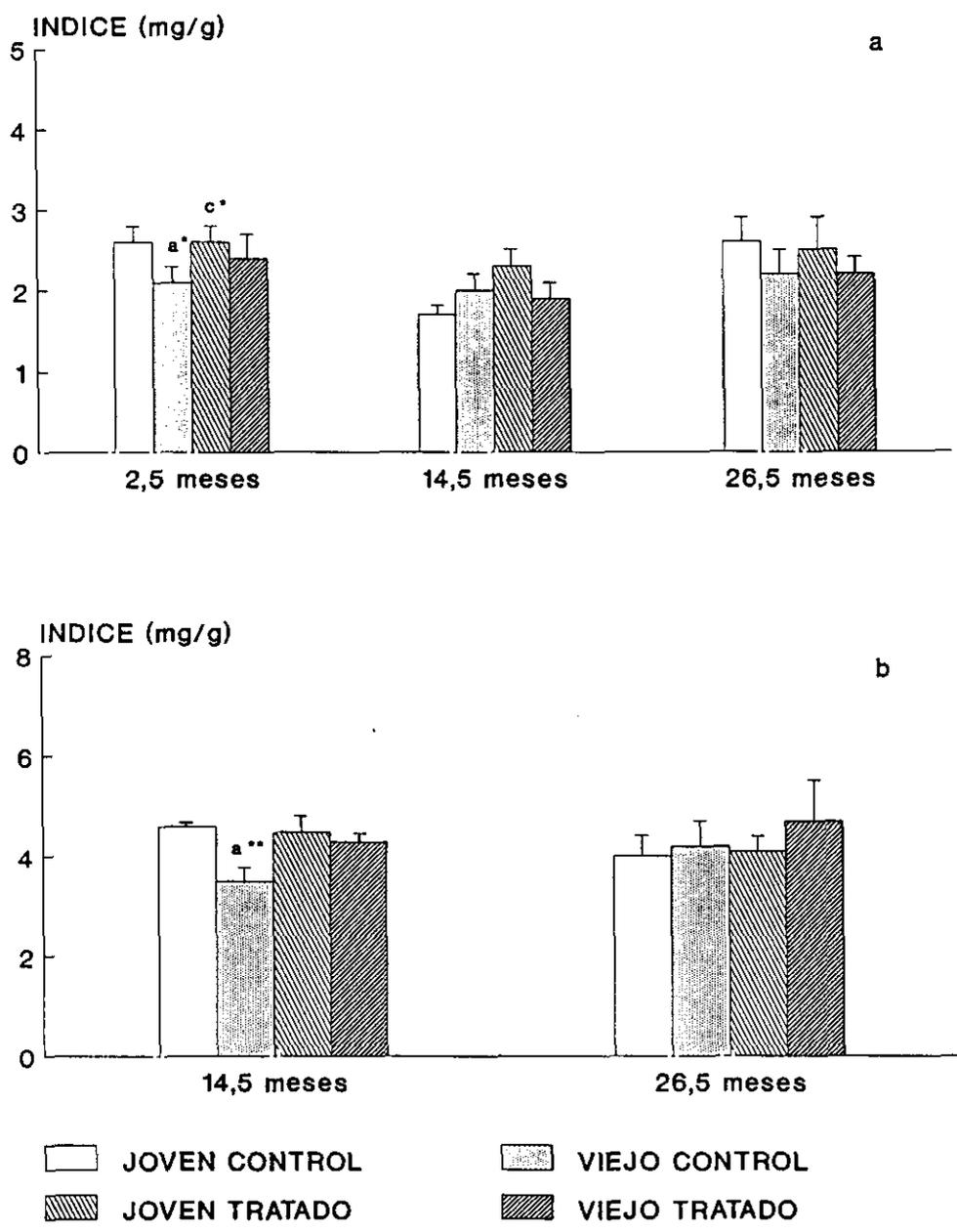


Figura 10.- Índice organo-somático de cerebro (a) y riñón (b) de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

a: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos del mismo tratamiento.

c: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos de distinto tratamiento.

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ )

**Tabla 1.-** Índice organo-somático del hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	INDICE ORGANO-SOMATICO (mg/g)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	46,9± 3,9 (9)	51,8± 4,2 (6)	42,6± 3,0 (6)
VIEJO CONTROL	56,5± 3,9 (9)	49,4± 6,8 (6)	33,2± 5,7 (6) <sup>a**</sup>
JOVEN TRATADO	41,9± 4,7 (10)	39,1± 3,4 (6)	40,6± 5,1 (6)
VIEJO TRATADO	41,4± 2,9 (10)	39,8± 6,4 (6)	45,3± 5,9 (6)

**Tabla 2.-** Índice organo-somático del pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	INDICE ORGANO-SOMATICO (mg/g)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	4,8 ± 0,2 (10)	3,9 ± 0,4 (6)	3,9 ± 0,5 (6)
VIEJO CONTROL	4,0 ± 0,2 (10)	4,2 ± 0,4 (6)	4,3 ± 0,4 (6)
JOVEN TRATADO	4,8 ± 0,2 (10)	4,4 ± 0,4 (6)	4,5 ± 0,4 (6)
VIEJO TRATADO	4,3 ± 0,2 (10)	4,7 ± 0,4 (5)	4,2 ± 0,3 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\*\* (p<0,01)

( ) = número de datos

**Tabla 3.-** Índice organo-somático del cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	INDICE ORGANO-SOMATICO (mg/g)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	2,6 ± 0,2 (10)	1,7 ± 0,1 (6) <sup>a*</sup>	2,6 ± 0,3 (6) <sup>b*</sup>
VIEJO CONTROL	2,1 ± 0,2 (10)	2,0 ± 0,2 (6)	2,2 ± 0,3 (6)
JOVEN TRATADO	2,6 ± 0,2 (10)	2,3 ± 0,2 (6)	2,5 ± 0,4 (6)
VIEJO TRATADO	2,4 ± 0,3 (10)	1,9 ± 0,2 (6)	2,2 ± 0,2 (6)

**Tabla 4.-** Índice organo-somático del riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	INDICE ORGANO-SOMATICO (mg/g)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	4,6 ± 0,1 (4)	4,0 ± 0,4 (5)
VIEJO CONTROL	3,5 ± 0,3 (4)	4,2 ± 0,5 (5)
JOVEN TRATADO	4,5 ± 0,3 (4)	4,1 ± 0,3 (5)
VIEJO TRATADO	4,3 ± 0,2 (4)	4,7 ± 0,8 (5)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p < 0,05)

( ) = número de datos

### C. Peroxidación tisular *in vitro*

La sensibilidad de los extractos tisulares a la peroxidación *in vitro* se estimó incubando los sobrenadantes de las muestras con ascorbato 0,4 mM y  $\text{FeSO}_4$  0,05 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 (2:1:1) a 25°C, y a distintos tiempos según los órganos. Esta incubación se llevó a cabo en un baño y con agitación. Los tiempos de incubación fueron 60 minutos para hígado, riñones y pulmones y 15 minutos para el cerebro. A estos tiempos, en cada caso, la peroxidación tisular no alcanza la saturación, lo cual se comprobó en experimentos previos.

Una vez terminada la incubación se llevó a cabo el ensayo del TBA de la forma descrita en el apartado anterior. En la fórmula es necesario incluir una modificación para tener en cuenta la dilución de la muestra debido a la incubación.

### 7.- Sistema del glutatión

Para la determinación del glutatión total, tanto en su forma reducida (GSH) como oxidada (GSSG), los órganos fueron homogeneizados rápidamente en ácido tricloroacético (TCA) al 1% conteniendo HCl 0,01 N, en homogeneizadores de vidrio tipo Pobel y en frío. Se empleó 1 ml de TCA por cada 50 mg de tejido excepto en el caso del cerebro, en el que se utilizó 1 ml por cada 25 mg de tejido. La solución de TCA fue previamente desoxigenada mediante el burbujeo de  $\text{N}_2$ . Experimentos previos muestran cómo de esta forma se reduce el grado de autoxidación del GSH, previo a su derivatización, evitando así valores de GSSG artificialmente altos. Una vez homogeneizadas, las muestras fueron centrifugadas a 3.200 g durante 5 minutos y a 5°C bajo atmósfera de nitrógeno. Los sobrenadantes fueron divididos en dos alícuotas utilizadas posteriormente para la medida del GSH total y GSSG respectivamente.

En la alícuota en la que se iba a medir el GSSG se añadió 4  $\mu\text{l}$  de 2-vinilpiridina por cada 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante. De esta forma se derivatiza el glutatión reducido al mismo tiempo que se neutralizan las muestras (Griffith, 1980). Después de una

El primer año de medidas (1989), después de 2,5 meses de tratamiento, sí aparecen diferencias significativas en el índice de todos los órganos debidas en unos casos a la edad y en otros al tratamiento.

El índice organo-somático del pulmón se ve afectado por la edad, resultando ser significativamente menor ( $p < 0,01$ ) en los animales viejos controles que en los jóvenes, tanto controles como tratados. Lo mismo ocurre con los viejos tratados ( $p < 0,05$ ) respecto a los jóvenes tratados.

En el caso del cerebro se trata también de un descenso del índice en el grupo viejo control ( $p < 0,05$ ) respecto al joven control y tratado. A lo largo de los tres años de periodo experimental, para este órgano se produce un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del índice en el grupo joven control a los 14,5 meses de tratamiento.

Con el hígado, lo que observamos después de 2,5 meses de tratamiento es un descenso del índice en los dos grupos tratados, jóvenes ( $p < 0,05$ ) y viejos ( $p < 0,01$ ), respecto al viejo control. En la evolución longitudinal hay que señalar el descenso progresivo de este índice en el grupo viejo control, descenso que llega a ser importante el último año ( $p < 0,01$ ).

## II. CONSUMO DE OXIGENO (Figura 11, Tabla 5)

En este apartado sólo observamos, después de 2,5 meses de tratamiento, un ligero incremento del consumo de oxígeno de los animales viejos tratados ( $p < 0,01$ ), no apreciándose ningún efecto debido a la edad en los animales controles.

El consumo de oxígeno sólo varía a lo largo del experimento en el grupo joven tratado produciéndose un incremento importante después de 26,5 meses de tratamiento, respecto al principio de éste ( $p < 0,01$ ). Este incremento es también significativo respecto a los resultados del segundo año, después de 14,5 meses de tratamiento ( $p < 0,05$ ).

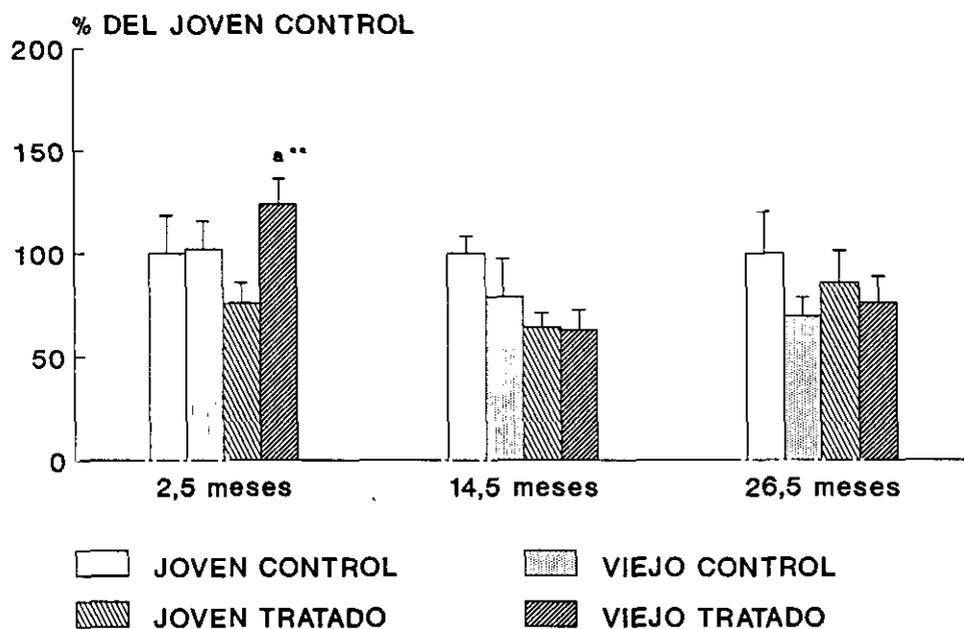


Figura 11.- Consumo de oxígeno de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

a: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos del mismo tratamiento.

\*\* (p<0,01)

**Tabla 5.-** Consumo de oxígeno de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	CONSUMO DE OXIGENO ( $\mu\text{IO}_2/\text{g} \cdot \text{h}$ )		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	65,5 $\pm$ 11,7 (9)	93,1 $\pm$ 7,3 (8)	113,0 $\pm$ 22,2 (5)
VIEJO CONTROL	67,1 $\pm$ 8,7 (9)	73,7 $\pm$ 17,1 (8)	78,6 $\pm$ 10,2 (5)
JOVEN TRATADO	49,8 $\pm$ 6,4 (8)	59,9 $\pm$ 6,5 (4)	97,3 $\pm$ 17,2 (4) <sup>b*,a**</sup>
VIEJO TRATADO	81,0 $\pm$ 7,8 (8)	58,7 $\pm$ 9,1 (8)	86,2 $\pm$ 14,8 (5)

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p<0,05)

\*\* (p<0,01)

( ) = número de datos

### **III. ESTUDIO ANUAL POR ORGANOS**

#### **1.- 2,5 meses de tratamiento**

##### **A. Hígado**

###### **Actividades enzimáticas (Figura 12a)**

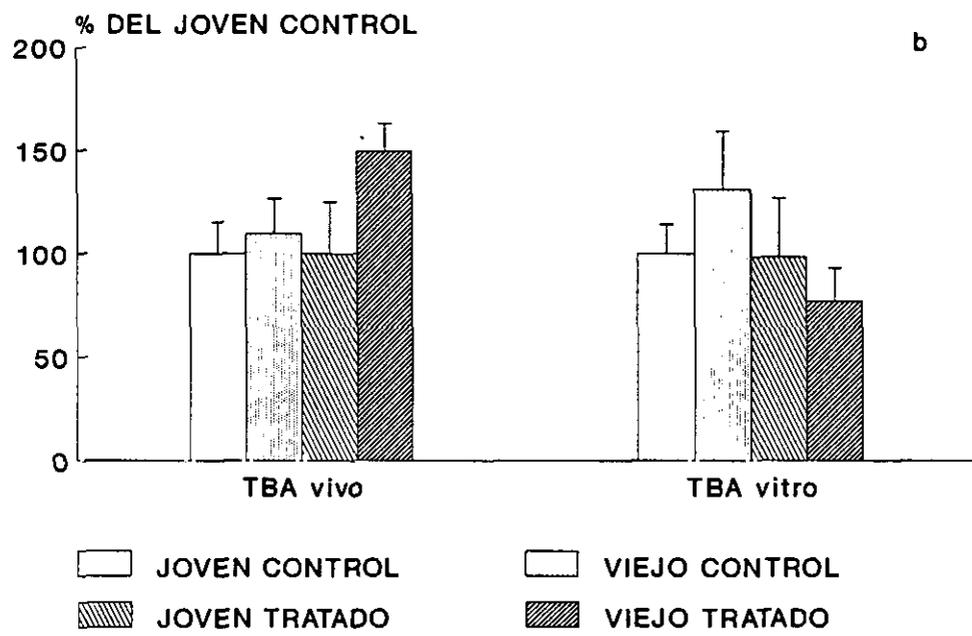
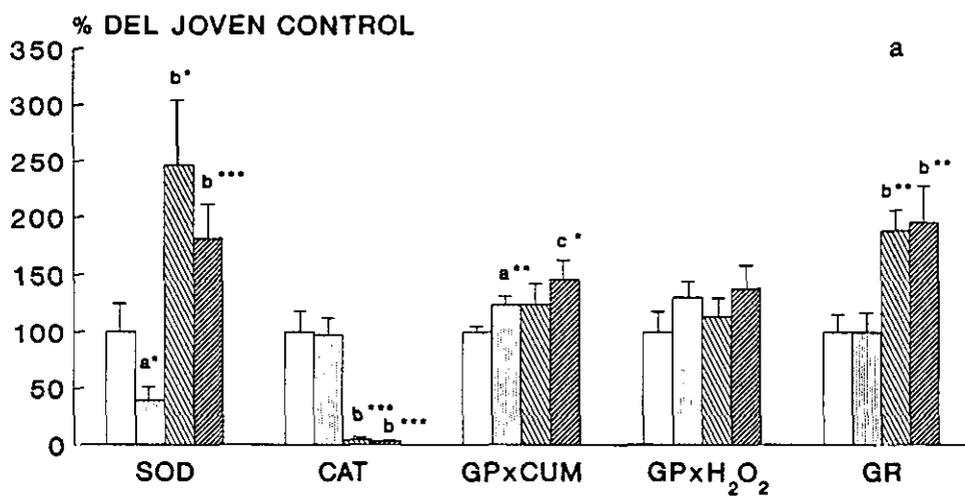
Al analizar las distintas enzimas antioxidantes y la citocromo c oxidasa después de 2,5 meses de tratamiento, observamos que no se producen cambios en función de la edad en la mayor parte de las enzimas tanto en los animales controles como en los tratados.

Sólo en el caso de la SOD se aprecia un efecto de la edad que determina un menor nivel de actividad superóxido dismutasa, llegando a ser significativo este descenso en el grupo viejo control ( $p < 0,05$ ).

También hay que señalar un incremento de la actividad GPx total (utilizando hidropéroxido de cumeno como sustrato) en los animales viejos, tanto tratados ( $p < 0,05$ ) como controles ( $p < 0,01$ ) respecto a los jóvenes controles. Como la GPx Se dependiente no ha cambiado en función de la edad, los incrementos observados parecen deberse a la actividad no Se dependiente.

Por otro lado, comprobamos que el tratamiento ha resultado efectivo ya que después de diez semanas la actividad catalasa se encuentra inhibida en más de un 95% en los dos grupos tratados respecto a los controles ( $p < 0,001$ ).

No ocurre lo mismo con la actividad superóxido dismutasa que, lejos de verse inhibida, resulta inducida en los grupos tratados, tanto joven ( $p < 0,05$ ) como viejo ( $p < 0,001$ ) entre un 150 y un 81%, a pesar de que experimentos previos habían mostrado una inhibición del 45% después de una semana de tratamiento con la dosis de DDC utilizada.



**Figura 12.-** Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

a: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos del mismo tratamiento.  
 b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.  
 c: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos de distinto tratamiento.

\* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\* (p<0,001)

La actividad glutatión reductasa también resulta inducida en los animales tratados respecto a sus controles ( $p < 0,01$ ) en casi un 100%.

Por último, los dos tipos de actividad GPx no se ven afectadas por el tratamiento.

#### **Peroxidación tisular (Figura 12b)**

En este apartado no hay que señalar ningún tipo de efecto significativo debido a la edad o al tratamiento tanto en la peroxidación *in vivo* como *in vitro*. No obstante, sí se observa una tendencia a presentar valores inferiores de peroxidación *in vitro* en el caso de los grupos tratados.

La peroxidación después de 60 minutos de estimulación con ascorbato y  $\text{FeSO}_4$  da lugar a unos valores de sustancias TBA positivas significativamente mayores que los endógenos (peroxidación *in vivo*).

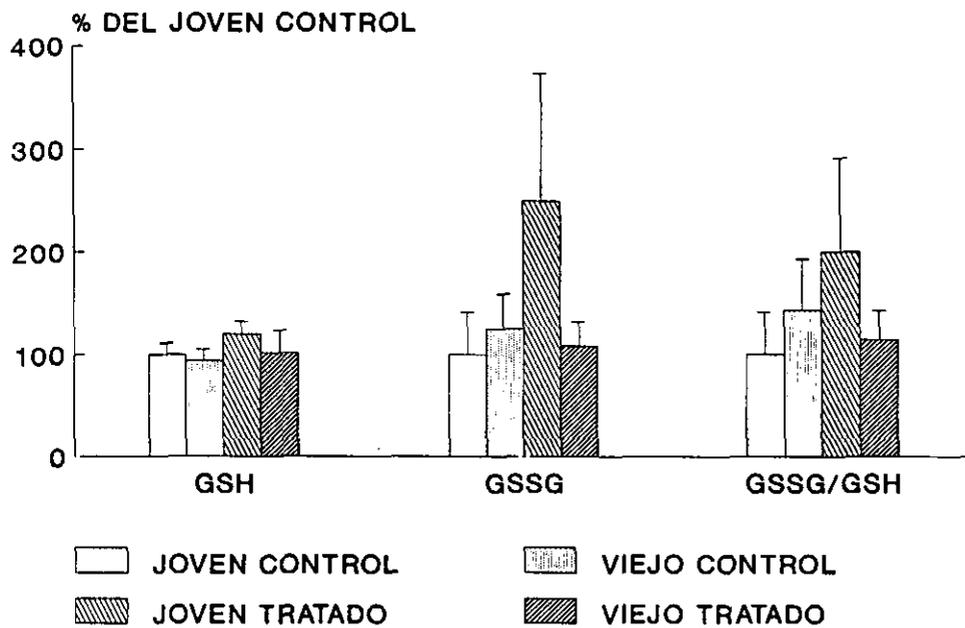
#### **Sistema del glutatión (Figura 13)**

En los distintos grupos experimentales ni la edad ni el tratamiento modificaron significativamente ninguno de los parámetros, GSH, GSSG o GSSG/GSH. Sin embargo, sí existe una tendencia a presentar valores más altos de GSSG en los animales jóvenes tratados.

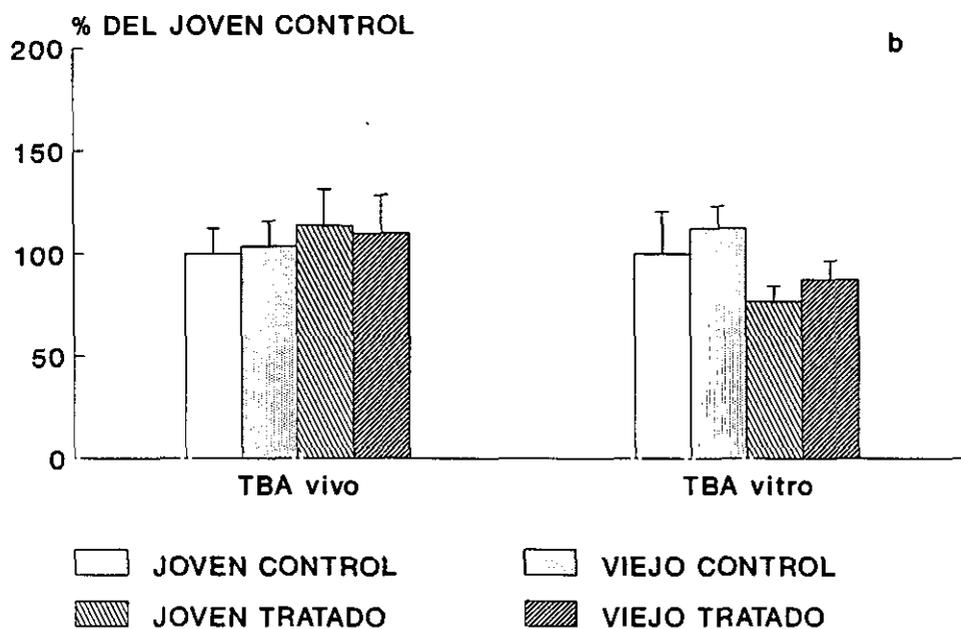
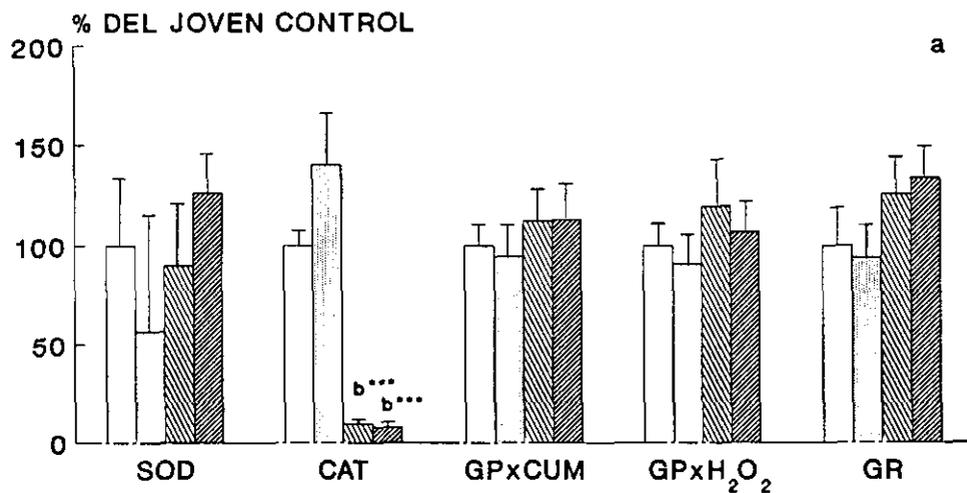
### **B. Pulmón**

#### **Actividades enzimáticas (Figura 14a)**

De nuevo podemos comprobar la efectividad del tratamiento con inhibiciones de la actividad catalasa de más del 90% en los dos grupos tratados ( $p < 0,001$ ).



**Figura 13.-** Sistema del glutatión en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).



**Figura 14.-** Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).  
 b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.  
 \*\*\* ( $p < 0,001$ )

---

El resto de las actividades enzimáticas no se vieron afectadas, ni por la edad ni por el tratamiento, aunque en el caso de la glutatión reductasa se observa una tendencia a presentar valores más altos en los dos grupos tratados.

#### **Peroxidación tisular (Figura 14b)**

El nivel de sustancias TBA positivas endógenas es similar en los distintos grupos, independientemente de la edad o del tratamiento; lo mismo ocurre con la peroxidación estimulada *in vitro*.

#### **Sistema del glutatión (Figura 15)**

Tampoco aquí hay que señalar diferencias entre los grupos debidas a la edad o al tratamiento, aunque sí se observa una tendencia a presentar niveles más altos de GSSG y GSSG/GSH en los grupos tratados.

### **C. Cerebro**

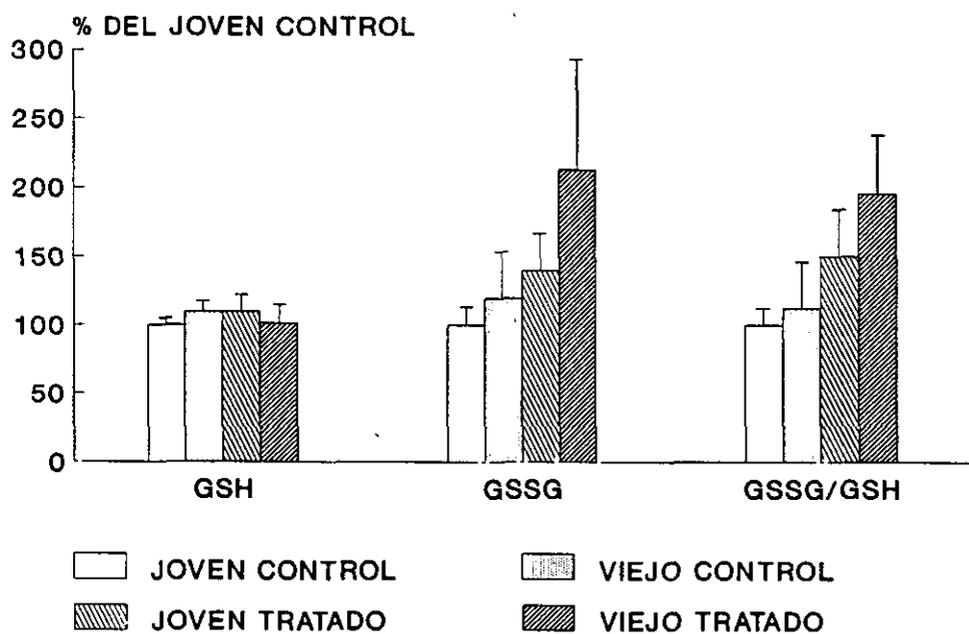
#### **Actividades enzimáticas (Figura 16a)**

En este órgano también se observa una inhibición de la actividad catalasa en los dos grupos tratados, joven ( $p < 0,001$ ) y viejo ( $p < 0,05$ ) que oscila entre un 85-90%.

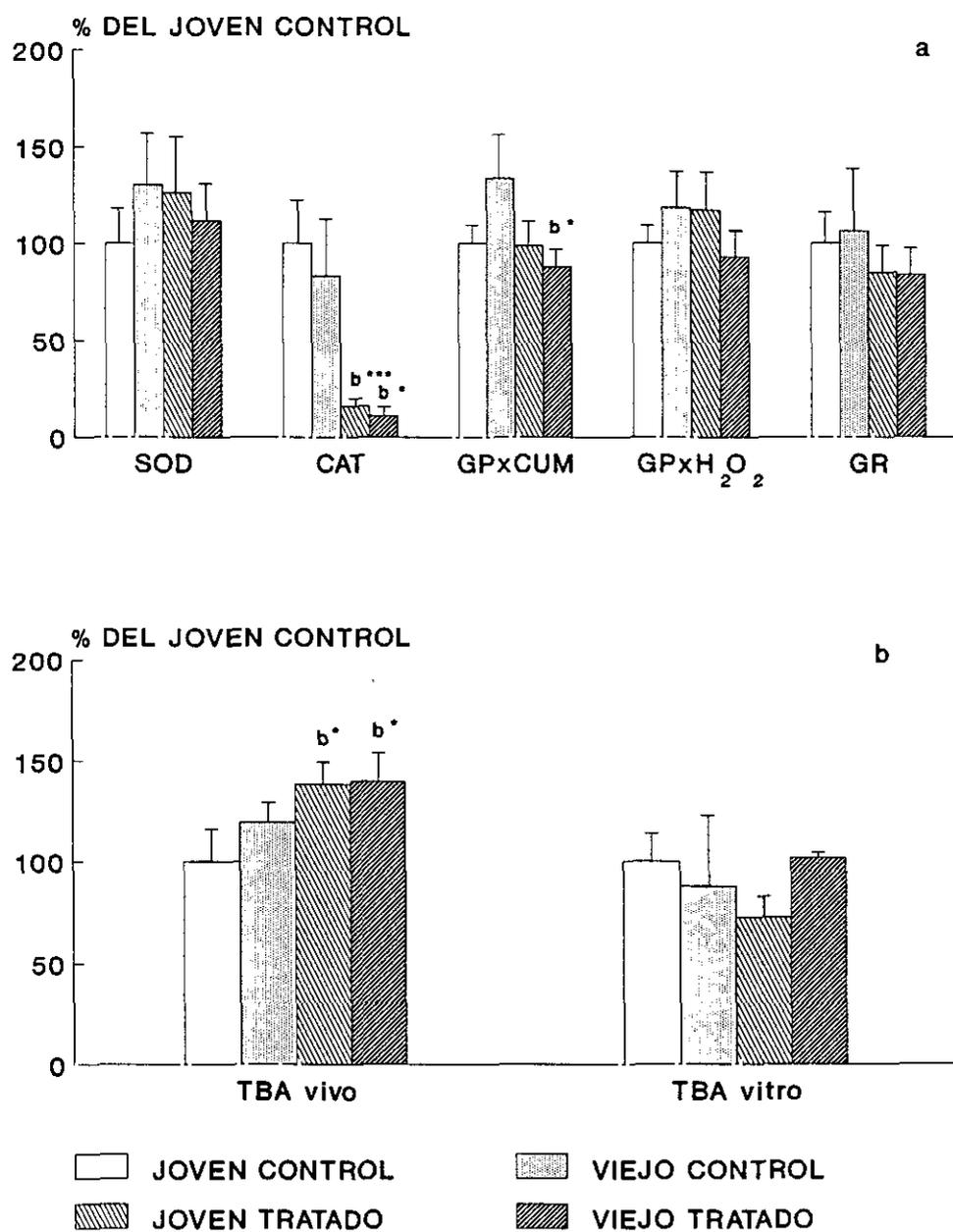
El intento de inhibir la actividad superóxido dismutasa tampoco ha resultado efectivo en este caso a diferencia de lo encontrado en experimentos previos en los que tras una semana de tratamiento con esta dosis de DDC se alcanzaron inhibiciones del 79%.

El tratamiento provoca aquí un descenso de la actividad glutatión peroxidasa utilizando hidroperóxido de cumeno como sustrato, que es significativo solamente en el caso del grupo viejo tratado.

El resto de las enzimas no se ven afectadas por el tratamiento ni por la edad.



**Figura 15.-** Sistema del glutatión en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).



**Figura 16.-** Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).  
 b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.  
 \* (p<0,05); \*\*\* (p<0,001)

### **Peroxidación tisular (Figura 16b)**

Los niveles de peroxidación tisular *in vivo* no varían en función de la edad, pero sí se produce un aumento de estos niveles debido al tratamiento ( $p < 0,05$ ) en los dos grupos de edad.

Por el contrario, la sensibilidad a la peroxidación estimulada *in vitro* no varía en función de la edad o del tratamiento.

### **Sistema del glutatión (Figura 17)**

Tampoco en esta ocasión la edad o el tratamiento afectan a los niveles de GSH. En cuanto al GSSG, sus niveles en este órgano fueron inferiores al límite de detección.

### **D. Curva de supervivencia (Figura 18)**

La tasa de supervivencia en este punto del experimento fue la misma en todos los grupos (100%) excepto en el de animales viejos tratados en el que murió un animal (98%)

## **2.- 14,5 meses de tratamiento**

### **A. Hígado**

#### **Actividades enzimáticas (Figura 19a)**

Después de 14,5 meses, el tratamiento continúa siendo efectivo, con inhibiciones de la actividad CAT de alrededor del 90% en los dos grupos tratados ( $p < 0,001$ ).

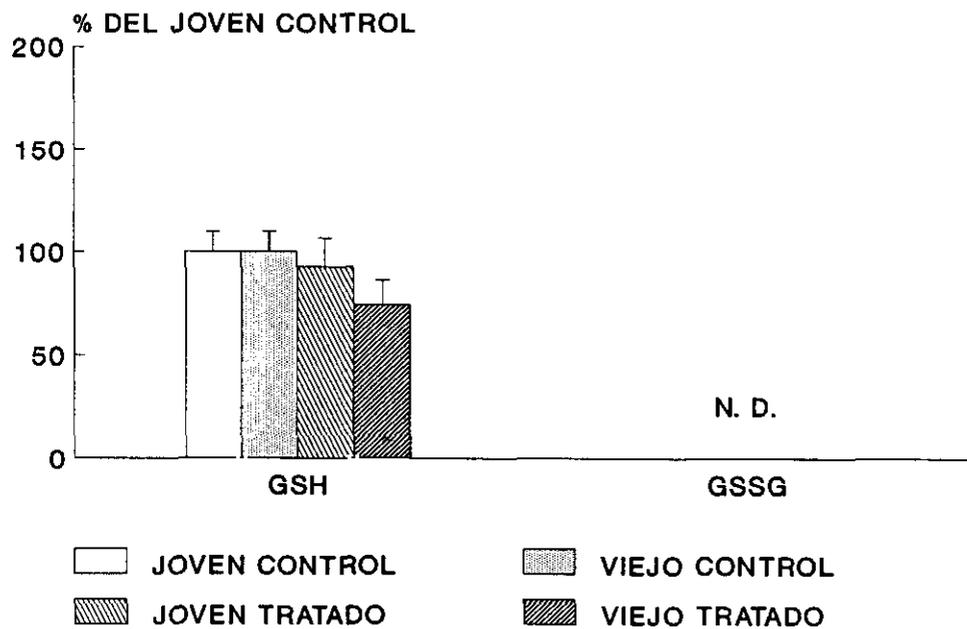


Figura 17.- Sistema del glutati3n en el cerebro de animales j3venes y viejos de *Rana perezi* despu3s de 2,5 meses de tratamiento. Los resultados est3n expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

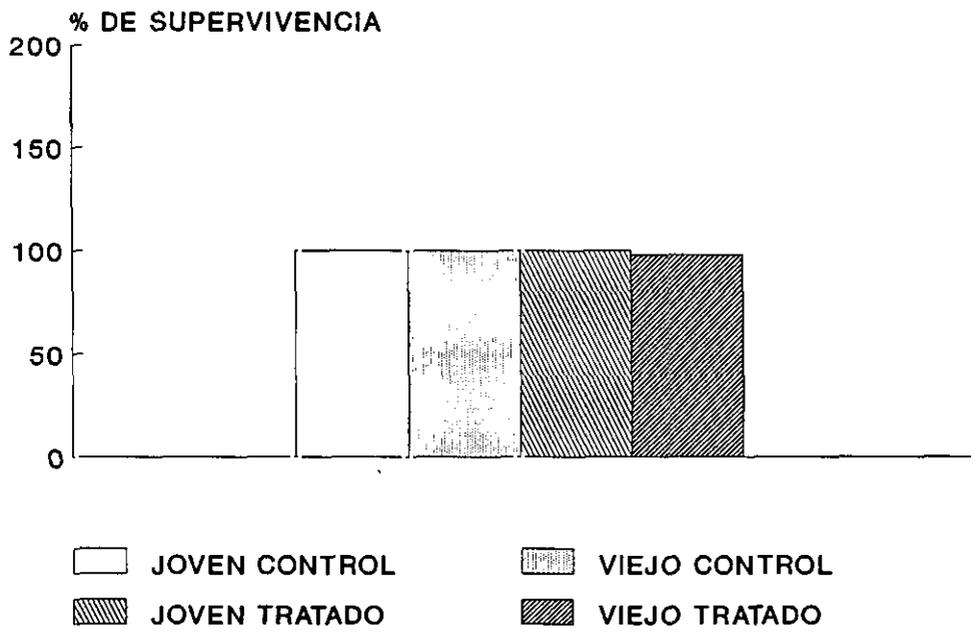
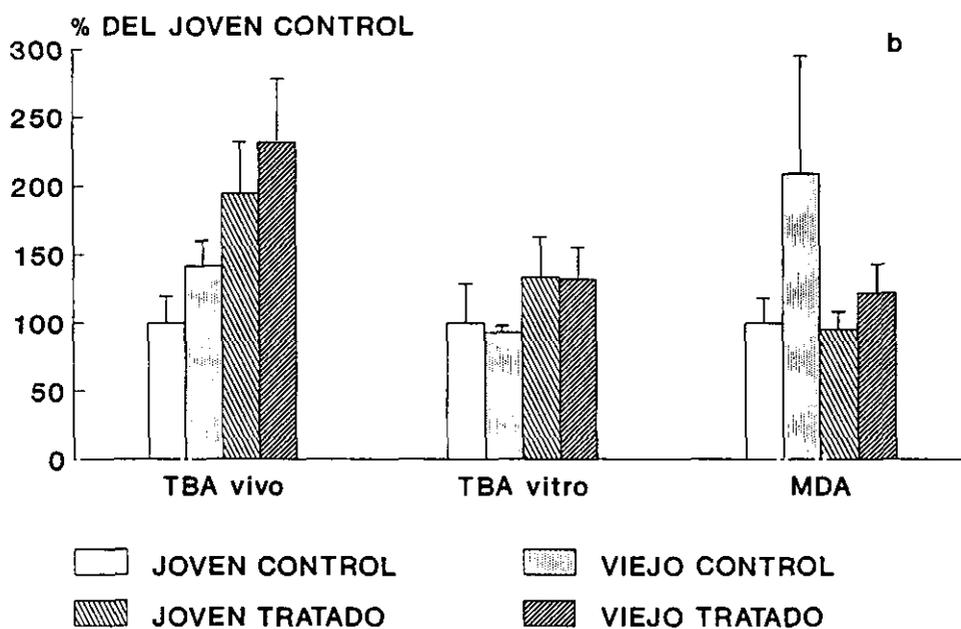
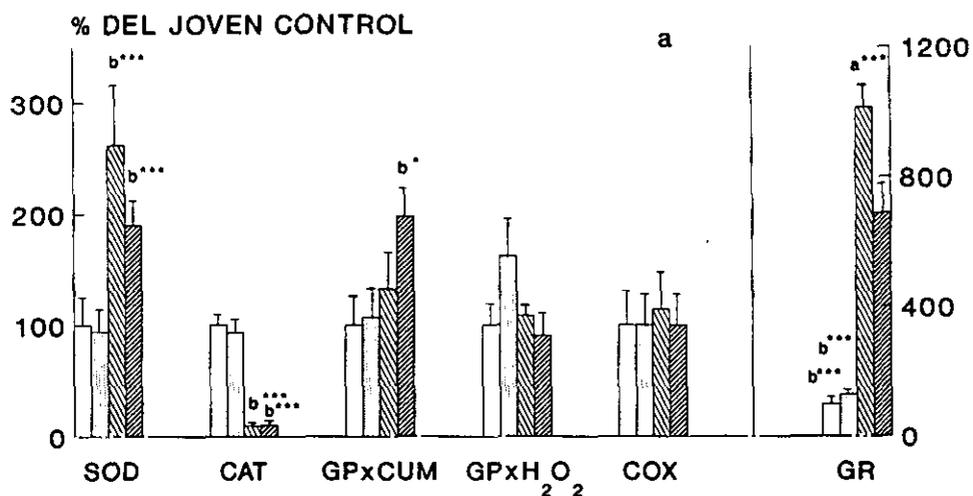


Figura 18.- Curva de supervivencia de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5 meses de tratamiento.



**Figura 19.-** Actividades enzimáticas (a), y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* y MDA (b) en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).  
 a: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos del mismo tratamiento.  
 b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.  
 \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ )

También se mantienen o aumentan (160-100%) las inducciones de actividad superóxido dismutasa en estos grupos ( $p < 0,001$ ). En el caso de la actividad glutatión reductasa (0,001) la inducción es ahora mucho más potente que la observada el año anterior, alcanzando valores del 900-600% y parece que la edad disminuye (50%) la intensidad de dicha inducción ( $p < 0,001$ ).

El tratamiento además provoca la inducción de la actividad GPx utilizando hidroperóxido de cumeno como sustrato, aunque sólo alcanza la significación en el caso del grupo viejo tratado ( $p < 0,05$ ).

Las demás actividades no se ven modificadas ni por la edad ni por el tratamiento.

#### **Peroxidación tisular y MDA (Figura 19b)**

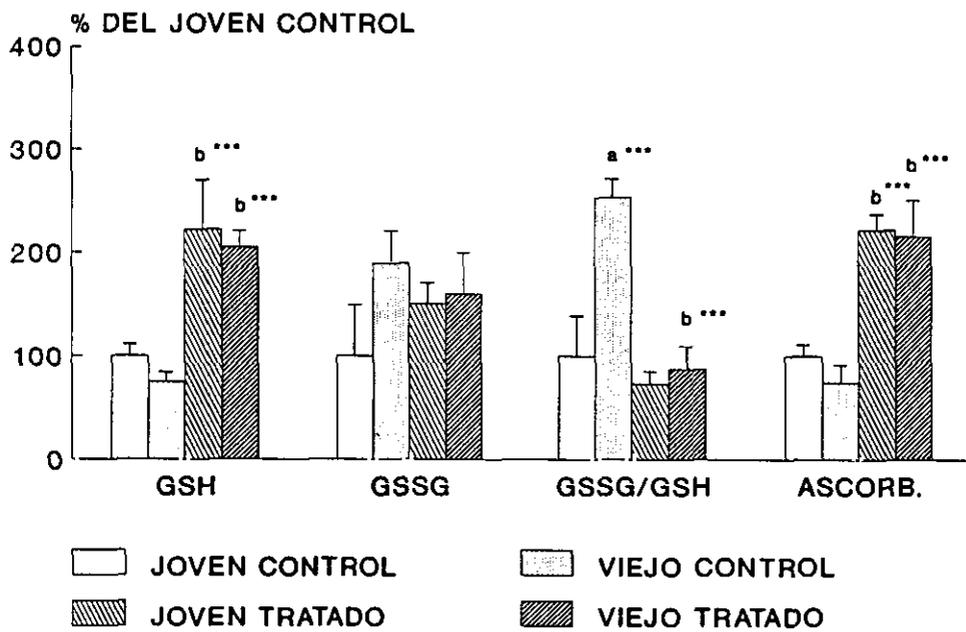
No se observan diferencias significativas en la peroxidación tisular ni en los niveles de malondialdehído determinados por HPLC en ningún caso.

#### **Sistema del glutatión y ácido ascórbico (Figura 20)**

El tratamiento provoca un aumento en los niveles de GSH (120-100%) y de ácido ascórbico (120-116%) en los animales jóvenes y viejos respectivamente ( $p < 0,001$ ).

En cuanto al cociente GSSG/GSH, el incremento que se observa debido a la edad en el grupo viejo control ( $p < 0,001$ ) se vio contrarrestado por el tratamiento, resultando significativamente menores ( $p < 0,001$ ) los valores en el grupo viejo tratado si lo comparamos con el viejo control.

### **B. Pulmón**



**Figura 20.-** Sistema del glutatión y ácido ascórbico en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

a: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos del mismo tratamiento.

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

\*\*\* ( $p < 0,001$ )

### **Actividades enzimáticas (Figura 21a)**

La inhibición de la actividad catalasa (alrededor del 90%) debida al tratamiento se mantiene ( $p < 0,001$ ) independientemente de la edad de los animales.

Además, después de 14,5 meses, es apreciable también en este órgano una inducción de la actividad GR (cerca del 50%) en los dos grupos tratados ( $p < 0,05$ ).

En el resto de las actividades enzimáticas no se observan diferencias debidas a la edad o al tratamiento.

### **Peroxidación tisular (Figura 21b)**

No cabe señalar diferencias significativas en este apartado.

### **Sistema del glutatión (Figura 22)**

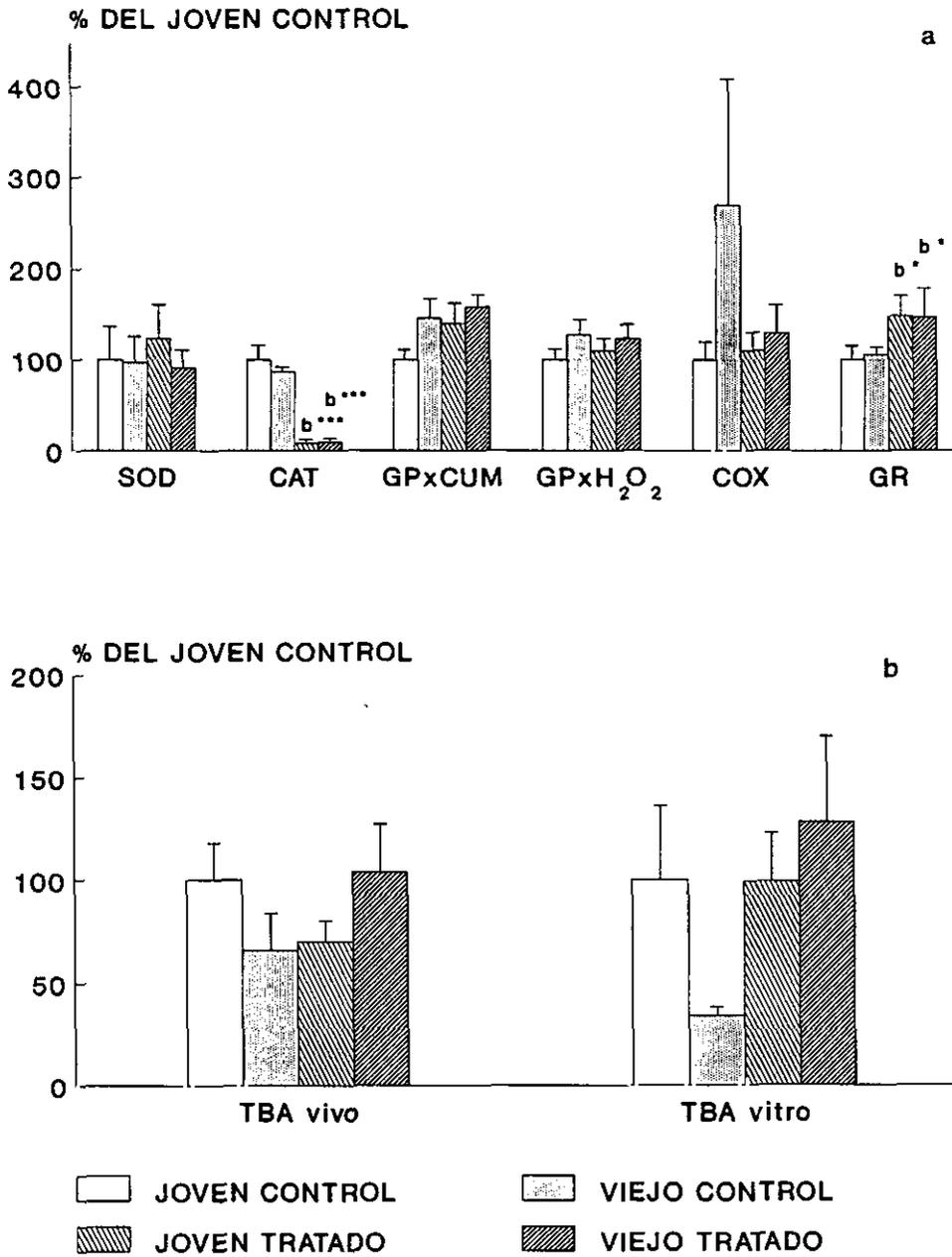
En este caso tampoco las diferencias alcanzaron la significación, pero sí parece existir una tendencia a presentar valores de GSH mayores y de GSSG/GSH menores en los dos grupos tratados.

## **C. Cerebro**

### **Actividades enzimáticas (Figura 23a)**

La inhibición de la actividad CAT (alrededor del 90%) debida al tratamiento también se mantiene en este órgano ( $p < 0,001$ ) en los dos grupos de edad.

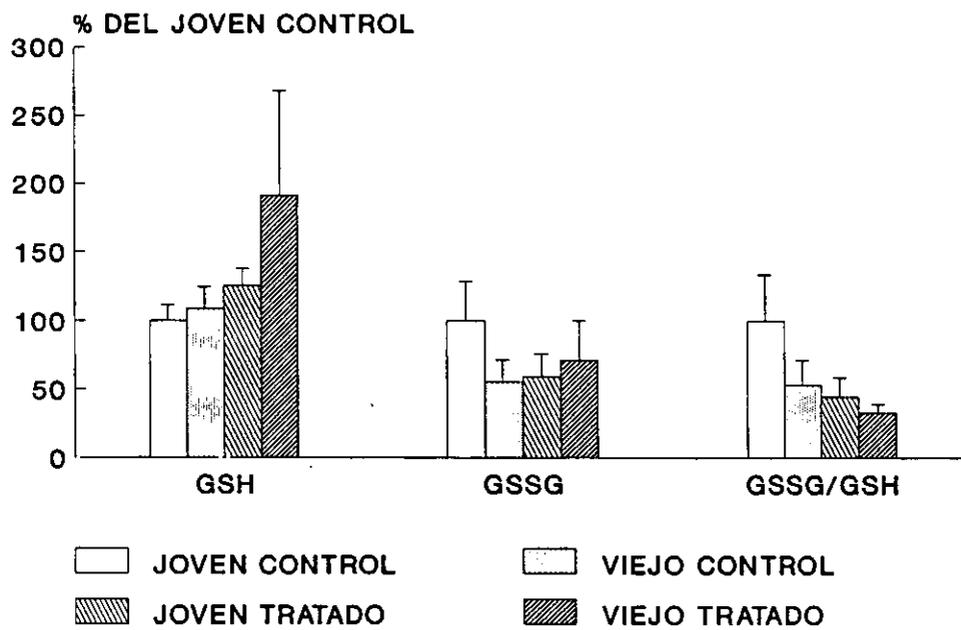
Y, al igual que ocurría con el pulmón, hay que señalar la inducción de la actividad GR ( $p < 0,05$ ) debida al tratamiento (50-100%).



**Figura 21.-** Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.  
 \* (p<0,05); \*\*\* (p<0,001)

\* (p<0,05); \*\*\* (p<0,001)



**Figura 22.-** Sistema del glutati3n en el pulm3n de animales j3venes y viejos de *Rana perezi* despu3s de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados est3n expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

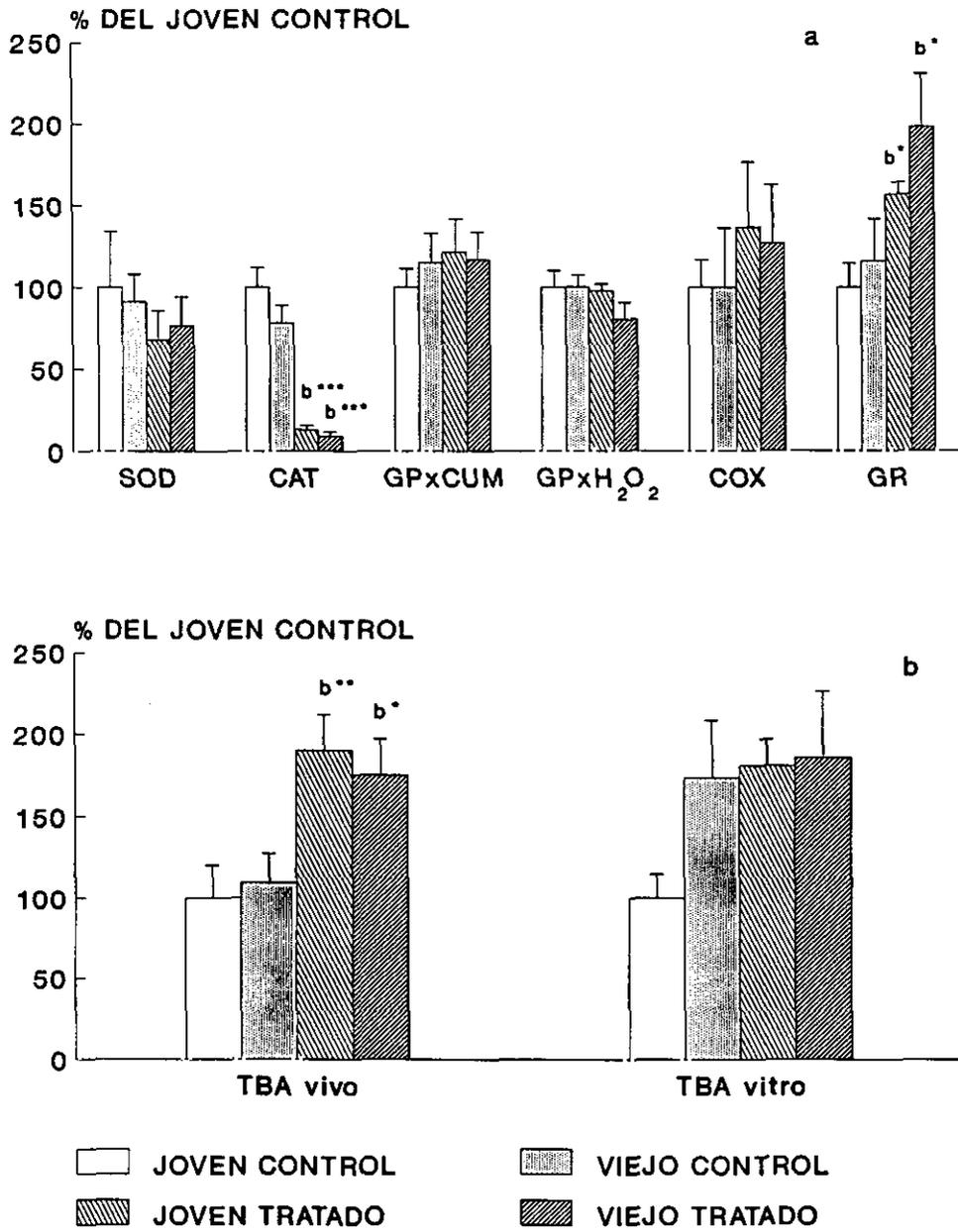


Figura 23.- Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%). b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad. \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\* (p<0,001)

La actividad de las demás enzimas antioxidantes analizadas, así como la de la citocromo c oxidasa, no se ven afectadas por el tratamiento y tampoco hay diferencias atribuibles a la edad.

#### **Peroxidación tisular (Figura 23b)**

El tratamiento crónico con AT ha tenido efecto sobre los niveles de peroxidación tisular *in vivo*, incrementándolos tanto en el caso del grupo joven tratado ( $p < 0,01$ ) como del viejo ( $p < 0,05$ ).

No ocurre lo mismo con la peroxidación estimulada *in vitro*. La edad sigue la pauta más generalizada en este estudio y no parece dar lugar a ninguna variación.

#### **Sistema del glutatión (Figura 24)**

Ni la edad ni el tratamiento tuvieron efecto alguno sobre los niveles de GSH, que son similares en los cuatro grupos experimentales.

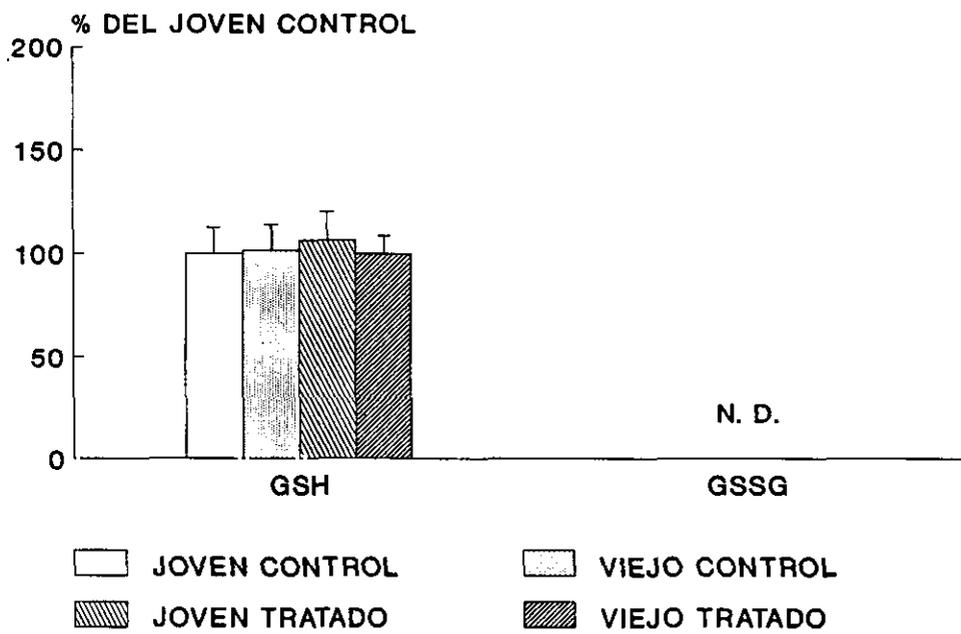
### **D. Riñón**

#### **Actividades enzimáticas (Figura 25a)**

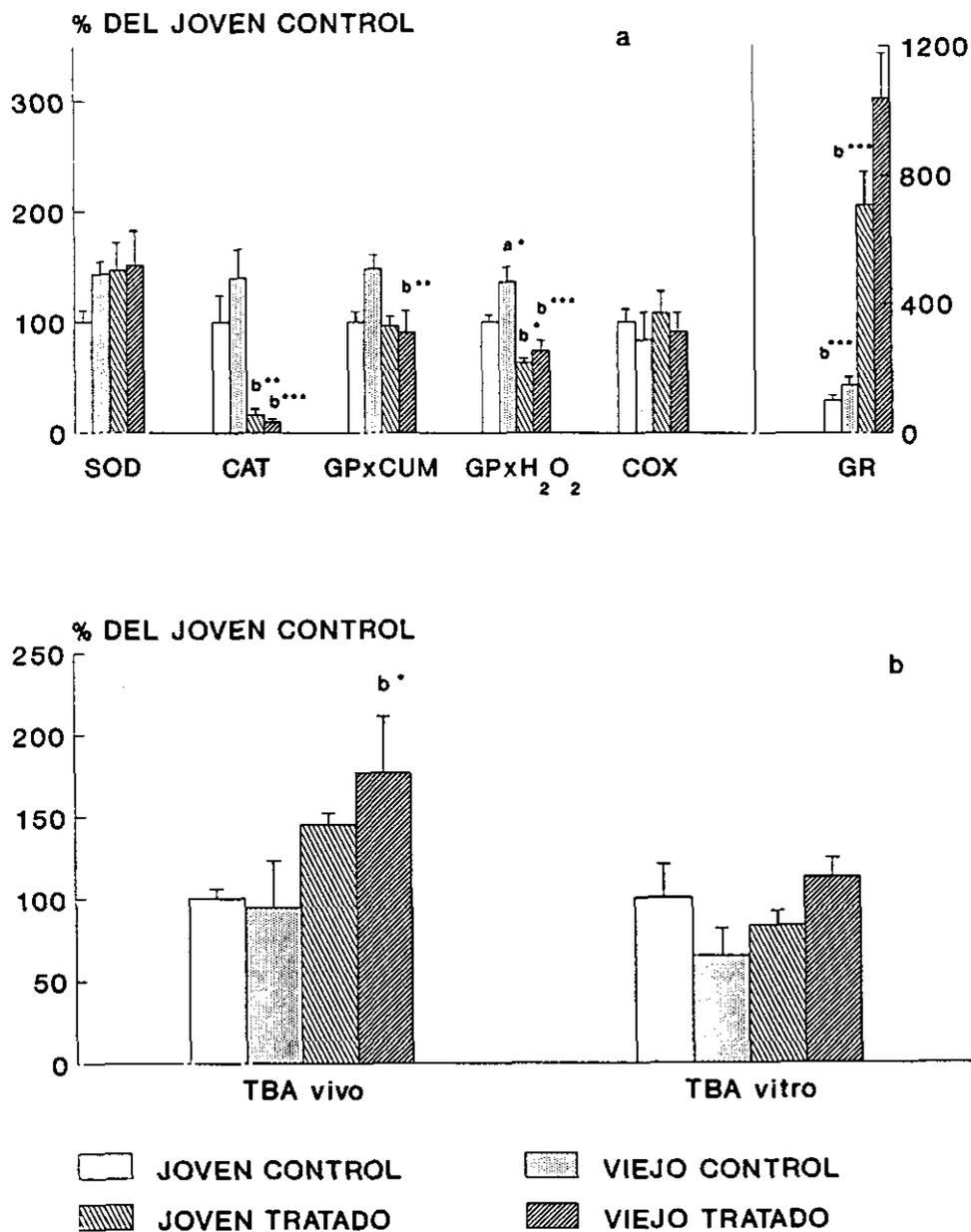
La inhibición de la actividad CAT debida al tratamiento ha resultado una vez más muy eficaz en los animales tanto jóvenes ( $p < 0,01$ ) como viejos ( $p < 0,001$ ). La inhibición oscila entre el 90 y el 85% respectivamente.

También aquí, como en los demás órganos, la actividad GR se induce como consecuencia del tratamiento ( $p < 0,001$ ). Los incrementos resultan muy acusados (600%-940%), como en el hígado, alcanzando actividades de hasta nueve veces la del control.

Además, en este órgano el tratamiento afecta también a la actividad GPx. Y así, usando hidroperóxido de cumeno como sustrato, el tratamiento provoca un descenso



**Figura 24.-** Sistema del glutatión en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).



**Figura 25.-** Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

a: diferencia significativa entre animales jóvenes y viejos del mismo tratamiento

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ )

de esta actividad que sólo llega a ser significativo en el caso del grupo viejo tratado respecto al viejo control ( $p < 0,01$ ). Cuando el sustrato utilizado es peróxido de hidrógeno, el descenso de actividad es aún mayor en el caso del grupo viejo tratado ( $p < 0,001$ ), descenso que también alcanza la significación en el grupo joven tratado ( $p < 0,05$ ). Así mismo, la edad también parece en esta ocasión afectar a la actividad, observándose un incremento en el grupo viejo control ( $p < 0,05$ ).

#### **Peroxidación tisular (Figura 25b)**

Se detectó un ligero incremento de la peroxidación *in vivo* debido al tratamiento, en el grupo viejo tratado ( $p < 0,05$ ) respecto al viejo control, pero no en los animales jóvenes.

#### **Sistema del glutatión y ácido ascórbico (Figura 26)**

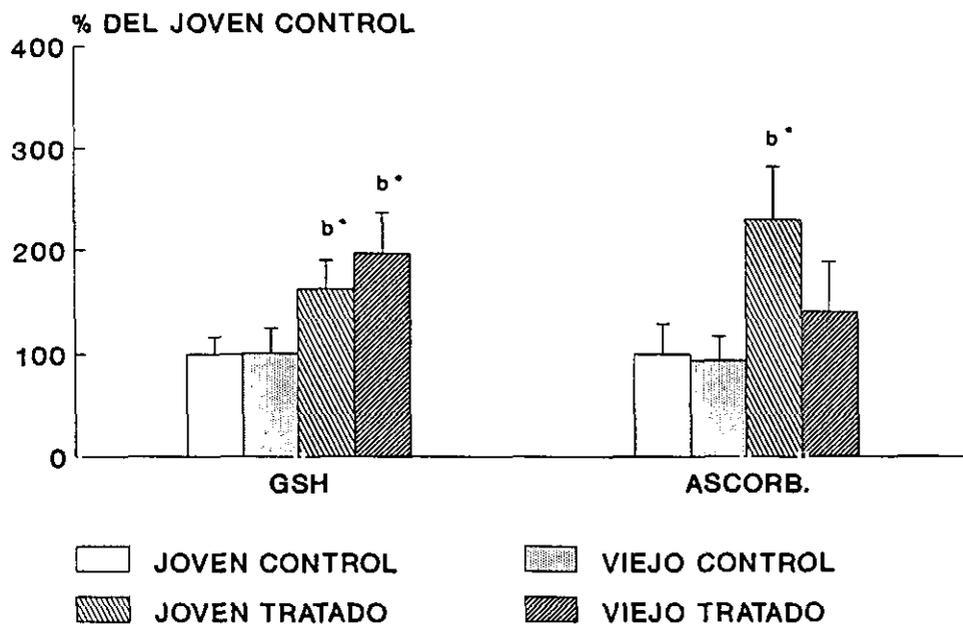
El tratamiento provoca la inducción ( $p < 0,05$ ) tanto del GSH (60-90%) como del ácido ascórbico (130%), aunque en el caso del ácido ascórbico el incremento en el grupo viejo tratado no alcanza la significación estadística.

#### **E. Curva de supervivencia (Figura 27)**

Después de 14,5 meses de tratamiento y como era de esperar, la tasa de supervivencia fue mayor en los animales jóvenes que en los viejos. En cuanto al efecto del tratamiento, dentro del mismo grupo de edad, la tasa de supervivencia fue mucho mayor en los grupos tratados que en los controles. Este hecho fue especialmente relevante en el caso de los animales viejos, siendo la tasa de supervivencia de los controles de sólo un 46% frente al 91% de los tratados.

### **3.- 26,5 meses de tratamiento**

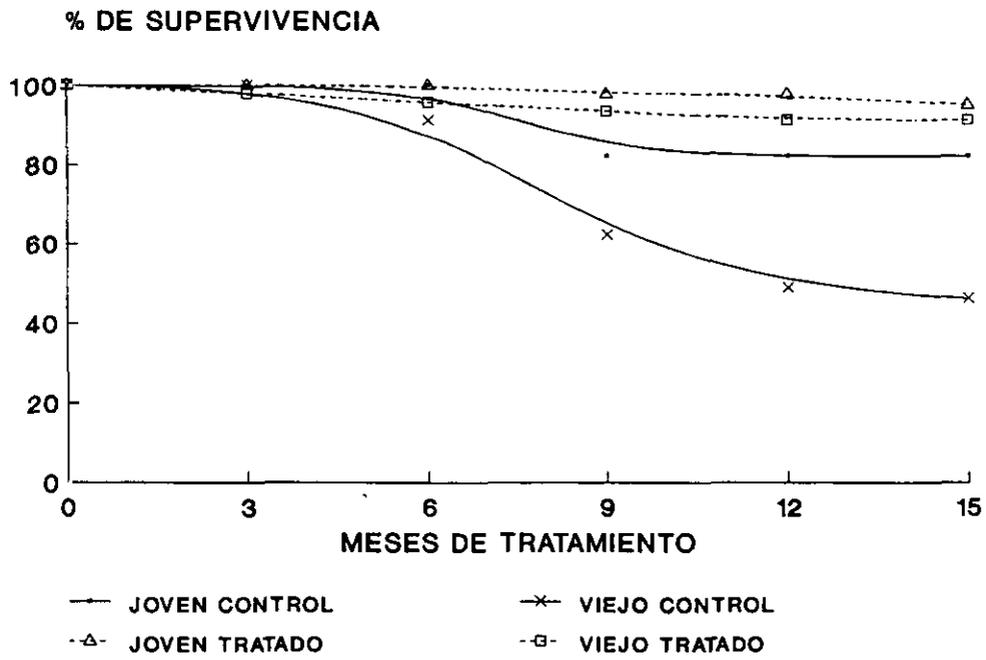
#### **A. Hígado**



**Figura 26.-** Sistema del glutatión y ácido ascórbico en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

\* ( $p < 0,05$ )



**Figura 27.-** Curva de supervivencia de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento.

### **Actividades enzimáticas (Figura 28a)**

La actividad CAT después de 26,5 meses de tratamiento se mantiene inhibida en los dos grupos tratados ( $p < 0,001$ ) en más de un 95%, como ha ocurrido a lo largo de todo el periodo experimental.

En cuanto a las inducciones debidas al tratamiento observadas el año anterior, siguen existiendo (540-600%) en el caso de la GR ( $p < 0,001$ ) aunque la magnitud de la inducción es ahora mucho menor que la observada a los 14,5 meses de tratamiento; en cuanto a la SOD, su inducción ha dejado de ser significativa en el grupo viejo tratado y ha disminuido ( $p < 0,05$ ) en el grupo joven tratado (120%). No se observa ningún efecto del tratamiento sobre las demás actividades enzimáticas.

De igual forma, la edad tampoco determina variaciones en ninguna de las actividades enzimáticas en este órgano.

### **Peroxidación tisular y MDA (Figura 28b)**

Tampoco en los niveles de peroxidación, siguiendo la pauta observada en años anteriores, aparece ninguna diferencia significativa.

### **Sistema del glutatión y ácido ascórbico (Figura 29)**

En este caso, como también ha ocurrido con la actividad SOD, se ha perdido la inducción del GSH observada el año anterior. Por otro lado el GSSG alcanza niveles más altos en los dos grupos tratados, llegando a ser estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el caso del grupo viejo tratado respecto al viejo control (150%).

Por el contrario, la inducción del ácido ascórbico en los dos grupos tratados se mantiene respecto al año anterior ( $p < 0,001$ ) e incluso es más pronunciada (240-190%).

## **B. Pulmón**

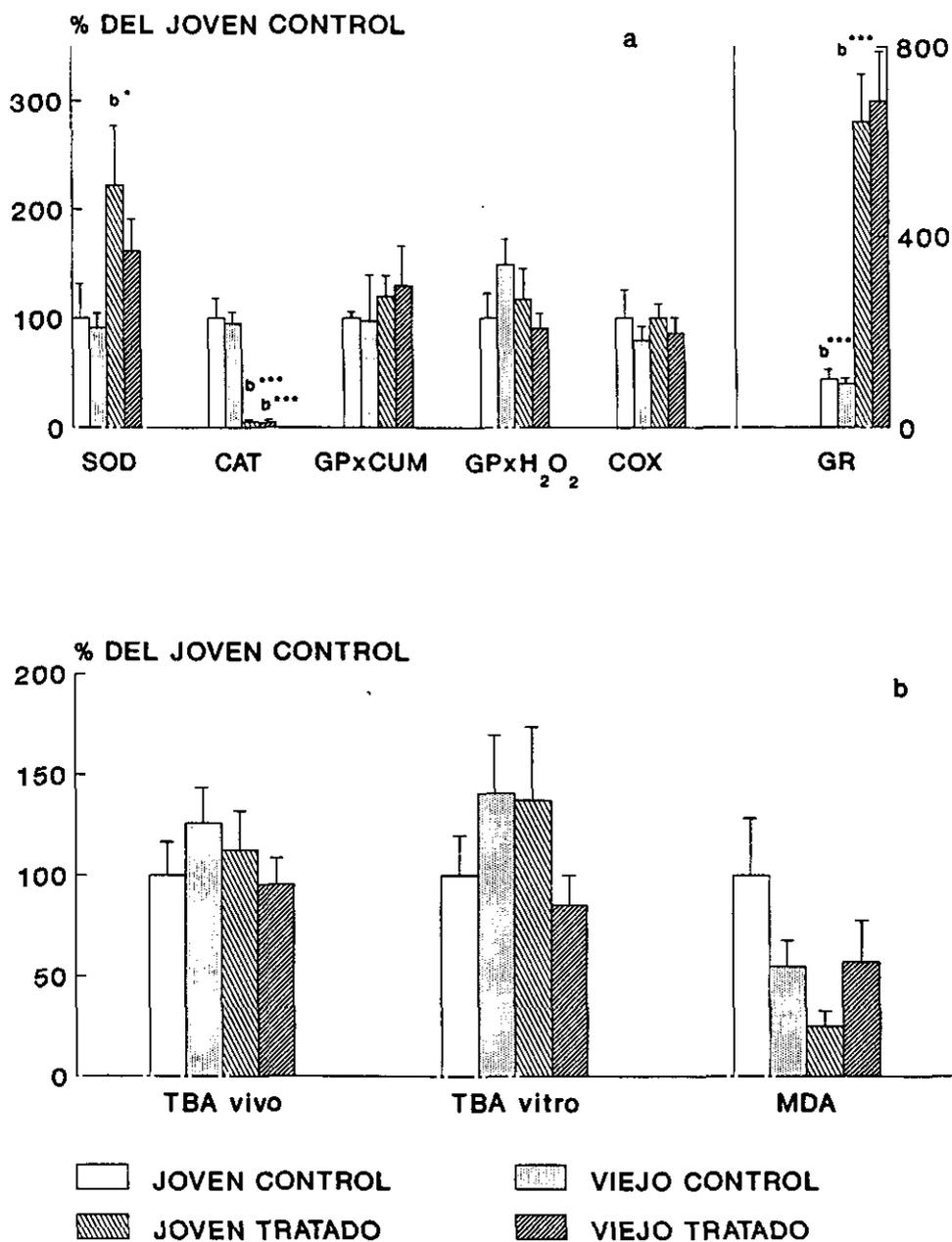
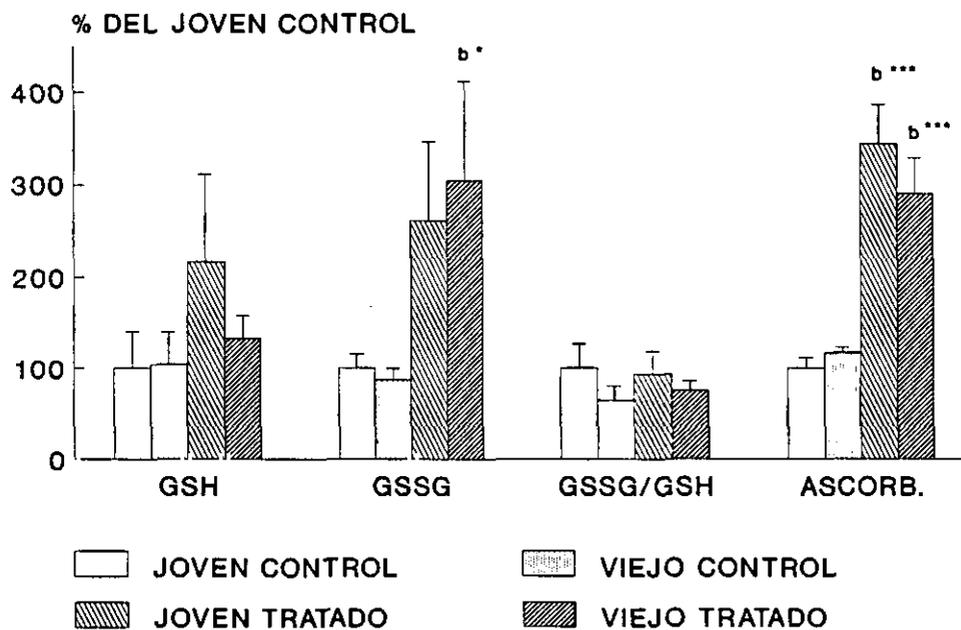


Figura 28.- Actividades enzimáticas (a), y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* y MDA (b) en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 26,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%). b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

\* (p<0,05); \*\*\* (p<0,001)



**Figura 29.-** Sistema del glutati3n y 1cido asc3rbico en el h1gado de animales j3venes y viejos de *Rana perezi* despu3s de 26,5 meses de tratamiento. Los resultados est1n expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

\* ( $p < 0,05$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ )

### Actividades enzimáticas (Figura 30a)

La inhibición de la actividad catalasa (90%) se mantiene en los dos grupos de edad ( $p < 0,001$ ). Hay que señalar la pérdida de la inducción de actividad GR observada el año anterior después de 14,5 meses de tratamiento. No encontramos cambios significativos debidos a la edad o al tratamiento para ningún otro parámetro.

### Peroxidación tisular (Figura 30b)

Los datos de la Figura 30b ponen de manifiesto una vez más la ausencia de efectos atribuibles al tratamiento o a la edad. No obstante, cabe mencionar los valores algo más bajos de peroxidación *in vitro* en los grupos tratados, pero que como ya ha ocurrido antes, no alcanzan la significación.

### Sistema del glutatión (Figura 31)

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos para el GSH aunque los animales viejos tratados presenten valores algo inferiores. Pero sí es interesante destacar la tendencia a aumentar de los niveles de GSSG y del cociente GSSG/GSH en los dos grupos tratados. Estas diferencias no llegan a ser significativas debido a la gran variabilidad observada.

## C. Cerebro

### Actividades enzimáticas (Figura 32a)

Al igual que en el caso del pulmón, se mantiene la inhibición de la actividad catalasa (más de un 85%) en los dos grupos de edad ( $p < 0,001$ ). También se ha perdido la inducción de la actividad GR, observada el año anterior después de 14,5 meses de tratamiento.

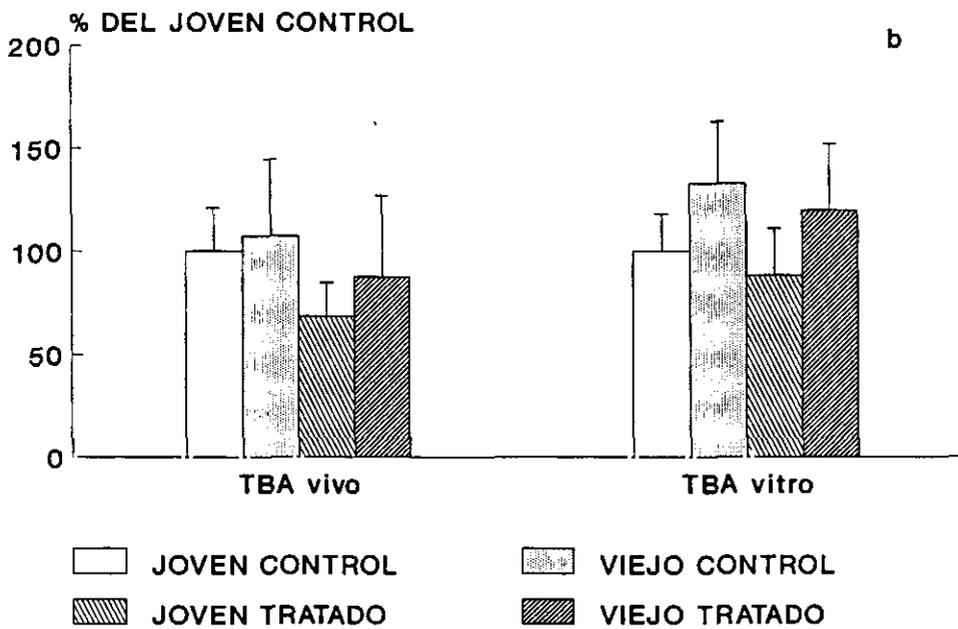
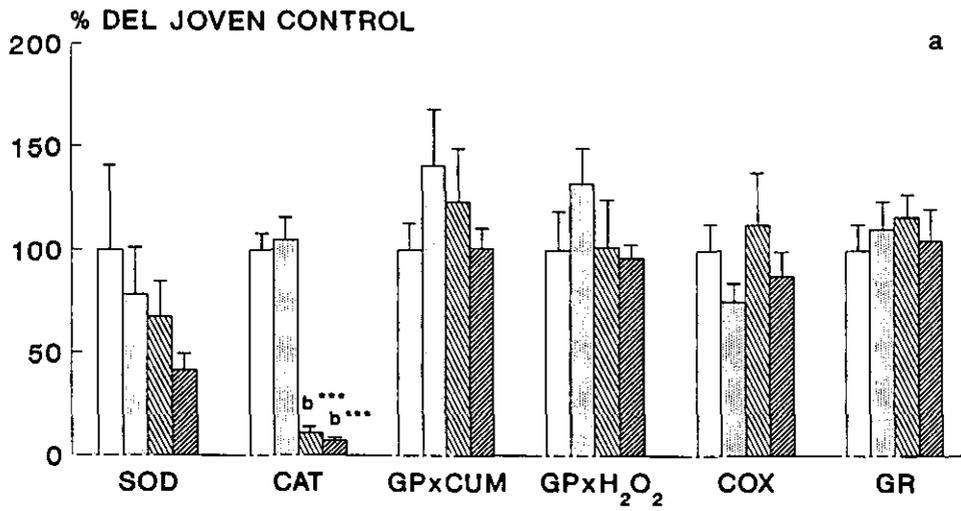
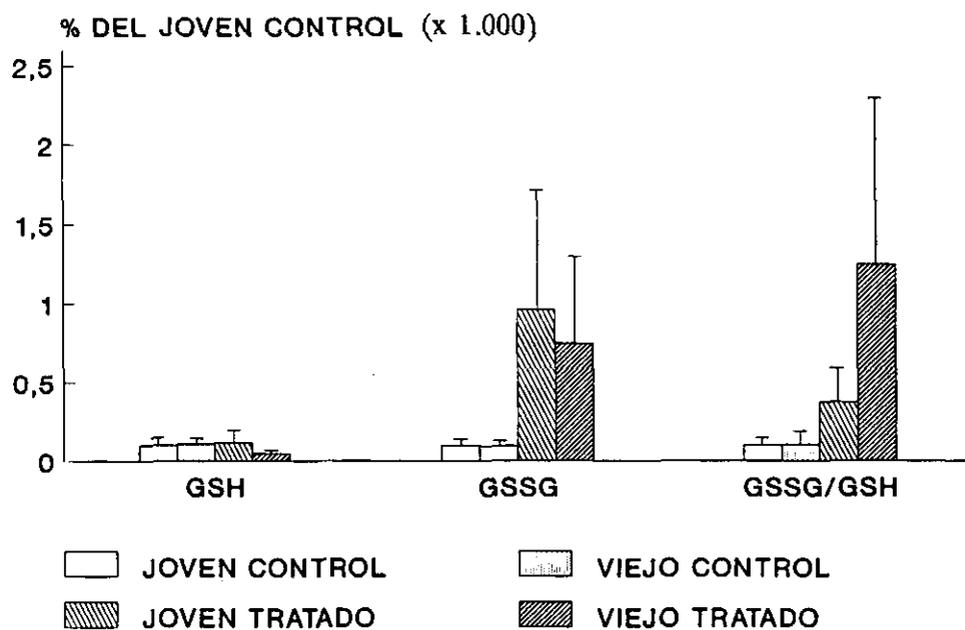


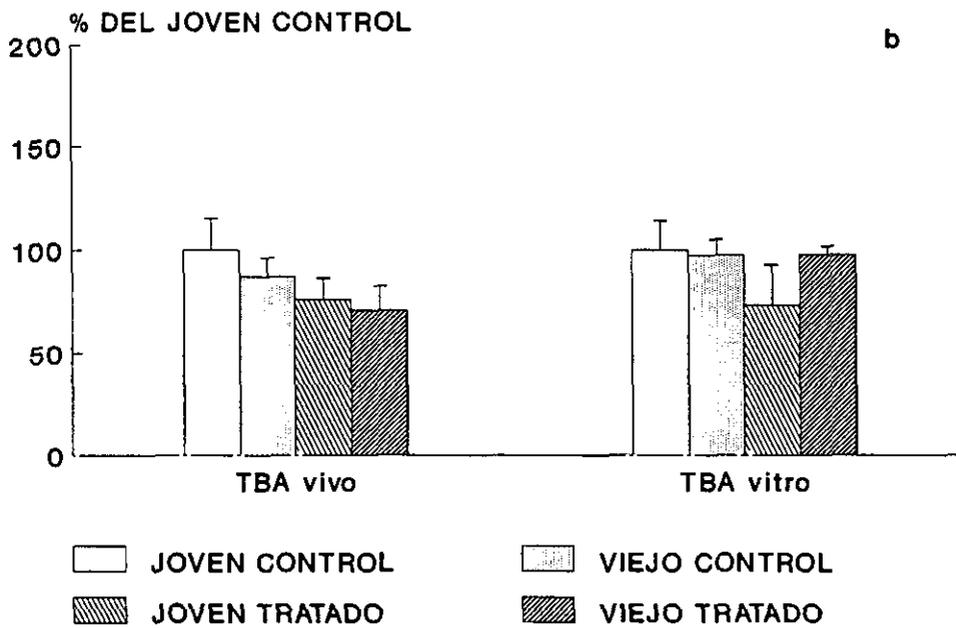
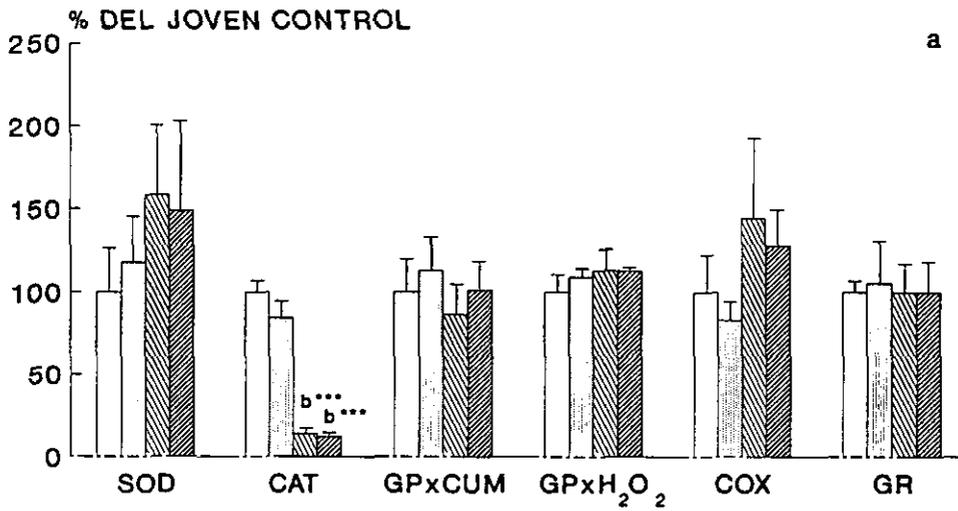
Figura 30.- Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 26,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

\*\*\* ( $p < 0,001$ )



**Figura 31.-** Sistema del glutati3n en el pulm3n de animales j3venes y viejos de *Rana perezi* despu3s de 26,5 meses de tratamiento. Los resultados est3n expresados en % respecto al grupo joven control (100%).



**Figura 32.-** Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 26,5 meses de tratamiento.

Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).

b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.

\*\*\* ( $p < 0,001$ )

#### **Peroxidación tisular (Figura 32b)**

Todos los grupos presentan valores de peroxidación *in vivo* e *in vitro* similares, no viéndose afectados por el tratamiento o la edad.

#### **Sistema del glutatión (Figura 33)**

En los cuatro grupos de trabajo encontramos niveles de GSH del mismo orden, ni la edad ni el tratamiento provocan modificación alguna.

### **D. Riñón**

#### **Actividades enzimáticas (Figura 34a)**

La inhibición de la actividad CAT debida al tratamiento permanece constante entre los mismos niveles (85-90%) en los dos grupos de edad ( $p < 0,001$ ).

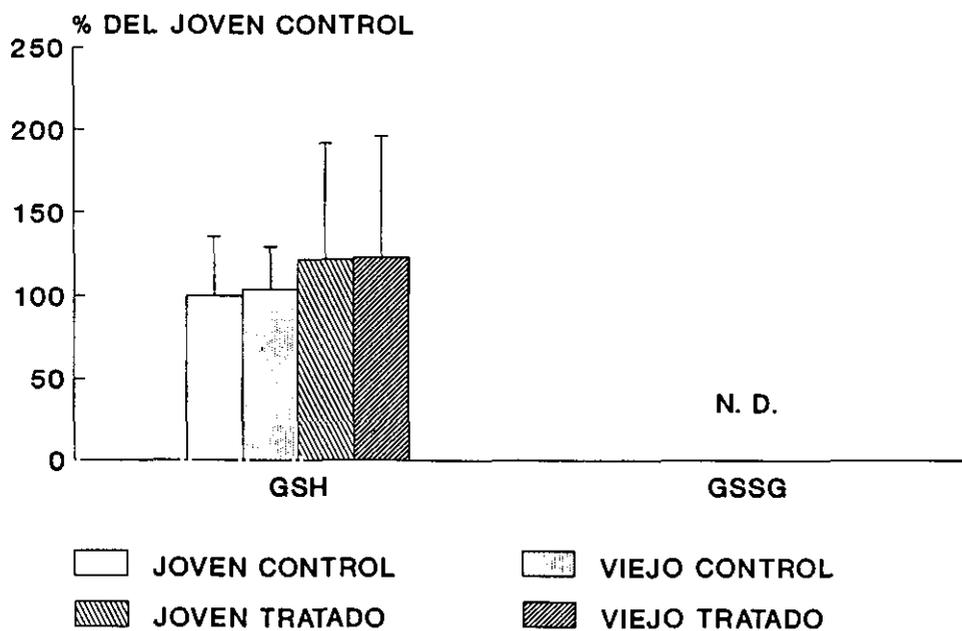
En cuanto a la inducción de actividad GR observada el año anterior, debida también al tratamiento, sigue existiendo (570-400%) aunque tiende a descender en este órgano respecto al año anterior ( $p < 0,001$ ).

Los descensos de actividad GPx utilizando hidroperóxido de cumeno como sustrato debidos al tratamiento son menores y dejan de ser significativos. Sólo en el caso de la actividad GPx utilizando  $H_2O_2$  como sustrato se mantiene la significación en el caso de los animales viejos tratados respecto a los viejos controles ( $p < 0,05$ ).

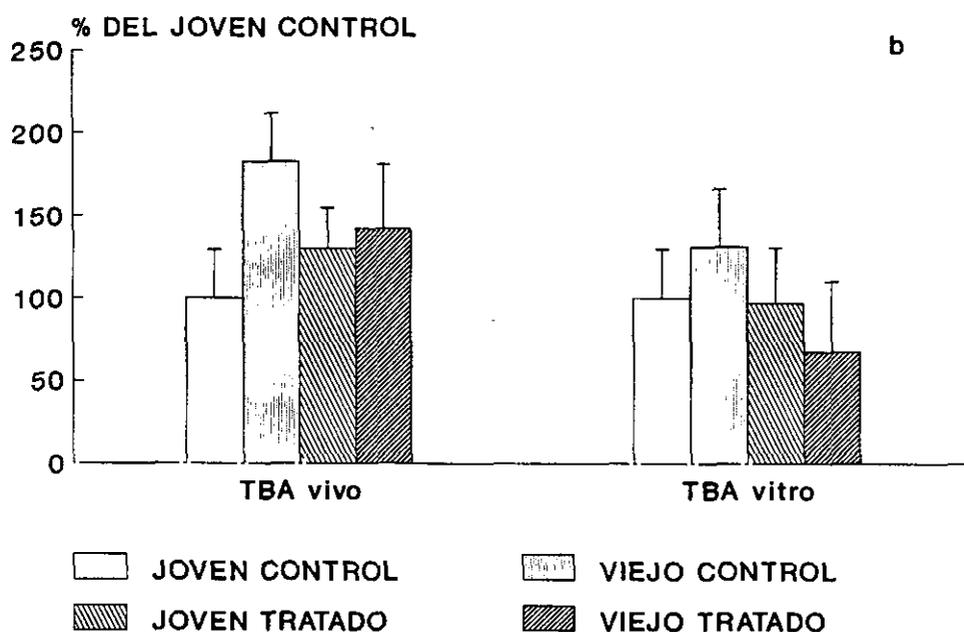
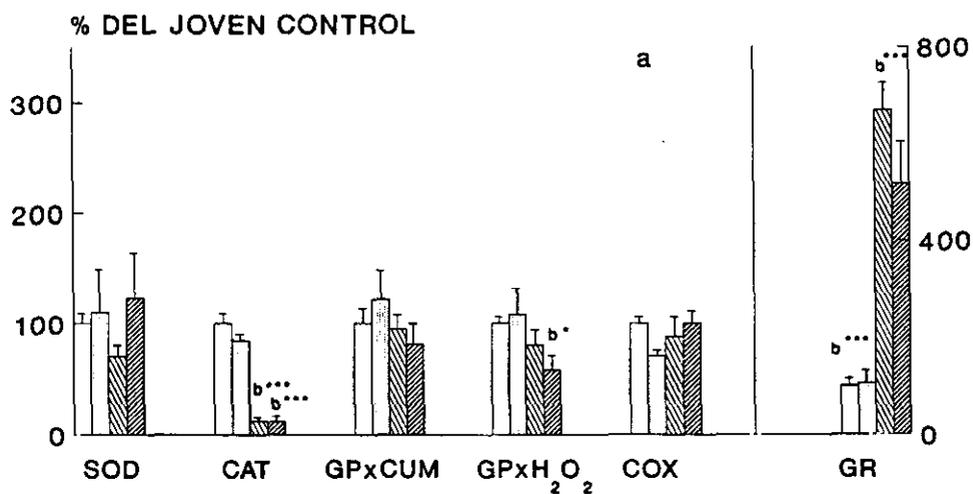
El resto de las actividades no se ven alteradas ni por la edad ni por el tratamiento.

#### **Peroxidación tisular (Figura 34b)**

En este caso los cuatro grupos experimentales presentan valores similares para



**Figura 33.-** Sistema del glutati3n en el cerebro de animales j3venes y viejos de *Rana perezi* despu3s de 26,5 meses de tratamiento. Los resultados est3n expresados en % respecto al grupo joven control (100%).



**Figura 34.-** Actividades enzimáticas (a) y peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (b) en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 26,5 meses de tratamiento. Los resultados están expresados en % respecto al grupo joven control (100%).  
 b: diferencia significativa entre animales controles y tratados de la misma edad.  
 \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ )

ambos parámetros, peroxidación *in vivo* e *in vitro*.

#### **Sistema del glutatión y ácido ascórbico (Figura 35)**

Como ya ha ocurrido con otros parámetros se pierde la inducción del GSH y ácido ascórbico observadas el año anterior después de 14,5 meses de tratamiento crónico con AT.

#### **E. Curva de supervivencia (Figura 36)**

En la fase final del experimento entre los 24 y 33 meses de tratamiento, los animales tratados que habían mostrado una menor tasa de mortalidad temprana, entraron en una fase rápida de mortalidad aguda. La vida máxima fue la misma para los dos grupos de animales viejos, controles y tratados. Después de 33 meses de tratamiento sólo los animales del grupo joven control seguían vivos y el experimento se dio por concluido.

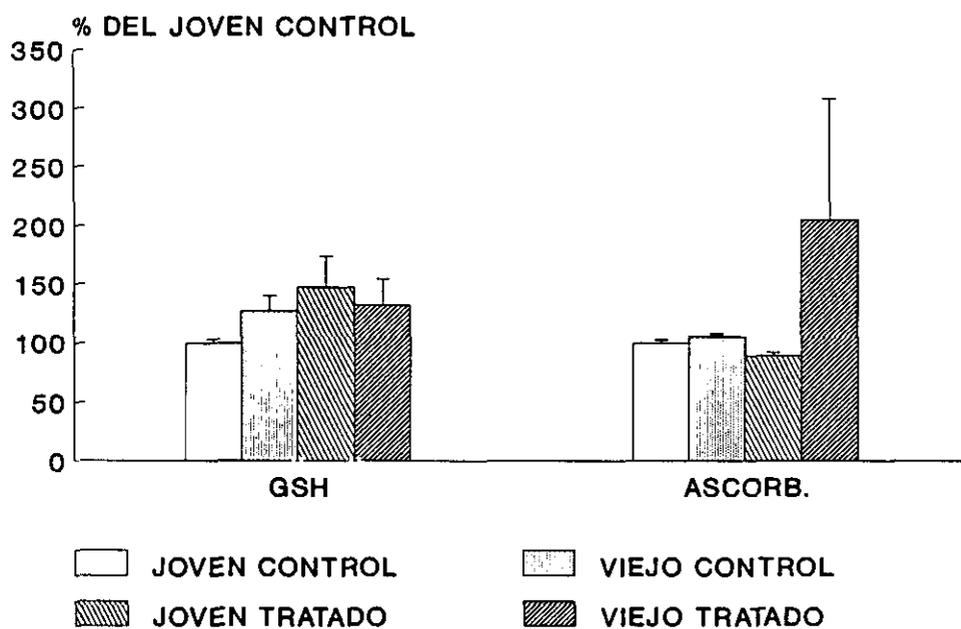
### **IV. ESTUDIO LONGITUDINAL POR ORGANOS**

Pasamos a exponer ahora los resultados de la comparación longitudinal de los parámetros, realizada para cada uno de los grupos a lo largo de los tres años que ha durado el periodo experimental.

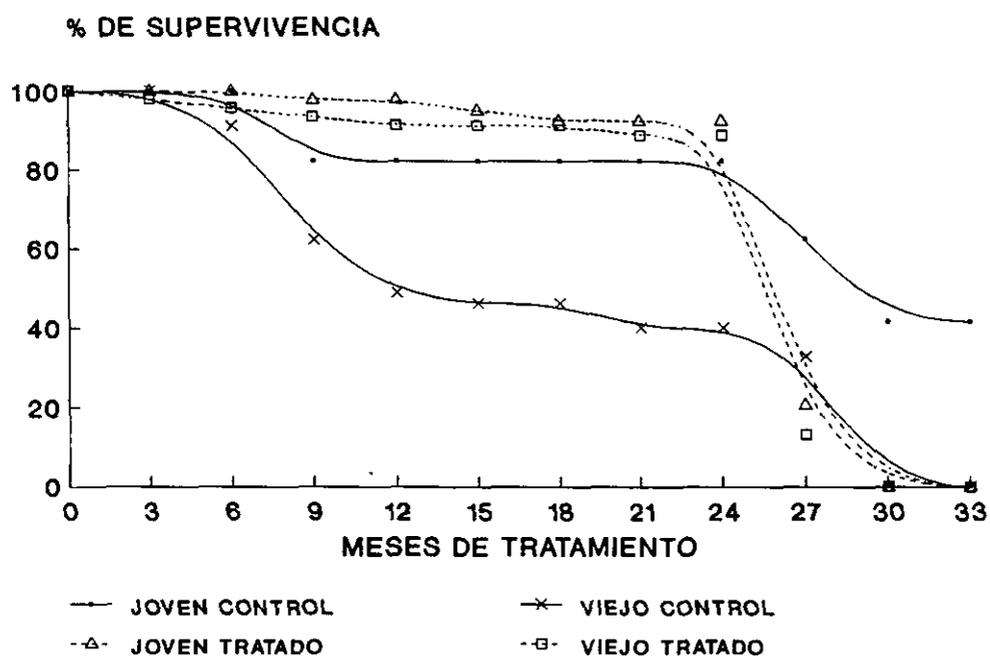
#### **1.- Hígado**

##### **A. Actividades enzimáticas (Tablas 6-10)**

En general no se observan diferencias en función de la edad. No obstante, hay que señalar el incremento de actividad SOD en los dos grupos de animales viejos, controles y tratados, después de 14,5 meses de tratamiento ( $p < 0,01$ ), para posteriormente estabilizarse.



**Figura 35.-** Sistema del glutati3n y 1cido asc3rbico en el ri3n3n de animales j3venes y viejos de *Rana perezii* despu3s de 26,5 meses de tratamiento. Los resultados est1n expresados en % respecto al grupo joven control (100%).



**Figura 36.-** Curva de supervivencia de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 33 meses de tratamiento.

**Tabla 6.-** Actividad SOD en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

ACTIVIDAD SOD (U SOD/mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	41,0 ± 10,1 (7)	75,7 ± 19,2 (6)	70,0 ± 22,9 (6)
VIEJO CONTROL	16,2 ± 5,1 (8)	71,8 ± 15,5 (6) <sup>a**</sup>	63,7 ± 9,7 (6) <sup>a**</sup>
JOVEN TRATADO	101,2 ± 23,6 (8)	197,8 ± 41,1 (6)	155,6 ± 38,5 (6)
VIEJO TRATADO	74,3 ± 12,7 (8)	143,8 ± 16,7 (6) <sup>a**</sup>	113,4 ± 21,0 (6)

**Tabla 7.-** Actividad CAT en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

ACTIVIDAD CAT (μmoles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min . mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	626,5 ± 110 (8)	1010,0 ± 100 (6)	915,0 ± 170 (6)
VIEJO CONTROL	612,3 ± 89 (7)	944,0 ± 113 (5)	869,0 ± 109 (6)
JOVEN TRATADO	29,3 ± 5,2 (7)	100,0 ± 32 (6) <sup>a*</sup>	48,0 ± 12 (6)
VIEJO TRATADO	23,8 ± 3,2 (7)	106,0 ± 41 (6)	46,0 ± 15 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p < 0,05)

\*\* (p < 0,01)

( ) = número de datos

**Tabla 8.-** Actividades GPx utilizando cumeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

ACTIVIDAD GPx <sub>C</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	24,8 ± 1,2 (8)	31,7 ± 8,4 (6)	42,8 ± 2,5 (6) <sup>a*</sup>
VIEJO CONTROL	30,7 ± 1,8 (8)	34,0 ± 8,0 (5)	41,7 ± 18,3 (6)
JOVEN TRATADO	30,9 ± 4,1 (8)	42,0 ± 10,7 (6)	51,5 ± 8,2 (6)
VIEJO TRATADO	36,2 ± 4,2 (8)	62,7 ± 7,8 (6)	55,9 ± 16,0 (6)

ACTIVIDAD GPx <sub>H</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	11,7 ± 2,1 (8)	11,1 ± 2,2 (6)	18,3 ± 4,2 (6)
VIEJO CONTROL	15,3 ± 1,5 (8)	18,0 ± 3,8 (5)	27,4 ± 4,4 (6) <sup>a*</sup>
JOVEN TRATADO	13,3 ± 1,8 (8)	12,1 ± 1,0 (6)	21,5 ± 5,3 (6)
VIEJO TRATADO	16,2 ± 2,4 (8)	10,2 ± 2,3 (6)	16,6 ± 2,6 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p < 0,05)

( ) = número de datos

**Tabla 9.-** Actividad GR en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD GR (nmoles NADPH/min . mg prot)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	12,3 ± 1,9 (8)	7,7 ± 1,4 (6)	9,4 ± 2,0 (6)
VIEJO CONTROL	12,3 ± 2,1 (8)	10,0 ± 1,1 (5)	8,6 ± 1,3 (6)
JOVEN TRATADO	23,2 ± 2,2 (8)	78,0 ± 5,3 (6) <sup>a***</sup>	60,4 ± 9,4 (6) <sup>a***</sup>
VIEJO TRATADO	24,1 ± 4,0 (8)	53,0 ± 6,6 (6) <sup>a**</sup>	64,5 ± 10,0 (6) <sup>a***</sup>

**Tabla 10.-** Actividad COX en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD COX (μmoles CIT C ox./min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,021 ± 0,007 (6)	0,015 ± 0,004 (6)
VIEJO CONTROL	0,021 ± 0,006 (6)	0,012 ± 0,002 (6)
JOVEN TRATADO	0,024 ± 0,007 (6)	0,015 ± 0,002 (6)
VIEJO TRATADO	0,021 ± 0,006 (6)	0,013 ± 0,002 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\*\* (p<0,01)

\*\*\* (p<0,001)

( ) = número de datos

La actividad CAT del grupo joven tratado está menos inhibida a los 14,5 meses de tratamiento ( $p < 0,05$ ).

En el grupo joven control la actividad GPx, utilizando hidroperóxido de cumeno como sustrato, muestra una tendencia a aumentar en función del tiempo de permanencia en el laboratorio ( $p < 0,05$ ). Lo mismo ocurre con los animales viejos controles cuando el sustrato utilizado es peróxido de hidrógeno.

Por último, destacar que la actividad GR de los dos grupos tratados sufre un gran incremento a lo largo del periodo experimental ( $p < 0,001$ ).

#### **B. Peroxidación tisular y MDA (Tablas 11 y 12)**

En este caso se produce un descenso progresivo y sistemático de los niveles de peroxidación tisular tanto *in vivo* como *in vitro*, en función del tiempo de permanencia en el laboratorio, alcanzando la significación en el caso de los animales viejos tratados para la peroxidación *in vivo* ( $p < 0,01$ ), y en todos los casos cuando se trata de la peroxidación *in vitro* ( $p < 0,05$ ).

No se observan variaciones en los niveles de MDA entre el segundo y tercer año.

#### **C. Sistema del glutatión y ácido ascórbico (Tablas 13-15)**

Los niveles de GSH de los dos grupos tratados, jóvenes ( $p < 0,05$ ) y viejos ( $p < 0,001$ ) se incrementan después de 14,5 meses de tratamiento para volver a descender posteriormente.

En cuanto a los niveles de GSSG, tienden a descender en los animales controles, pero este descenso sólo es significativo en el grupo viejo control ( $p < 0,05$ ).

Ni el cociente GSSG/GSH ni los niveles de ácido ascórbico muestran

**Tabla 11.-** Peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (sustancias TBA positivas) en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

PEROXIDACION TISULAR - TBA vivo (nmoles/g)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	81,7 ± 12,2 (8)	49,1 ± 9,7 (6)	50,9 ± 8,3 (6)
VIEJO CONTROL	89,9 ± 13,8 (8)	69,8 ± 9,0 (6)	64,2 ± 9,1 (6)
JOVEN TRATADO	81,8 ± 20,2 (8)	95,6 ± 18,4 (5)	57,3 ± 9,7 (6)
VIEJO TRATADO	120,0 ± 10,9 (6)	113,9 ± 22,0 (5)	48,6 ± 6,6 (6) <sup>a,b**</sup>

PEROXIDACION TISULAR - TBA vitro (nmoles/g)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	200,6 ± 27,7 (3)	119,1 ± 34,5 (5)	79,4 ± 15,6 (6) <sup>a*</sup>
VIEJO CONTROL	263,1 ± 58,2 (3)	111,1 ± 6,4 (5) <sup>a*</sup>	111,9 ± 22,6 (6) <sup>a*</sup>
JOVEN TRATADO	197,9 ± 58,7 (3)	160,0 ± 34,1 (6)	109,2 ± 28,3 (6)
VIEJO TRATADO	155,1 ± 32,1 (3)	158,1 ± 27,5 (5)	67,8 ± 12,0 (6) <sup>a,b*</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p<0,05)

\*\* (p<0,01)

( ) = número de datos

**Tabla 12.-** Niveles de MDA en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	MDA (nmoles/g)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	2,2 ± 0,8 (4)	4,81 ± 1,35 (6)
VIEJO CONTROL	4,6 ± 3,8 (4)	2,64 ± 0,62 (5)
JOVEN TRATADO	2,1 ± 0,6 (5)	1,21 ± 0,36 (3)
VIEJO TRATADO	2,7 ± 1,0 (5)	2,76 ± 0,96 (5)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar.

( ) = número de datos

**Tabla 13.-** Niveles de glutatión reducido en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	GSH ( $\mu$ moles/g)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	1,87 $\pm$ 0,21 (9)	2,35 $\pm$ 0,26 (6)	1,17 $\pm$ 0,47 (6)
VIEJO CONTROL	1,75 $\pm$ 0,20 (9)	1,76 $\pm$ 0,21 (6)	1,22 $\pm$ 0,40 (6)
JOVEN TRATADO	2,25 $\pm$ 0,23 (9)	5,22 $\pm$ 1,10 (6) <sup>a*</sup>	2,53 $\pm$ 1,11 (6) <sup>b*</sup>
VIEJO TRATADO	1,90 $\pm$ 0,42 (9)	4,83 $\pm$ 0,38 (6) <sup>a***</sup>	1,56 $\pm$ 0,30 (5) <sup>b***</sup>

**Tabla 14.-** Niveles de ácido ascórbico en el hígado de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ASCORBICO ( $\mu$ moles/g)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,62 $\pm$ 0,067 (4)	0,54 $\pm$ 0,06 (6)
VIEJO CONTROL	0,46 $\pm$ 0,10 (4)	0,63 $\pm$ 0,03 (6)
JOVEN TRATADO	1,38 $\pm$ 0,09 (5)	1,86 $\pm$ 0,23 (6)
VIEJO TRATADO	1,34 $\pm$ 0,21 (5)	1,57 $\pm$ 0,21 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* ( $p < 0,05$ )

\*\*\* ( $p < 0,001$ )

( ) = número de datos

**Tabla 15.-** Sistema del glutati3n en el h3gado de animales j3venes y viejos de *Rana perezii* despu3s de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	GSSG ( $\mu\text{moles/g}$ )		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,12 $\pm$ 0,05 (8)	0,10 $\pm$ 0,05 (6)	0,046 $\pm$ 0,007 (6)
VIEJO CONTROL	0,15 $\pm$ 0,04 (8)	0,19 $\pm$ 0,03 (6)	0,040 $\pm$ 0,006 (6) <sup>a,b*</sup>
JOVEN TRATADO	0,30 $\pm$ 0,15 (7)	0,15 $\pm$ 0,02 (6)	0,120 $\pm$ 0,040 (6)
VIEJO TRATADO	0,13 $\pm$ 0,03 (7)	0,16 $\pm$ 0,04 (6)	0,140 $\pm$ 0,050 (6)

	GSSG/GSH		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,067 $\pm$ 0,028 (8)	0,041 $\pm$ 0,016 (6)	0,076 $\pm$ 0,020 (6)
VIEJO CONTROL	0,096 $\pm$ 0,033 (8)	0,104 $\pm$ 0,007 (6)	0,049 $\pm$ 0,012 (6)
JOVEN TRATADO	0,134 $\pm$ 0,061 (7)	0,030 $\pm$ 0,005 (6)	0,071 $\pm$ 0,019 (6)
VIEJO TRATADO	0,077 $\pm$ 0,018 (7)	0,036 $\pm$ 0,009 (6)	0,057 $\pm$ 0,008 (5)

Los resultados se expresan como la media aritm3tica  $\pm$  el error est3ndar. Los super3ndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* ( $p < 0,05$ )

( ) = n3mero de datos

variaciones significativas a lo largo del periodo experimental.

## 2.- Pulmón

### A. Actividades enzimáticas (Tablas 16-20)

Prácticamente no se produce ninguna variación en los niveles de las distintas actividades en función del tiempo transcurrido en el laboratorio. Sólo cabe mencionar, en el grupo joven control, el descenso de la actividad GPx utilizando hidroperóxido de cumeno como sustrato, después de 14,5 meses desde el inicio de el estudio ( $p < 0,01$ ) y su posterior recuperación.

### B. Peroxidación tisular (Tabla 21)

De nuevo, como ya ocurría en el caso del hígado, se produce un descenso sistemático y progresivo de los niveles de peroxidación tanto *in vivo* como *in vitro*, alcanzando la significación en todos los grupos.

Después de 14,5 meses de experimento, el descenso en los niveles de peroxidación *in vivo* es ya significativo en los dos grupos de animales jóvenes, controles ( $p < 0,05$ ) y tratados ( $p < 0,01$ ) y en los viejos controles ( $p < 0,01$ ). Transcurridos 26,5 meses, el descenso es generalizado y resulta significativo tanto para los animales controles de ambas edades ( $p < 0,01$ ), como para los tratados jóvenes ( $p < 0,001$ ) y viejos ( $p < 0,05$ ).

Algo parecido ocurre con la peroxidación *in vitro*, cuyos descensos a lo largo del periodo experimental son significativos en los dos grupos jóvenes ( $p < 0,05$ ) y en el viejo control ( $p < 0,001$ ).

### C. Sistema del glutatión (Tablas 22 y 23)

Fijándonos en los niveles de GSH, en el grupo viejo tratado se produce un incremento a la mitad del periodo experimental ( $p < 0,05$ ) para descender al final del

**Tabla 16.-** Actividad SOD en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD SOD (U SOD/mg prot)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	27,6 ± 9,3 (8)	25,6 ± 9,4 (6)	40,9 ± 16,6 (6)
VIEJO CONTROL	15,7 ± 6,2 (7)	24,9 ± 6,9 (6)	32,1 ± 9,4 (6)
JOVEN TRATADO	24,8 ± 8,7 (7)	31,8 ± 9,5 (6)	27,6 ± 7,0 (5)
VIEJO TRATADO	34,9 ± 5,4 (8)	23,6 ± 5,0 (6)	17,0 ± 3,4 (5)

**Tabla 17.-** Actividad CAT en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD CAT ( $\mu$ moles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min . mg prot)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	75,3 ± 5,9 (7)	102,0 ± 16,0 (6)	106,0 ± 8,0 (6)
VIEJO CONTROL	105,5 ± 19,3 (7)	89,0 ± 5,8 (6)	111,0 ± 12,0 (6)
JOVEN TRATADO	7,3 ± 1,6 (7)	9,0 ± 3,0 (6)	12,0 ± 3,0 (6)
VIEJO TRATADO	6,0 ± 1,6 (7)	10,0 ± 4,0 (6)	8,0 ± 2,0 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar.

( ) = número de datos

**Tabla 18.-** Actividades GPx utilizando cumeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

ACTIVIDAD GPx <sub>c</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	51,0 ± 5,4 (8)	31,0 ± 3,3 (6) <sup>a**</sup>	40,0 ± 5,0 (6)
VIEJO CONTROL	48,3 ± 7,9 (8)	45,3 ± 6,7 (6)	56,4 ± 11,0 (6)
JOVEN TRATADO	57,3 ± 7,8 (8)	43,3 ± 7,2 (6)	49,5 ± 10,2 (6)
VIEJO TRATADO	57,9 ± 8,6 (8)	49,1 ± 4,7 (6)	40,5 ± 3,9 (6)

ACTIVIDAD GPx <sub>H</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	42,0 ± 4,7 (8)	31,7 ± 3,6 (6)	38,5 ± 7,1 (6)
VIEJO CONTROL	38,3 ± 6,5 (8)	40,5 ± 5,4 (6)	51,1 ± 6,5 (6)
JOVEN TRATADO	50,3 ± 9,7 (8)	34,9 ± 4,2 (6)	39,1 ± 9,1 (6)
VIEJO TRATADO	45,0 ± 6,1 (8)	39,1 ± 4,8 (6)	37,2 ± 2,5 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\*\* (p<0,01)

( ) = número de datos

**Tabla 19.-** Actividad GR en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD GR (nmoles NADPH/min . mg prot)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	13,6 ± 2,6 (8)	11,1 ± 1,7 (6)	14,0 ± 1,7 (6)
VIEJO CONTROL	12,8 ± 2,3 (8)	11,7 ± 0,9 (6)	15,5 ± 1,9 (6)
JOVEN TRATADO	17,1 ± 2,5 (8)	16,5 ± 2,4 (6)	16,3 ± 1,5 (6)
VIEJO TRATADO	18,2 ± 2,1 (8)	16,3 ± 3,6 (6)	14,7 ± 2,1 (6)

**Tabla 20.-** Actividad COX en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD COX (μmoles CIT C ox/min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,010 ± 0,002 (6)	0,008 ± 0,001 (6)
VIEJO CONTROL	0,027 ± 0,014 (6)	0,006 ± 0,0007 (6)
JOVEN TRATADO	0,011 ± 0,002 (6)	0,009 ± 0,002 (5)
VIEJO TRATADO	0,013 ± 0,003 (6)	0,007 ± 0,001 (5)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar.

( ) = número de datos

**Tabla 21.-** Peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (sustancias TBA positivas) en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

PEROXIDACION TISULAR - TBA vivo (nmoles/g)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	89,0 ± 10,5 (8)	51,8 ± 9,3 (4) <sup>a*</sup>	30,7 ± 6,4 (4) <sup>a**</sup>
VIEJO CONTROL	92,5 ± 11,1 (8)	34,1 ± 9,4 (4) <sup>a**</sup>	33,0 ± 11,5 (6) <sup>a***</sup>
JOVEN TRATADO	101,5 ± 16,1 (8)	36,4 ± 5,5 (6) <sup>a**</sup>	21,0 ± 5,2 (6) <sup>a***</sup>
VIEJO TRATADO	98,2 ± 16,4 (8)	53,9 ± 12,1 (5)	26,9 ± 12,4 (5) <sup>a*</sup>

PEROXIDACION TISULAR - TBA vitro (nmoles/g)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	208,6 ± 42,2 (3)	109,2 ± 39,3 (4)	58,1 ± 10,3 (5) <sup>a*</sup>
VIEJO CONTROL	235,4 ± 21,6 (3)	37,2 ± 3,9 (5) <sup>a***</sup>	77,2 ± 17,8 (6) <sup>a***</sup>
JOVEN TRATADO	159,6 ± 17,3 (3)	108,8 ± 26,1 (6)	51,2 ± 13,5 (5) <sup>a*</sup>
VIEJO TRATADO	182,8 ± 20,2 (3)	140,5 ± 45,1 (5)	69,8 ± 18,9 (5)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p<0,05)

\*\* (p<0,01)

\*\*\* (p<0,001)

( ) = número de datos

**Tabla 22.-** Niveles de glutatión reducido en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	GSH ( $\mu$ moles/g)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,62 $\pm$ 0,03 (9)	0,79 $\pm$ 0,09 (6)	0,44 $\pm$ 0,19 (6)
VIEJO CONTROL	0,68 $\pm$ 0,05 (9)	0,86 $\pm$ 0,12 (6)	0,48 $\pm$ 0,16 (6)
JOVEN TRATADO	0,68 $\pm$ 0,08 (9)	0,99 $\pm$ 0,10 (6)	0,51 $\pm$ 0,33 (6)
VIEJO TRATADO	0,63 $\pm$ 0,08 (9)	1,51 $\pm$ 0,60 (6) <sup>a*</sup>	0,21 $\pm$ 0,05 (6) <sup>b*</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* ( $p < 0,05$ )

( ) = número de datos

**Tabla 23.-** Sistema del glutatión en el pulmón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	GSSG ( $\mu$ moles/g)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,015 $\pm$ 0,002 (7)	0,049 $\pm$ 0,014 (6) <sup>a*</sup>	0,024 $\pm$ 0,008 (6)
VIEJO CONTROL	0,018 $\pm$ 0,005 (8)	0,027 $\pm$ 0,008 (6)	0,023 $\pm$ 0,009 (6)
JOVEN TRATADO	0,021 $\pm$ 0,004 (8)	0,029 $\pm$ 0,008 (6)	0,230 $\pm$ 0,180 (6)
VIEJO TRATADO	0,032 $\pm$ 0,012 (8)	0,035 $\pm$ 0,014 (6)	0,180 $\pm$ 0,130 (6)

	GSSG/GSH		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,024 $\pm$ 0,003 (7)	0,069 $\pm$ 0,023 (6)	0,143 $\pm$ 0,060 (6)
VIEJO CONTROL	0,027 $\pm$ 0,008 (8)	0,037 $\pm$ 0,012 (6)	0,150 $\pm$ 0,117 (6)
JOVEN TRATADO	0,036 $\pm$ 0,008 (8)	0,031 $\pm$ 0,009 (6)	0,530 $\pm$ 0,310 (6)
VIEJO TRATADO	0,047 $\pm$ 0,010 (8)	0,023 $\pm$ 0,004 (6)	1,780 $\pm$ 1,500 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* ( $p < 0,05$ )

( ) = número de datos

mismo.

Lo mismo sucede con los valores de GSSG del grupo joven control ( $p < 0,05$ ).

### 3.- Cerebro

#### A. Actividades enzimáticas (Tablas 24-28)

La actividad SOD del grupo viejo control se incrementa ( $p < 0,01$ ) tras 14,5 meses de periodo experimental, para estabilizarse después. En el caso del grupo joven tratado el incremento es progresivo ( $p < 0,05$ ), alcanzando el valor máximo a los 26,5 meses de tratamiento.

En el grupo joven control la actividad CAT se eleva a los 14,5 meses para después volver a descender ( $p < 0,05$ ).

Por último, señalar el incremento en función del tiempo de la actividad GPx utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato en el grupo viejo tratado ( $p < 0,05$ ).

#### B. Peroxidación tisular (Tabla 29)

En este órgano el descenso del contenido de sustancias TBA positivas *in vivo*, en función del tiempo, tiene lugar en los dos grupos tratados, jóvenes y viejos. Este descenso se produce desde el comienzo del experimento ( $p < 0,05$ ) y llega a ser importante al final ( $p < 0,001$ ).

Sin embargo, en este caso el descenso de los niveles de peroxidación *in vitro* no es tan homogéneo y sólo alcanza la significación en el grupo joven control donde además, al final del periodo experimental los niveles de peroxidación vuelven a aumentar ( $p < 0,01$ ).

#### C. Sistema del glutati6n (Tabla 30)

**Tabla 24.-** Actividad SOD en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD SOD (U SOD/mg prot)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	36,2 ± 6,6 (8)	152,4 ± 52,4 (6) <sup>a*</sup>	81,5 ± 21,9 (6)
VIEJO CONTROL	47,2 ± 9,5 (7)	138,7 ± 26,0 (6) <sup>a**</sup>	96,0 ± 22,9 (6)
JOVEN TRATADO	45,6 ± 10,8 (7)	103,7 ± 26,6 (6)	129,1 ± 34,7 (6) <sup>a*</sup>
VIEJO TRATADO	40,5 ± 7,0 (8)	116,9 ± 26,7 (6)	121,3 ± 46,1 (6)

**Tabla 25.-** Actividad CAT en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD CAT (µmoles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min . mg prot)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	19,7 ± 4,4 (7)	31,3 ± 3,7 (6) <sup>a*</sup>	17,7 ± 1,2 (6) <sup>b*</sup>
VIEJO CONTROL	16,4 ± 5,8 (7)	24,5 ± 3,2 (6)	14,9 ± 2,0 (6)
JOVEN TRATADO	3,2 ± 0,8 (7)	4,1 ± 1,1 (6)	2,5 ± 0,5 (6)
VIEJO TRATADO	2,2 ± 0,8 (7)	2,9 ± 0,9 (6)	2,1 ± 0,5 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p<0,05)

\*\* (p<0,01)

( ) = número de datos

**Tabla 26.-** Actividades GPx utilizando cumeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

ACTIVIDAD GPx <sub>c</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	53,3 ± 5,0 (8)	53,9 ± 6,0 (6)	49,9 ± 10,0 (6)
VIEJO CONTROL	71,2 ± 11,9 (8)	62,0 ± 9,5 (6)	56,3 ± 10,4 (6)
JOVEN TRATADO	52,6 ± 6,4 (8)	65,3 ± 10,9 (6)	43,1 ± 9,5 (6)
VIEJO TRATADO	46,9 ± 5,3 (8)	63,0 ± 9,4 (6)	50,4 ± 8,6 (6)

ACTIVIDAD GPx <sub>H</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	26,6 ± 2,4 (7)	37,4 ± 3,7 (6)	32,9 ± 3,5 (6)
VIEJO CONTROL	31,5 ± 5,1 (7)	37,5 ± 2,8 (6)	35,9 ± 1,8 (6)
JOVEN TRATADO	31,2 ± 5,2 (8)	36,6 ± 1,5 (6)	37,1 ± 4,4 (6)
VIEJO TRATADO	24,7 ± 3,6 (8)	30,1 ± 3,7 (5)	37,1 ± 0,7 (6) <sup>a*</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p<0,05)

( ) = número de datos

**Tabla 27.-** Actividad GR en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD GR (nmoles NADPH/min . mg prot)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	9,2 ± 1,5 (8)	6,2 ± 0,9 (5)	7,6 ± 0,5 (6)
VIEJO CONTROL	9,8 ± 3,0 (7)	7,2 ± 1,6 (6)	8,0 ± 2,0 (6)
JOVEN TRATADO	7,8 ± 1,3 (8)	9,7 ± 0,5 (6)	7,6 ± 1,3 (6)
VIEJO TRATADO	7,7 ± 1,3 (8)	12,3 ± 2,0 (6)	7,6 ± 1,4 (6)

**Tabla 28.-** Actividad COX en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD COX (μmoles CIT C ox/min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,030 ± 0,005 (6)	0,018 ± 0,004 (6)
VIEJO CONTROL	0,030 ± 0,011 (6)	0,015 ± 0,002 (6)
JOVEN TRATADO	0,041 ± 0,012 (6)	0,026 ± 0,009 (6)
VIEJO TRATADO	0,038 ± 0,011 (6)	0,023 ± 0,004 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar.

( ) = número de datos

**Tabla 29.-** Peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (sustancias TBA positivas) en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

PEROXIDACION TISULAR - TBA vivo (nmoles/g)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	514 ± 81 (8)	267 ± 54 (6)	444 ± 66 (5)
VIEJO CONTROL	616 ± 51 (8)	292 ± 51 (5) <sup>a*</sup>	387 ± 42 (6) <sup>a*</sup>
JOVEN TRATADO	712 ± 54 (8)	508 ± 59 (6) <sup>a*</sup>	339 ± 47 (4) <sup>a***</sup>
VIEJO TRATADO	719 ± 72 (6)	468 ± 60 (5) <sup>a*</sup>	316 ± 52 (6) <sup>a***</sup>

PEROXIDACION TISULAR - TBA vitro (nmoles/g)			
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	1403 ± 192 (2)	498 ± 73 (4) <sup>a**</sup>	1133 ± 154 (5) <sup>b**</sup>
VIEJO CONTROL	1234 ± 494 (2)	865 ± 179 (5)	1107 ± 87 (6)
JOVEN TRATADO	1018 ± 144 (2)	902 ± 81 (6)	834 ± 215 (5)
VIEJO TRATADO	1433 ± 25 (2)	926 ± 203 (5)	1112 ± 43 (5)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup> 2,5 meses; <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p<0,05)

\*\* (p<0,01)

\*\*\* (p<0,001)

( ) = número de datos

**Tabla 30.-** Niveles de glutatión reducido en el cerebro de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 2,5, 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	GSH ( $\mu$ moles/g)		
	2,5 meses	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,98 $\pm$ 0,09 (9)	1,24 $\pm$ 0,15 (6)	0,78 $\pm$ 0,28 (6)
VIEJO CONTROL	0,98 $\pm$ 0,09 (9)	1,26 $\pm$ 0,16 (6)	0,81 $\pm$ 0,20 (6)
JOVEN TRATADO	0,91 $\pm$ 0,13 (9)	1,32 $\pm$ 0,17 (4)	0,95 $\pm$ 0,56 (6)
VIEJO TRATADO	0,73 $\pm$ 0,12 (8)	1,24 $\pm$ 0,10 (5)	0,96 $\pm$ 0,59 (6)

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar.

( ) = número de datos

---

En el caso del GSH no se han producido cambios a lo largo del periodo experimental.

#### 4.- Riñón

##### A. Actividades enzimáticas (Tablas 31-35)

A nivel renal la única actividad enzimática que sufre alguna variación en función del tiempo es la de la citocromo c oxidasa de los dos grupos jóvenes, que desciende ligeramente ( $p < 0,05$ ).

El resto de las actividades permanecen bastante constantes con la edad.

##### B. Peroxidación tisular (Tabla 36)

En este caso no hay que señalar variaciones para la peroxidación, tanto *in vivo* como *in vitro*.

##### C. Sistema del glutatión y ácido ascórbico (Tablas 37 y 38)

Al igual que en el cerebro tampoco se producen variaciones en función de la edad.

#### V. ESTUDIO A MICROSCOPIA OPTICA DEL TIROIDES

##### 1.- Visualización (Figura 37)

Las preparaciones de los cortes de tiroides de nuestros animales muestran tiroides normales. No hay formaciones anómalas ni en el epitelio folicular, ni en los folículos tiroideos ni en el coloide.

#### VI. ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRONICA DEL CEREBRO

**Tabla 31.-** Actividad SOD en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD SOD (U SOD/mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	62 ± 6,7 (4)	85 ± 9 (4)
VIEJO CONTROL	89 ± 7,0 (4)	94 ± 33 (5)
JOVEN TRATADO	91 ± 16,0 (4)	60 ± 9 (5)
VIEJO TRATADO	94 ± 19,0 (4)	105 ± 35 (4)

**Tabla 32.-** Actividad CAT en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD CAT ( $\mu$ moles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	98 ± 24 (4)	125 ± 12 (4)
VIEJO CONTROL	137 ± 26 (4)	106 ± 7 (5)
JOVEN TRATADO	16 ± 4 (4)	16 ± 4 (5)
VIEJO TRATADO	10 ± 3 (4)	15 ± 6 (4)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar.

( ) = número de datos

**Tabla 33.-** Actividades GPx utilizando cumeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD GPx <sub>c</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	91 ± 9 (4)	108 ± 15 (4)
VIEJO CONTROL	135 ± 11 (4)	132 ± 28 (5)
JOVEN TRATADO	88 ± 8 (4)	103 ± 13 (5)
VIEJO TRATADO	83 ± 18 (4)	88 ± 20 (4)

	ACTIVIDAD GPx <sub>H</sub> (nmoles NADPH/min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	74 ± 5 (4)	86 ± 5 (4)
VIEJO CONTROL	101 ± 11 (4)	93 ± 21 (5)
JOVEN TRATADO	47 ± 2 (4)	69 ± 11 (5)
VIEJO TRATADO	55 ± 7 (4)	50 ± 11 (4)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar.

( ) = número de datos

**Tabla 34.-** Actividad GR en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD GR (nmoles NADPH/min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	13 ± 1,7 (4)	17 ± 2,6 (4)
VIEJO CONTROL	19 ± 3,0 (4)	18 ± 4,0 (5)
JOVEN TRATADO	92 ± 13,0 (4)	114 ± 9,0 (5)
VIEJO TRATADO	135 ± 18,0 (4)	88 ± 15,0 (4)

**Tabla 35.-** Actividad COX en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ACTIVIDAD COX (μmoles CIT C ox/min . mg prot)	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,025 ± 0,003 (4)	0,017 ± 0,001 (5) <sup>b*</sup>
VIEJO CONTROL	0,021 ± 0,006 (4)	0,012 ± 0,001 (5)
JOVEN TRATADO	0,027 ± 0,001 (4)	0,015 ± 0,003 (5) <sup>b*</sup>
VIEJO TRATADO	0,023 ± 0,004 (4)	0,017 ± 0,002 (4)

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>b</sup> 14,5 meses

\* (p<0,05)

( ) = número de datos

**Tabla 36.-** Peroxidación tisular *in vivo* e *in vitro* (sustancias TBA positivas) en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezii* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

---

PEROXIDACION TISULAR - TBA vivo (nmoles/g)		
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	51 ± 3 (4)	40 ± 12 (4)
VIEJO CONTROL	48 ± 15 (3)	73 ± 12 (4)
JOVEN TRATADO	74 ± 4 (4)	52 ± 10 (4)
VIEJO TRATADO	90 ± 18 (3)	57 ± 16 (4)

---



---

PEROXIDACION TISULAR - TBA vitro (nmoles/g)		
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	136 ± 28 (4)	102 ± 31 (3)
VIEJO CONTROL	88 ± 23 (2)	134 ± 36 (4)
JOVEN TRATADO	113 ± 12 (4)	99 ± 34 (3)
VIEJO TRATADO	153 ± 16 (2)	69 ± 45 (3)

---

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar.

( ) = número de datos

**Tabla 37.-** Niveles de glutatión reducido en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	GSH ( $\mu\text{moles/g}$ )	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,73 $\pm$ 0,12 (4)	0,55 $\pm$ 0,02 (4)
VIEJO CONTROL	0,74 $\pm$ 0,18 (4)	0,70 $\pm$ 0,07 (4)
JOVEN TRATADO	1,19 $\pm$ 0,20 (4)	0,81 $\pm$ 0,15 (4)
VIEJO TRATADO	1,44 $\pm$ 0,30 (4)	0,73 $\pm$ 0,12 (4)

**Tabla 38.-** Niveles de ácido ascórbico en el riñón de animales jóvenes y viejos de *Rana perezi* después de 14,5 y 26,5 meses de tratamiento.

	ASCORBICO ( $\mu\text{moles/g}$ )	
	14,5 meses	26,5 meses
JOVEN CONTROL	0,17 $\pm$ 0,05 (4)	0,19 $\pm$ 0,06 (4)
VIEJO CONTROL	0,16 $\pm$ 0,04 (4)	0,20 $\pm$ 0,05 (4)
JOVEN TRATADO	0,39 $\pm$ 0,09 (4)	0,17 $\pm$ 0,06 (4)
VIEJO TRATADO	0,24 $\pm$ 0,08 (4)	0,39 $\pm$ 0,20 (4)

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar.

( ) = número de datos

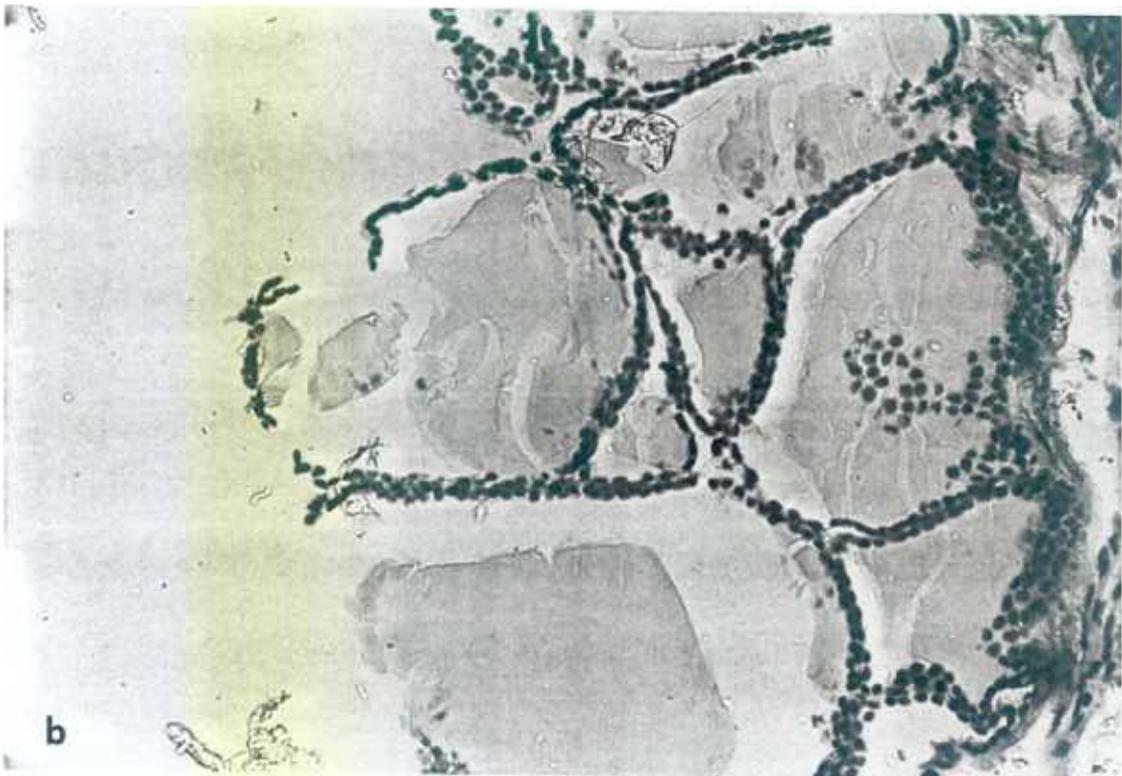
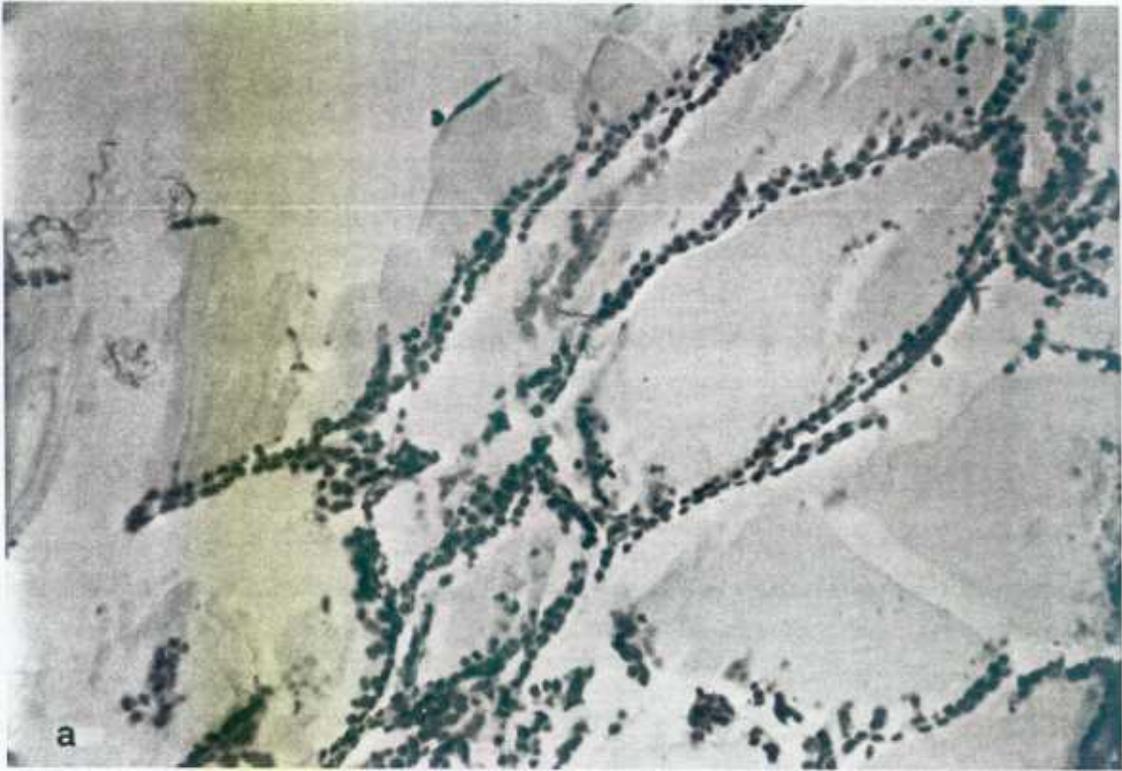


Figura 37.- Fotomicrografía óptica de un corte de tiroides de *Rana perezi*.  
(a) tiroides de un animal control. (b) tiroides de un animal tratado (x 160).

### 1.- Estado general de los tejidos (Figura 38)

En la Figura 38 se muestra el estado de las mitocondrias (Figura 38a) y de las vainas de mielina (Figura 38b) en cortes de corteza cerebral de animales tratados. En ambos casos no se aprecia ningún tipo de anormalidad o alteración, lo que nos indica que el tratamiento no ha afectado el buen estado de los tejidos.

### 2.- Tipos de gránulos de lipofuscina (Figuras 39 y 40)

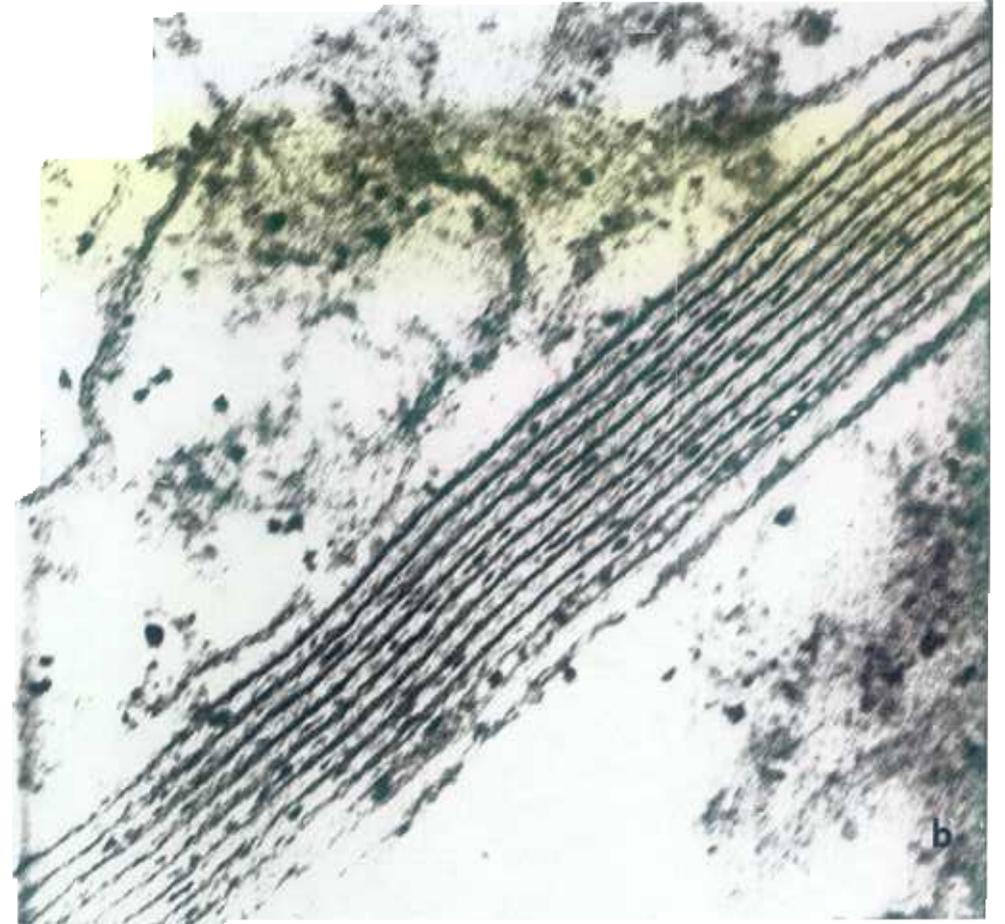
En la Figura 39 se muestran gránulos primarios (Figura 39a) y gránulos secundarios (Figura 39b). Los gránulos primarios, también denominados tipo lisosoma, presentan un aspecto homogéneo a diferencia de los secundarios, en los que ya comienza a apreciarse una heterogeneidad, con zonas claras y oscuras.

En la Figura 40 aparecen gránulos terciarios o tipo lipofuscina, en los que el aspecto heterogéneo es evidente. Se aprecian zonas muy oscuras, otras de una intensidad intermedia y zonas de aspecto totalmente claro.

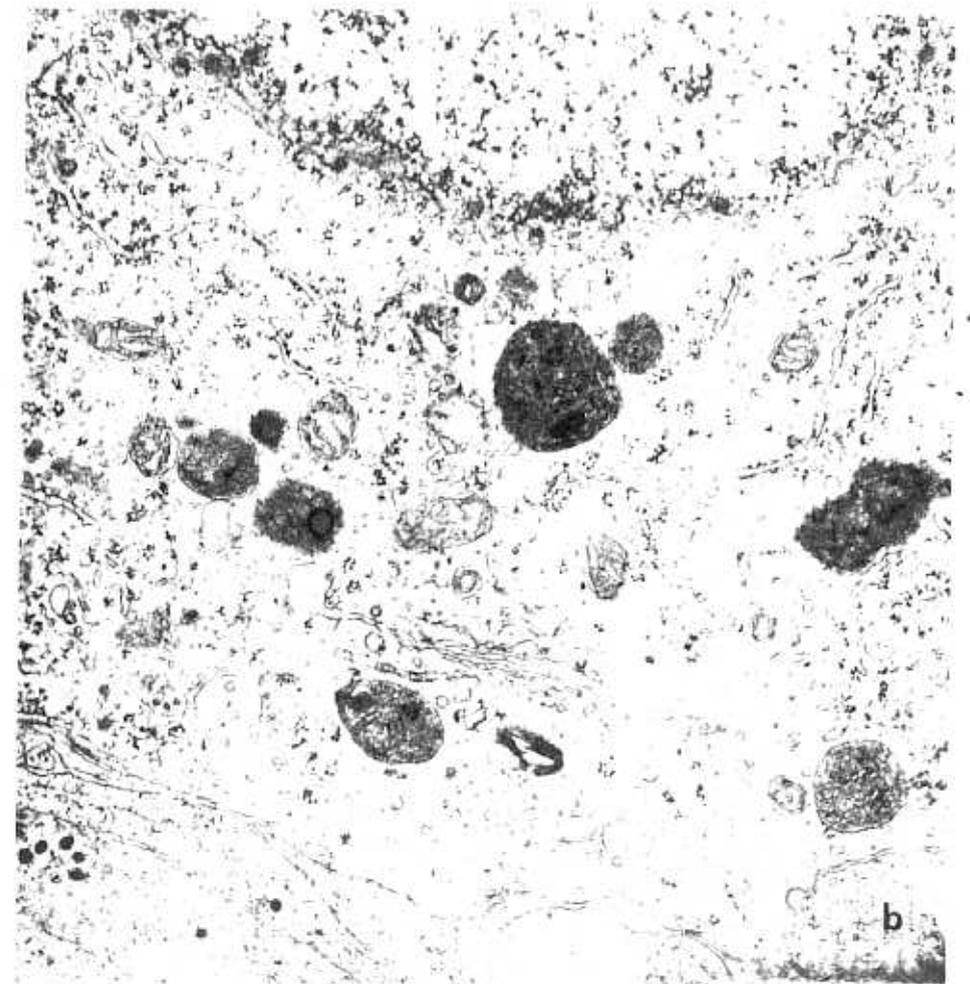
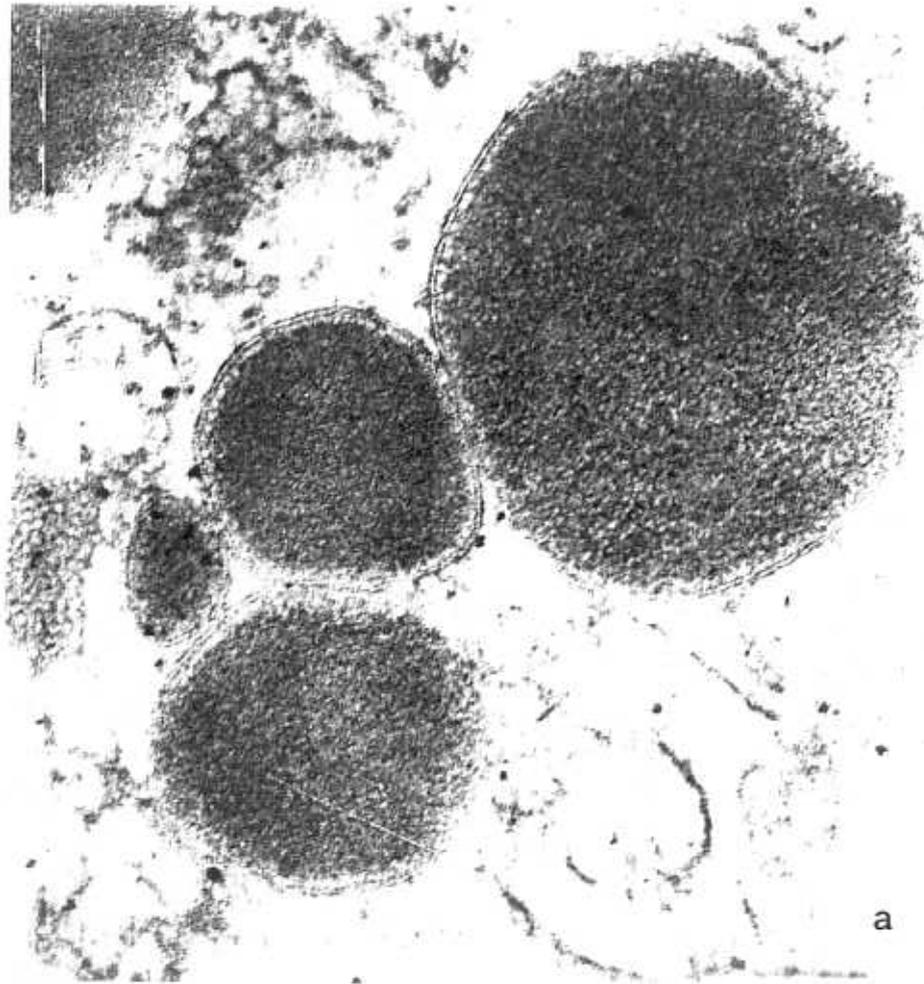
### 3.- Acumulación de lipofuscina después de 14,5 meses de tratamiento (Figuras 41 y 42)

En las Figuras 41 y 42 se muestra la acumulación de lipofuscina en neuronas corticales en los distintos grupos experimentales después de 14,5 meses de tratamiento. Los animales viejos controles (Figura 41b) acumularon mayor cantidad de gránulos de lipofuscina, y de aspecto más heterogéneo, que los animales jóvenes controles (Figura 41a), aunque no se realizó un estudio morfométrico riguroso.

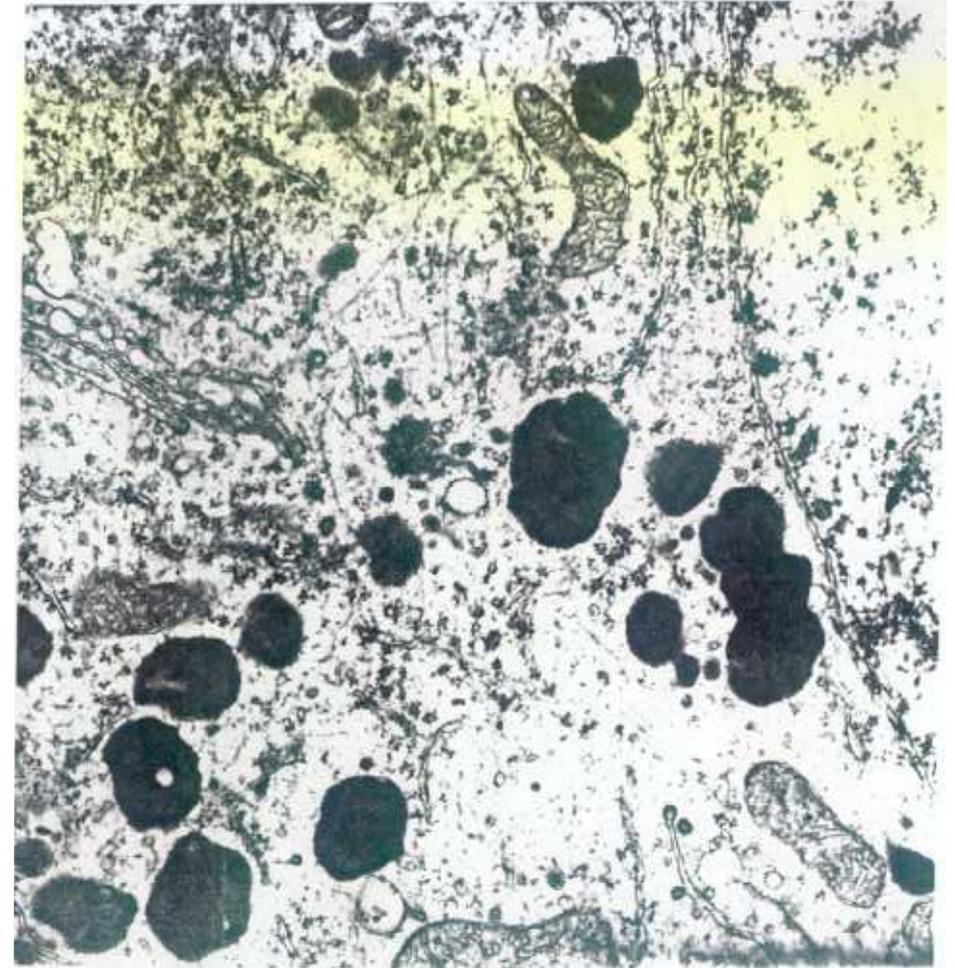
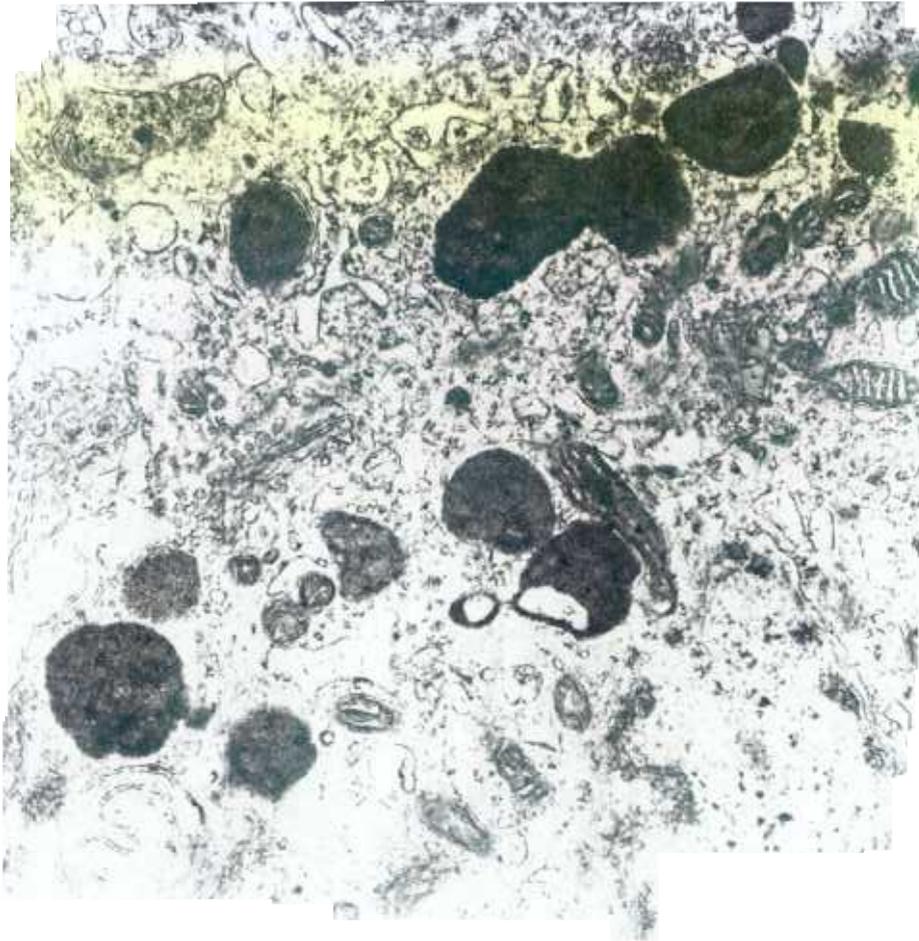
Por el contrario, los animales viejos tratados muestran pocos gránulos de lipofuscina y además de un grado de heterogeneidad similar al de los animales jóvenes controles. Muchas neuronas presentan incluso una ausencia total de gránulos de lipofuscina en su citoplasma (Figura 42).



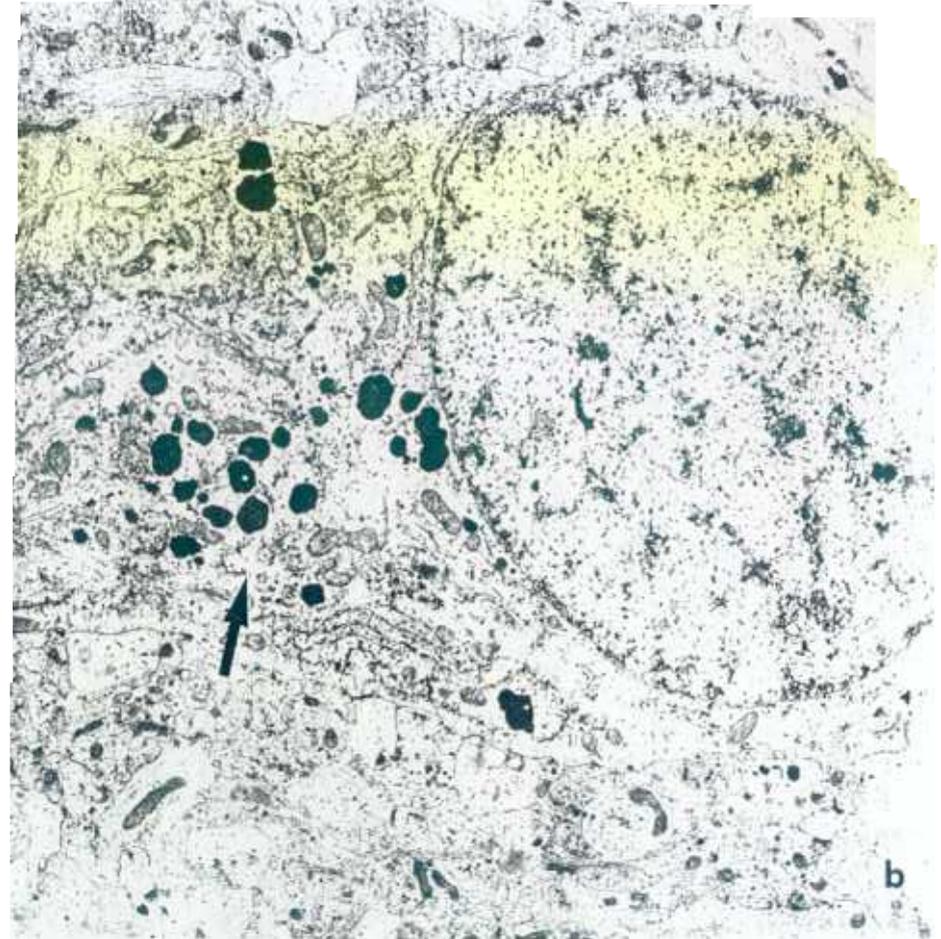
**Figura 38.-** Fotomicrografía electrónica (a) de mitocondrias (x 73.300) y (b) de vaina de mielina (x 220.000) de la corteza cerebral de animales de *Rana perezi* tratados con aminotriazol.



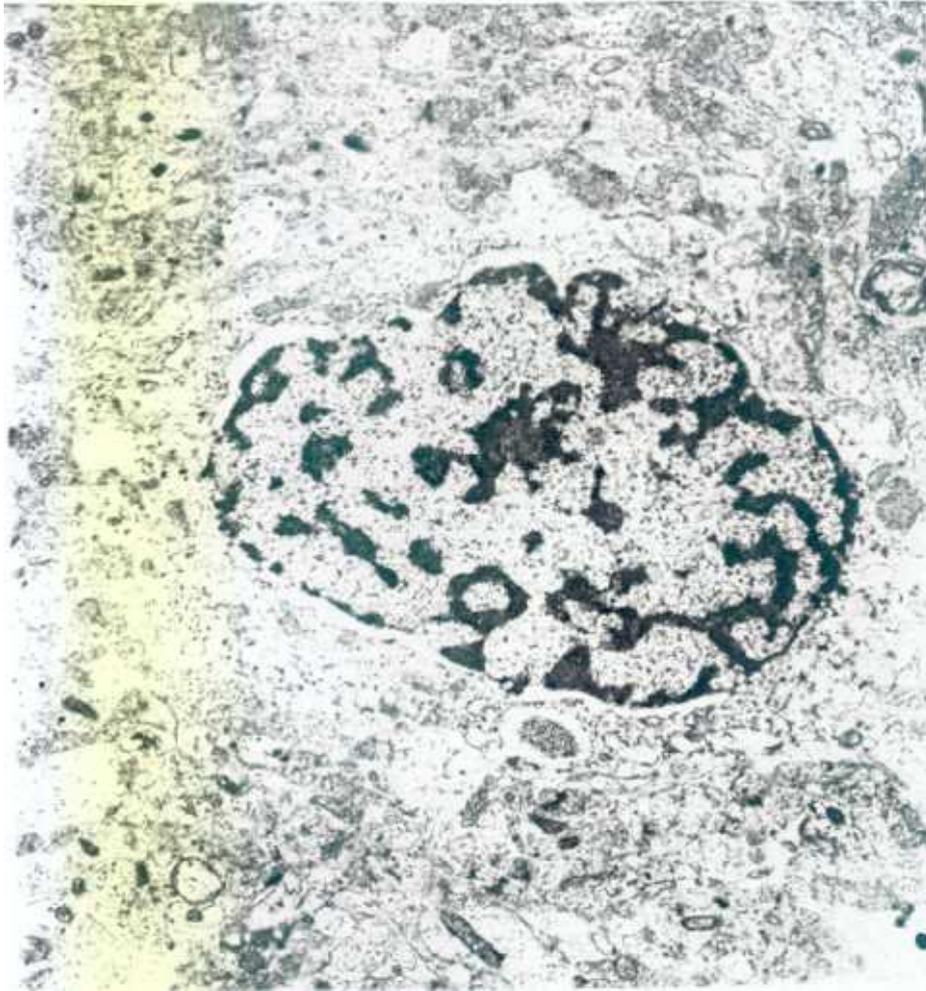
**Figura 39.-** Fotomicrografía electrónica de gránulos o lisosomas (a) primarios (x 125.000) y (b) secundarios (x 18.300) en cortes de corteza cerebral de animales de *Rana perezii*.



**figura 40.-** Fotomicrografia electronica de granulos terciarios o tipo lipofuscina en cortes de corteza cerebral de animales de *Rana perezii* (x 18.300).



**Figura 41.-** Fotomicrografía electrónica mostrando la acumulación de lipofuscina en neuronas corticales de animales (a) controles jóvenes (x 4.400) y (b) viejos (x 6.500) de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento.



**Figura 42.-** Fotomicrografía electrónica de una neurona cortical de un animal viejo tratado de *Rana perezi* después de 14,5 meses de tratamiento, mostrando ausencia de acumulación de lipofuscina (x 10.000).

---

#### **4.- Acumulación de lipofuscina después de 26.5 meses de tratamiento (Figura 43)**

Los animales viejos controles volvieron a mostrar después de 26,5 meses de tratamiento una acumulación de gránulos de lipofuscina heterogéneos en su corteza cerebral (Figura 43a). Sin embargo, y contrastando con los resultados del año anterior, después de 14,5 meses de tratamiento, los animales viejos tratados no mostraron un descenso en el número de depósitos de lipofuscina en su tejido cerebral (Figura 43b). Por el contrario, se aprecia una acumulación de gránulos de lipofuscina heterogéneos claramente superior en los animales viejos tratados que en los viejos controles.

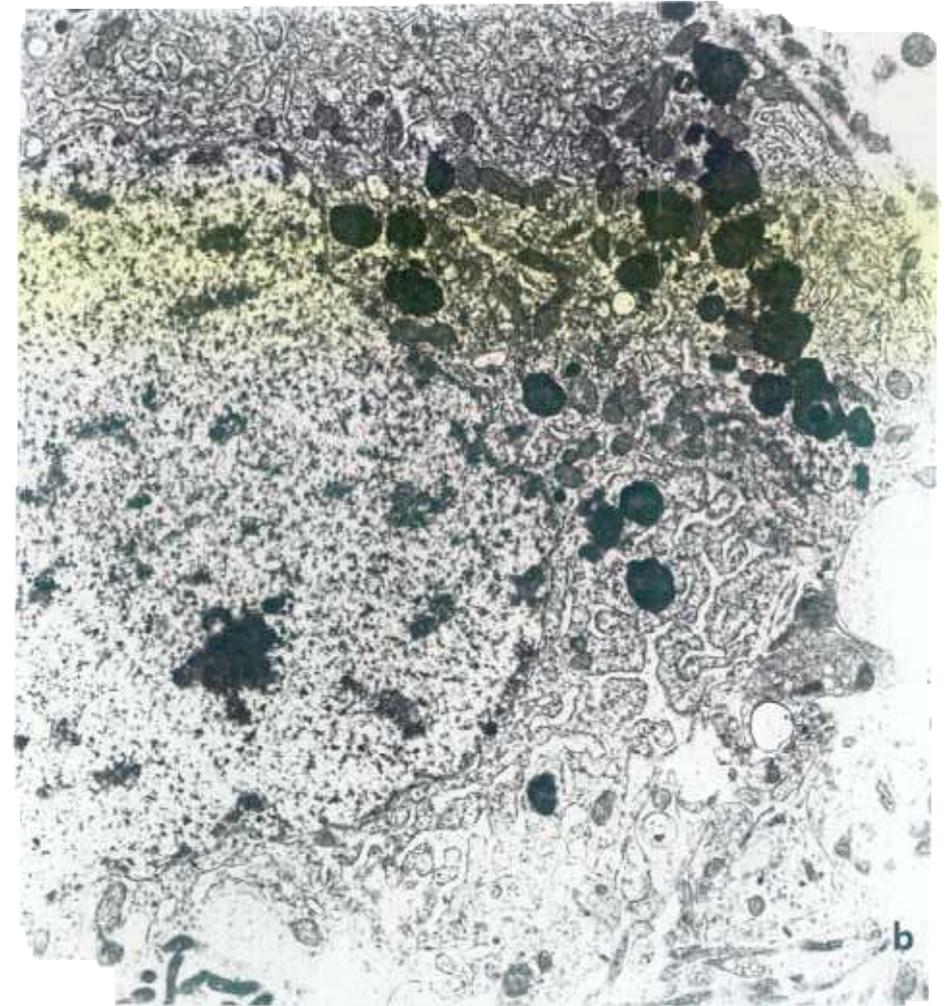
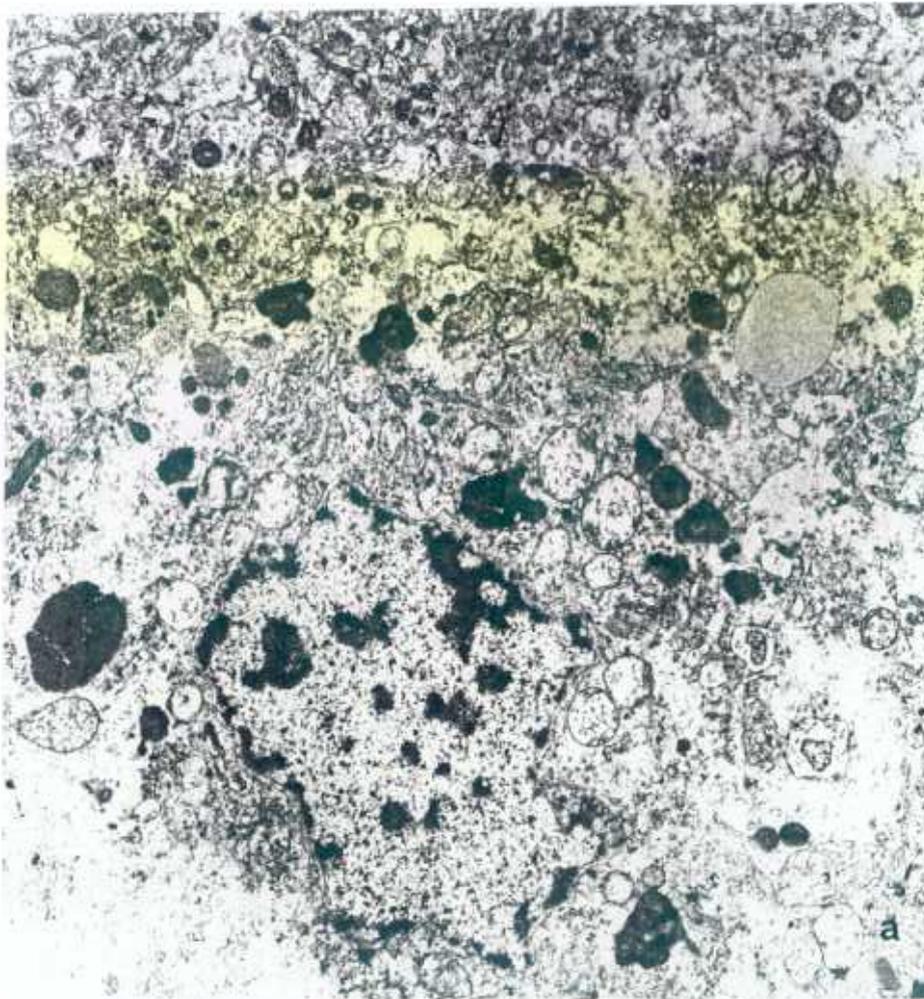


Figura 43.- Fotomicrografía electrónica mostrando la acumulación de lipofuscina en neuronas corticales de animales viejos controles (a) y tratados (b) de *Rana perezi* después de 26,5 de tratamiento (x 10.000).

Analizando en primer lugar el efecto de la edad sobre los distintos parámetros estudiados, tanto enzimáticos como no enzimáticos, en los distintos órganos, llama la

**DISCUSION**

El tratamiento con aminotriazol (AT) para inhibir la actividad catalasa de *Rana perezi* ha resultado muy eficaz, consiguiéndose una inhibición casi total de actividad en todos los órganos. Estos % de inhibición oscilaron entre el 80-90% y están de acuerdo con los resultados de trabajos anteriores en esta misma especie (López Torres, 1988; Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a). Grados similares de inhibición de actividad catalasa por aminotriazol *in vivo* se han encontrado en extractos completos de *Musca domestica* (Allen *et al.*, 1983) y en el hígado de cobayas (Geerts y Roels, 1982) y ratones (Jones y Neill, 1982) utilizando dosis de inhibidor análogas, así como en el cerebro de rata (Yusa *et al.*, 1987) o en cultivos de hepatocitos (Starke y Farber, 1985).

El peso de nuestras ranas no se ha visto afectado por el tratamiento con aminotriazol, contrastando con las reducciones de peso descritas en ratones tratados también con este fármaco (Jones y Neill, 1982). Estas reducciones de peso fueron debidas al descenso espontáneo de la ingesta y también se produjo una reducción de la cantidad de grasa corporal (Jones y Neill, 1982). Como ya sabíamos por trabajos anteriores (López Torres, 1988; Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a) el apetito aparente de *Rana perezi* no se ve alterado por el tratamiento con aminotriazol.

La evolución del peso en los cuatro grupos con el paso del tiempo en el laboratorio no ha sufrido modificaciones dignas de mención, lo que nos da idea de que la dieta ha resultado suficiente para cubrir los requerimientos mínimos de esta especie durante todo el ciclo vital adulto.

En cuanto al peso total de los distintos órganos, no se aprecian modificaciones debidas a la edad o al tratamiento. No disponemos de datos previos sobre el efecto del AT en el peso de distintos órganos, a excepción de un único trabajo de nuestro grupo en el que, tras 15 días de tratamiento con AT, inyectado cada 48 horas, sí se producía un incremento en el peso total del pulmón, aunque no en el relativo, no existiendo variaciones en los otros órganos (López Torres, 1988; Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a). Las diferencias de dosis y duración del tratamiento tampoco nos permiten establecer

comparaciones. Pero lo que sí se puede afirmar, es que *Rana perezi* parece mostrar una capacidad global mayor que los mamíferos para tolerar el tratamiento con aminotriazol sin sufrir cambios deletéreos.

Esto se ve corroborado por los resultados obtenidos en nuestro estudio a microscopía óptica del tiroides. Se ha descrito cómo el AT da lugar a daño hepático en la rata, produciendo una hipertrofia de los hepatocitos (Reitze y Seitz, 1985). El AT también afecta al tiroides; ejerce un efecto inhibitor sobre la peroxidasa tiroidea y la disminución de la cantidad de hormona tiroidea circulante constituye un estímulo para que la hipófisis produzca un exceso de tiotropina, provocando la hiperplasia de la glándula tiroidea. Se han descrito también, inducciones de tumores por AT en el tiroides, hígado, hipófisis y párpados, y carcinomas en el conducto auditivo de ratas (Steinhoff *et al.*, 1983), pero no en el ratón o en el hamster. Sin embargo, los tiroides de nuestras ranas tratadas con AT presentan un aspecto histológico completamente normal, lo que está de acuerdo con la ausencia de alteraciones morfológicas debidas al AT en *Rana perezi*.

Una posible explicación para esta mayor resistencia de *Rana perezi* al tratamiento con AT podemos encontrarla en los elevados niveles endógenos de enzimas antioxidantes constitutivas, especialmente GPx, en relación con su tasa metabólica global, como ya hemos señalado en trabajos anteriores (López Torres, 1988; Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a). La actividad GPx en *Rana perezi* es superior a la de otras especies de anfibios como por ejemplo *Discoglossus pictus*; aún más, la actividad absoluta GPx de algunos órganos de *Rana perezi* excede a veces la de tejidos homólogos de mamíferos pequeños como son ratones, ratas, cobayas y hamsters (Igarashi *et al.*, 1983; Warshaw *et al.*, 1985; Kihlström *et al.*, 1986). El hecho de que *Rana perezi* presente actividades GPx similares a las descritas para mamíferos, mientras que su tasa metabólica es cerca de un orden de magnitud inferior a la de especies de mamíferos de un tamaño semejante, y que por estudios comparados se sepa que la sensibilidad a la toxicidad del oxígeno en los vertebrados está directamente relacionada con la tasa metabólica de la especie considerada (Barthelemy *et al.*, 1981), hace suponer que la relación actividad GPx/tasa de generación de  $H_2O_2$  *in vivo* es probablemente mucho más alta en los tejidos de *Rana perezi* con las consiguientes ventajas que ello puede suponer.

*A mis Padres*

---

antioxidante. Los datos, sin embargo, son compatibles con una presencia continua de radicales libres en el tejido a lo largo de la vida del individuo, lo que provocaría una tasa de envejecimiento constante.

El único parámetro que en las comparaciones longitudinales de nuestro trabajo ha mostrado un descenso sistemático en los cuatro grupos, en función de la edad, ha sido la peroxidación tisular. Sin embargo, en las medidas anuales, en ninguno de los tres años se apreciaron diferencias entre animales jóvenes y viejos. Esto nos hace pensar que el descenso observado longitudinalmente, de los valores de peroxidación, no está ligado a la edad de las ranas, sino al tiempo de estancia en el laboratorio.

Existen varios factores que pueden contribuir a los valores finales de peroxidación tisular (TBA), pero uno de los más importantes es la cantidad de antioxidantes liposolubles endógenos en los tejidos. Se ha visto que la vitamina E (derivada de la dieta), que es el principal antioxidante de las membranas biológicas, se acumula en los tejidos de ratas de laboratorio desde los 3 a hasta los 30 meses de edad (Vatassery *et al.*, 1984; Rikans *et al.*, 1991). Como la peroxidación tisular se ve fuertemente inhibida por la vitamina E endógena, la acumulación dependiente del tiempo de ésta en los tejidos de la rana explicaría los descensos observados. En nuestro trabajo no contemplamos esta posibilidad, pero no conviene olvidar que nuestros animales, desde su llegada al laboratorio, han recibido como complemento de su dieta un complejo vitamínico y mineral hasta el final del experimento, 33 meses más tarde.

Los datos del cerebro de *Rana perezi* indican que un aumento del estrés oxidativo y un descenso de las defensas antioxidantes no tiene lugar en nuestras ranas viejas. Como ya ocurría en el pulmón, no se producen variaciones en ninguna de las enzimas antioxidantes estudiadas, niveles de glutatión y peroxidación tisular.

Los niveles de GSSG en el cerebro no fueron detectables por estar fuera del límite de sensibilidad del método. Esto contrasta con su presencia en el cerebro de rata (Benzi *et al.*, 1988a), a concentraciones muy bajas, unas mil veces menores que las de GSH, utilizando el mismo método de medida.

La edad de los animales no aumentó los valores de peroxidación en el cerebro o la susceptibilidad a la misma y tampoco provocó el descenso de los antioxidantes cerebrales en ninguno de los tres años en los que se llevó a cabo el estudio. Lo mismo ocurrió al hacer comparaciones longitudinales dentro de cada grupo. En este caso, se han observado incrementos durante el primer año, que no se han repetido después, de las actividades enzimáticas SOD y CAT, y descensos en los valores de peroxidación. Como ya hemos señalado anteriormente, estas variaciones las atribuimos, más que a un efecto de la edad, a una mejor alimentación de los animales en el laboratorio que la que recibían antes de ser capturados. La dieta del laboratorio incluía, como es usual en las dietas estándar, un complejo vitamínico y mineral. Muchas de estas enzimas poseen metales en su estructura y, por otro lado, se conoce el efecto de vitaminas antioxidantes disminuyendo los niveles de peroxidación. Estos dos datos nos llevan a pensar que las variaciones observadas son debidas a la dieta y no un reflejo del envejecimiento, lo que parece confirmarse con la ausencia de diferencias significativas en las comparaciones anuales, así como por la falta de continuidad de estas variaciones después del primer año.

Como ya ocurría con el pulmón, la mayor parte de los datos sobre envejecimiento y radicales provienen de trabajos en cerebro de mamíferos y concretamente, del cerebro de rata. Además, en la mayor parte de los casos no se han realizado estudios completos y globales, por lo que existen muchos datos contradictorios; sin embargo, la mayoría de los trabajos demuestran una ausencia de cambios en parámetros relacionados con los radicales libres con la edad en el cerebro de roedores (Barja de Quiroga *et al.*, 1990).

De todas formas, en cerebro de roedores viejos se han descrito valores similares (Kellog y Fridovich, 1976; Mizuno y Ohta, 1986; Cand y Verdeti, 1989; Ansari *et al.*, 1989; Kurobe *et al.*, 1990; Semsei *et al.*, 1991; Ciriolo *et al.*, 1991), descensos (Benzi *et al.*, 1988b; Vanella *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1990b; Mariucci *et al.*, 1990) o incluso incrementos (Dahn *et al.*, 1983; Sohal *et al.*, 1990b; Ciriolo *et al.*, 1991) de actividad SOD comparando con los niveles en adultos jóvenes maduros. Con la actividad CAT ocurre lo mismo y así, en algunos trabajos no se ve modificada (Ansari *et al.*, 1989; Tayarami *et al.*, 1989), en otros baja (Cand y Verdeti, 1989; Semsei *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1990b; Ciriolo *et al.*, 1991) y

también existen trabajos en los que se han descrito incrementos de actividad CAT con la edad (Sohal *et al.*, 1990b). Con la actividad glutatión peroxidasa (GPx) vuelve a repetirse este patrón poco definido de ausencia de variaciones (Mizuno y Ohta, 1986; Ansari *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1990b; Sohal *et al.*, 1990b; Ciriolo *et al.*, 1991) o incrementos (Vitorica *et al.*, 1984; Benzi *et al.*, 1989; Ciriolo *et al.*, 1991). La GR no varía (Mizuno y Ohta, 1986), disminuye (Benzi *et al.*, 1989) o aumenta (Hothersall *et al.*, 1981; Sohal *et al.*, 1990b). En cuanto a los niveles de glutatión, se han descrito descensos de GSH y aumentos paralelos de GSSG y GSSG/GSH durante el envejecimiento en cerebro de ratas Wistar (Benzi *et al.*, 1988a) mientras que no se producen cambios en los niveles de GSH en otros trabajos realizados con ratas Fisher 344 (Rikans y Moore, 1988; Benzi *et al.*, 1990).

De forma análoga a lo que ocurre con las defensas antioxidantes y en lo que a valores de peroxidación se refiere, se han encontrado aumentos de los valores de peroxidación *in vivo* (Mizuno y Ohta, 1986; Sawada y Carlson, 1987) y descensos (Cand y Verdeti, 1989). En el caso del TBA *in vitro* no se han descrito cambios durante el envejecimiento (Ansari *et al.*, 1989; Barja de Quiroga *et al.*, 1990) o se han producido descensos (Devasagayam, 1989). Parte de estas discrepancias pueden atribuirse a diferencias en la estirpe o en la edad elegida. En algunos estudios se utilizan como animales jóvenes animales de 4 meses que no son completamente maduros, mientras que en otros trabajos en los que se describen descensos claros en animales muy viejos, ratas de hasta 35 meses, en los que la presencia de patologías es muy frecuente, estos descensos no se producen en animales seniles de 25 meses (Benzi *et al.*, 1988b).

Estudios realizados en cerebro humano ponen de manifiesto una constancia de los valores de actividad SOD (Tolmasoff *et al.*, 1980) y peroxidación *in vitro* (Cutler, 1985), es decir, susceptibilidad a la peroxidación, durante el envejecimiento desde los 20 hasta los 80 años. También la constancia de los valores de actividad citocromo c oxidasa en nuestro trabajo está de acuerdo con los datos procedentes de la corteza cerebral de rata (Gorini *et al.*, 1989).

Por último, en lo que al efecto de la edad sobre los parámetros estudiados se refiere, los datos en hígado y riñón tampoco muestran un descenso de la capacidad

antioxidante enzimática o no enzimática y un incremento de la peroxidación al comparar grupos transversal o longitudinalmente. Únicamente en el hígado, el primer año se observa un descenso de la actividad SOD y un incremento de la actividad GPx no dependiente en el grupo de animales viejos. Mientras que en el riñón, será la actividad GPx dependiente la que aumente el segundo año, año en el que en las comparaciones entre grupo joven y viejo también observamos un incremento importante del cociente GSSG/GSH en el hígado del grupo de animales viejos. Sin embargo, en la mayor parte de los casos se observó repetidamente una falta de diferencias entre animales jóvenes y viejos.

Con los valores de peroxidación *in vitro* en el hígado, vuelve a pasar lo mismo que en los órganos anteriores al comparar los resultados longitudinalmente, observándose un descenso significativo, así como un aumento de actividad SOD y GPx.

Todos estos resultados contrastan con los obtenidos en *Musca domestica*. En homogenados del animal completo se han descrito claros descensos de las principales enzimas antioxidantes como son la SOD, la CAT y también en los niveles de GSH junto con incrementos agudos de GSSG y TBA *in vivo* e *in vitro*, a pesar del descenso del consumo de oxígeno en función de la edad (Sohal *et al.*, 1983; Sohal *et al.*, 1985; Sohal y Allen, 1986; Farmer y Sohal, 1989). El hecho de que estos trabajos estén realizados en extractos del animal completo plantea problemas de interpretación y complica su comparación con los obtenidos en diferentes órganos de vertebrados. Descensos de los niveles de glutatión con la edad han sido también encontrados en homogenados completos de mosquitos, *Aedes aegypti*, cuya longevidad máxima es parecida a la de *Musca domestica* (Richie y Lang, 1988). Sin embargo, un trabajo reciente también realizado por el grupo de Sohal en otra especie de insecto ya no está tan de acuerdo con los anteriores resultados. En ese trabajo realizado en *Drosophila melanogaster* se han encontrado descensos de CAT, GR y GSH, GSH/GSSG y NADPH/NADP<sup>+</sup> en animales viejos mientras que la SOD y el cociente NADH/NAD<sup>+</sup> aumentaron, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no varió, y los niveles de peroxidación *in vivo* descendieron (Sohal *et al.*, 1990a).

A pesar de los resultados anteriores (Sohal, 1986), en hígado y riñón de mamíferos los trabajos vuelven a ser contradictorios y no existe un patrón claro de

variación. En estudios realizados en hígado de rata, la actividad SOD no ha variado con la edad (Lammi-Keefe *et al.*, 1984; Koizumi *et al.*, 1987; Kurobe *et al.*, 1990; Sohal *et al.*, 1990b; Masoro *et al.*, 1991), o ha descendido (Kellog y Fridovich, 1976; Reiss y Gershon, 1976; Cand y Verdeti, 1989; Semsei *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1990a; Semsei *et al.*, 1991). Con la actividad CAT ocurre lo mismo, no varía (Koizumi *et al.*, 1987; Sohal *et al.*, 1990b; Masoro *et al.*, 1991), o disminuye (Ross, 1969; Baird y Samis, 1971; Cand y Verdeti, 1989; Laganier y Yu, 1989; Semsei *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1990a). La GPx no se depende de hígado de rata (Cand y Verdeti, 1989) y ambas GPx junto con la GR del hígado de ratón descienden con la edad en algunos estudios (Hazelton y Lang, 1985). En otros casos las actividades GPx y GR aumentan (Rao *et al.*, 1990a; Sohal *et al.*, 1990b), o no varían (Laganier y Yu, 1989; Masoro *et al.*, 1991).

En cuanto a los niveles de GSH, se mantienen (Rikans y Moore, 1988; Carrillo *et al.*, 1989) o descienden (Hazelton y Lang, 1980; Stohs y Lawson, 1986; Laganier y Yu, 1989). Un descenso progresivo en función de la edad de los niveles de GSH en plasma, parámetro que normalmente refleja los niveles de GSH en hígado, ha sido descrito en humanos utilizando una muestra de gran número de personas, mientras que en este mismo estudio los valores de GSSG no variaron (Müller *et al.*, 1989). Tampoco se modificaron con la edad los niveles de GSSG en trabajos realizados en hígado de ratón (Hazelton y Lang, 1980). Los niveles de ascorbato tampoco descendieron con la edad en el único trabajo que hemos encontrado (Masoro *et al.*, 1991). Resulta interesante que uno de estos trabajos negativos (Sohal *et al.*, 1990b) proviene del mismo laboratorio en el que se obtuvieron claros descensos de antioxidantes con la edad en *Musca domestica*, pero no en *Drosophila melanogaster*.

Recientemente se ha sugerido que el efecto de la edad depende del sexo en el caso de la actividad CAT en el hígado (Rikans *et al.*, 1991). Los machos mostrarían descensos mientras que las hembras presentarían incrementos al envejecer. Sin embargo, el estudio minucioso de la bibliografía demuestra que el sexo no puede explicar el carácter contradictorio de los resultados, ya que se han descrito tanto descensos (Laganier y Yu, 1989; Semsei *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1990a) como ausencia de cambios (Sohal *et al.*, 1990b)

---

para la CAT del hígado de rata macho, mientras que otros (Koizumi *et al.*, 1987) han demostrado una ausencia de variaciones para la misma enzima y tejido, en ratas hembras.

De todo lo expuesto hasta el momento se deduce que las enzimas antioxidantes y otros antioxidantes en general, exhiben un patrón mixto en función de la edad. En cada órgano examinado, unas enzimas se mantienen, otras disminuyen y algunas aumentan. Aunque no resulta fácil aclarar estos datos contradictorios conviene tener en cuenta algunas consideraciones.

En la mayor parte de los trabajos, la GPx es la enzima antioxidante que no suele descender con la edad o incluso muestra una tendencia a aumentar. Por otro lado, hay que señalar que la mayoría de los trabajos utilizan un número de edades muy limitado. En este sentido, el estudio más completo que conocemos es el de Kurobe de 1990 (Kurobe *et al.*, 1990) que incluye 7 edades diferentes a lo largo del ciclo vital de la rata y en el que no se encontraron variaciones de actividad SOD con la edad en los tres órganos estudiados, hígado, riñón y cerebro.

Aparte de las diferencias que puede suponer el uso de distintas metodologías y distintas cepas, algunos descensos con la edad pueden ser debidos a que las condiciones de mantenimiento de los animales a largo plazo no sean óptimas. Por otro lado, cuando se encuentran descensos de algún antioxidante particular, normalmente se trata de descensos de poca magnitud y su significado fisiológico no está en absoluto claro. Es aventurado interpretar estos descensos como una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo en los animales viejos, sin tener otros tipos de información como los cambios en la tasa de generación de radicales con la edad.

Se han observado repetidamente descensos en la generación de radicales de oxígeno *in vitro* en ratas viejas (Floyd *et al.*, 1984; LeBel y Bondy, 1991) y sólo un trabajo, que utiliza resonancia electrónica de espín, describe importantes incrementos en la generación de radical superóxido por parte de mitocondrias de cerebro y corazón de rata con la edad (Sawada y Carlson, 1987), al igual que en partículas submitocondriales en el músculo de *Musca domestica* (Farmer y Sohal, 1989). Si la generación de radicales

disminuye *in vivo* con la edad, lo que parece verse confirmado por un reciente trabajo realizado también con resonancia electrónica de espín (Zhan *et al.*, 1992) y por los datos negativos del hígado en el trabajo de Sawada y Carlsson, los descensos de defensas antioxidantes que se han observado ocasionalmente podrían ser sólo un fenómeno fisiológico de tipo compensatorio de regulación negativa o a la baja, en vez de un cambio deletéreo que conduzca a un mayor estrés oxidativo.

Por último, otro de los grandes problemas en este campo es que la mayoría de los trabajos estudian un solo antioxidante o muy pocos. Este hecho complica mucho la interpretación de los resultados ya que se sabe que los antioxidantes celulares están bajo control homeostático (Sohal *et al.*, 1984; Cutler, 1984; este trabajo). Por ello, un descenso en un antioxidante concreto puede ser compensado por un aumento de otro que no haya sido objeto del estudio. De ahí la necesidad de trabajos globales que intenten estudiar el sistema antioxidante completo durante el envejecimiento. En uno de los pocos trabajos de este tipo realizados hasta la fecha, no se observaron variaciones con la edad en las actividades SOD, CAT, GPx Se y no Se dependiente, y GR; en los niveles de GSH, GSSG y GSSG/GSH, o en los valores de peroxidación *in vivo* (Barja de Quiroga *et al.*, 1990a; Pérez *et al.*, 1991).

De manera similar a lo que ocurre con las defensas antioxidantes, la única especie en la que se han descrito claros incrementos de peroxidación lipídica con el envejecimiento es *Musca domestica*. En roedores, por el contrario, se han encontrado incrementos (Devasagayam, 1986; Stohs y Lawson, 1986; Sawada y Carlson, 1987) y descensos en el hígado de rata (Cand y Verdeti, 1989; Levitsky *et al.*, 1989; Ji *et al.*, 1990) y ausencia de cambios o descensos en microsomas hepáticos (Devasagayam y Pushpendran, 1986), de los valores de peroxidación tisular, TBA *in vivo*, que resultan de la aplicación directa del test del TBA a muestras biológicas. En *Rana perezi*, como se deduce de nuestros datos, no se producen variaciones con la edad en contraste con los descensos descritos en *Drosophila melanogaster* (Sohal *et al.*, 1990a). Comprobamos de nuevo la ausencia de un patrón claro en el incremento de los valores de peroxidación *in vivo* en un amplio abanico de especies, que no permite generalizar conclusiones, ni siquiera en el caso de los insectos.

Por otro lado, el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) es un test muy sensible pero poco específico. Hemos comprobado en varias especies, como ocurre en este trabajo, que los valores de MDA por este método pueden llegar a ser incluso de cinco a diez veces mayores que los de MDA analizado por HPLC en las mismas muestras. Esto significa que hasta un 80-90% de los valores de TBA *in vivo* no son MDA sino que se trata de compuestos relacionados con la peroxidación lipídica (Sevanian y Hochstein, 1985), como los hidroperóxidos, o incluso no relacionados, como ocurre con la glucosa y otros compuestos. De hecho, la validez del TBA *in vivo* como indicador de peroxidación durante el envejecimiento ha sido cuestionada recientemente (Sohal *et al.*, 1990a).

Sin embargo, si la muestra es sometida a un estrés peroxidativo antes de hacer el test del TBA, es decir, cuando se trata de peroxidación o TBA *in vitro*, los valores se multiplican y las interferencias de sustancias no relacionadas con la peroxidación lipídica se minimizan hasta el 8-9% o menos. Desgraciadamente, existen pocos trabajos cinéticos de la tasa de producción de peróxidos tisulares *in vitro* en animales viejos. Sin embargo, la mayoría de ellos son coincidentes y muestran un descenso de la tasa de peroxidación *in vitro* con la edad o una ausencia de cambios. Así ocurre en microsomas hepáticos de rata, utilizando NADPH para inducir la peroxidación (Devasagayam, 1986), o ascorbato (Devasagayam y Pushpendran, 1986). Más recientemente se han encontrado resultados similares en microsomas de corteza cerebral de rata (Devasagayam, 1989). Otros autores no han encontrado variaciones en el cerebro de rata midiendo a un tiempo único, como ya se ha señalado al comentar los datos del cerebro (Ansari *et al.*, 1989). En uno de los trabajos más completos realizado en distintos tejidos de rata, en nuestro laboratorio, se han encontrado también descensos en ratas viejas en el caso del hígado, y no hubo variaciones en el pulmón y en el cerebro (Barja de Quiroga *et al.*, 1990a; Pérez *et al.*, 1991; Barja de Quiroga *et al.*, 1992; López-Torres *et al.*, 1992). Nuestros resultados en *Rana perezi* están totalmente de acuerdo con todos estos trabajos. Hay que destacar que nuestros datos, tanto los de *Rana perezi* como los del trabajo realizado en rata, junto con los del grupo de Devasagayam, son los únicos en los que el proceso de peroxidación *in vitro* se ha seguido cinéticamente en función del tiempo; en el resto de los trabajos se trata de una medida puntual. La total coincidencia de estos trabajos cinéticos apoya los resultados y en el caso de nuestro trabajo en rata amplía el descenso en la peroxidación hepática descrito por

Devasagayam en microsomas, al hígado y cerebro completos. A pesar de que la mayor parte de los trabajos están de acuerdo sobre este punto, existe alguno en el que se describen incrementos de la peroxidación *in vitro* (Player *et al.*, 1977), pero en general y coincidiendo con los resultados del presente trabajo, que demuestran una ausencia de cambios con la edad en hígado, riñón, pulmones y cerebro de *Rana perezi*, se han encontrado resultados similares en el cerebro de ratones de campo, babones, monos rhesus, y en el hombre desde los 15 hasta los 80 años (Cutler, 1985).

En cuanto al significado de estos descensos de peroxidación, no parece lógico que indiquen un menor grado de estrés oxidativo en los animales viejos. Como ya se ha apuntado anteriormente, los valores finales de peroxidación *in vitro* dependen de varios factores entre los que se incluyen sistemas generadores de radicales, las distintas cantidades de sustratos peroxidables, principalmente el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, y de antioxidantes liposolubles inicialmente presentes en las muestras. Por esta razón, descensos en el grado de insaturación de los ácidos grasos (Bordoni *et al.*, 1988), que son el sustrato preferido de la peroxidación, acompañados de los correspondientes incrementos de microviscosidad de las membranas hepáticas (Nukobo, 1985) junto con aumentos de antioxidantes liposolubles como el  $\alpha$ -tocoferol, que han sido descritos en tejidos de animales viejos (Vatassery *et al.*, 1984; Rikans y Moore, 1988; Rikans *et al.*, 1991), podrían ser responsables de estos descensos en los niveles de peroxidación *in vitro* con la edad. De acuerdo con esta explicación está el descubrimiento reciente de que la actividad 6-desaturasa disminuye en el hígado, pero no en el cerebro de roedores viejos (Bourre *et al.*, 1990).

Avanzando un poco más en este razonamiento, estos estudios (Vatassery *et al.*, 1984; Rikans *et al.*, 1991) coinciden en señalar cómo la vitamina E se acumula progresivamente en el hígado, pero no en la corteza cerebral de ratas viejas, llegando incluso a duplicarse las concentraciones respecto a las de animales jóvenes. Este dato explicaría el hecho de que la tasa de peroxidación *in vitro* disminuya en el hígado de rata, pero no en la corteza cerebral (Barja de Quiroga *et al.*, 1992; López-Torres *et al.*, 1992). Recientemente se ha descrito en hígado de rata cómo la acumulación de vitamina E en función de la edad no se ve acompañada de reducciones en los niveles de peroxidación

(Rikans *et al.*, 1991). Sin embargo, en este trabajo los resultados son de peroxidación *in vivo*, no de peroxidación *in vitro*. El que los descensos observados se deban al tiempo, más que al envejecimiento en sí, se ve apoyado por el hecho de que en nuestro trabajo, estos descensos se han producido tanto en los animales jóvenes como en los viejos, y además no han existido diferencias entre animales jóvenes y viejos en las comparaciones transversales ninguno de los tres años, ni al principio ni al final del experimento. Parece tratarse de un descenso dependiente del tiempo y de la nutrición, no del envejecimiento, que refleja una distinta composición química entre los tejidos de animales viejos y jóvenes.

Los resultados de nuestro trabajo en *Rana perezii* están por tanto de acuerdo con la tendencia general de ausencia de variaciones en los parámetros relacionados con los radicales libres de oxígeno durante el envejecimiento (Barja de Quiroga *et al.*, 1990b; López-Torres *et al.*, 1990b; Pérez-Campo *et al.*, 1990). En el caso del hombre resulta difícil obtener datos en tejidos. Sin embargo, hay que señalar que la medida de enzimas antioxidantes en fluidos extracelulares o en células sanguíneas muestra también una ausencia de variaciones relacionadas con la edad. En un estudio realizado con 2397 individuos normales de la población española, no se observaron cambios en la actividad SOD de eritrocitos en edades comprendidas entre los 18 y los 65 años (De la Torre *et al.*, 1990). También se ha descrito una ausencia de cambios con la edad en los valores de peroxidación *in vivo* en el plasma de una muestra de más de mil atletas adultos (Müller *et al.*, 1989).

Inciendo un poco más sobre el tema de la generación de radicales de oxígeno, hay que señalar que entre los gerontólogos existe la opinión generalizada de que el envejecimiento se debe a más de una causa. Ya que en condiciones fisiológicas normales en muchos tejidos, las mitocondrias son la principal y más constante fuente de generación de radicales de oxígeno (Chance *et al.*, 1979), parece lógico pensar que a mayor tasa de metabolismo, mayor tasa de generación de radicales por parte de la mitocondria, lo que de hecho se ha comprobado para varias especies de mamíferos (Sohal *et al.*, 1989; Sohal *et al.*, 1990b; Sohal *et al.*, 1990d). Si los radicales libres de oxígeno son sólo reponsables en parte del fenómeno de envejecimiento, podría suceder que fuesen la principal causa en animales con una tasa metabólica elevada, como es el caso de *Musca domestica*, y que tuvieran una

importancia relativa mucho menor en animales con tasas metabólicas moderadas o bajas, como es el caso de *Rana perezi* o del hombre.

Para finalizar este apartado y resumiendo lo expuesto, podemos afirmar que la posibilidad de que el envejecimiento se vea acelerado con la edad debido al descenso de las defensas antioxidantes y que ésto conlleve un aumento del estrés oxidativo en los animales viejos, no parece correcta a la luz de los datos de que disponemos.

En la bibliografía se han utilizado distintos tipos de aproximaciones para dilucidar si la manipulación de antioxidantes celulares puede alterar la longevidad de los animales. Un tipo de acercamiento ha sido el estudio de los efectos de la suplementación con antioxidantes en la dieta. Los resultados en este sentido no han sido demasiado espectaculares, consiguiéndose en algunos casos aumentar la vida media (Harman, 1968; Miquel *et al.*, 1982), pero no la máxima (Balin, 1982; Cutler, 1984). También se ha visto cómo el efecto de los antioxidantes sobre la vida media desaparece cuando el experimento se realiza bajo condiciones óptimas de supervivencia (Kohn, 1971). Los resultados negativos se han atribuido muchas veces a reacciones de compensación entre distintos antioxidantes. Así, la suplementación de la dieta de moscas con ascorbato,  $\beta$ -caroteno o  $\alpha$ -tocoferol no ha variado, o incluso ha reducido la vida media, probablemente debido a descensos compensatorios de actividades SOD, CAT o niveles de GSH (Sohal *et al.*, 1985).

En nuestro trabajo con *Rana perezi* hemos utilizado otro tipo de aproximación. Lo que hemos hecho ha sido manipular los niveles de enzimas antioxidantes a lo largo del ciclo vital de nuestra especie; ésto, según nuestras referencias bibliográficas sólo se ha intentado en otras dos ocasiones y, exclusivamente, en insectos.

El tratamiento con AT, como ya hemos señalado al principio, ha resultado muy efectivo inhibiendo la actividad CAT en todos los tejidos estudiados. No ha ocurrido lo mismo con el DDC, inicialmente utilizado para inhibir la actividad SOD, y que aunque en experimentos previos a tiempos cortos sí había funcionado, a medio plazo no ha dado resultado. Tampoco es posible utilizar dosis más altas de DDC, pues por su toxicidad, provoca una elevada mortalidad a muy corto plazo (Sohal *et al.*, 1984), aspecto comprobado

detalladamente en nuestro laboratorio en pruebas previas con *Rana perezi*. De todo esto se desprende que la inhibición crónica de la actividad SOD mediante DDC es muy difícil de conseguir, debido a su toxicidad y a las recuperaciones de actividad a largo plazo, razón por la cual probablemente no hay casos descritos en mamíferos en la bibliografía. En pulmón de rata se han descrito también rápidas recuperaciones de actividad SOD tras el tratamiento con DDC (Frank *et al.*, 1978). Lo mismo ha ocurrido en el cerebro de ratones, donde la recuperación ha tenido lugar en días en vez de semanas (Heikkila *et al.*, 1976). Estos resultados sugieren que el DDC, sustancia que se sabe atraviesa la barrera hematoencefálica (O'Callaghan y Miller, 1986), es fácilmente eliminado y no resulta útil para la inhibición de esta enzima a largo plazo *in vivo*. El AT, por tanto, parece ser el único inhibidor de una enzima antioxidante que puede ser usado crónicamente con resultados positivos en experimentos de envejecimiento, para inhibir enzimas antioxidantes en tejidos a lo largo del ciclo vital de un animal, como indican trabajos realizados en cerebro de rata (Aragon *et al.*, 1991) y *Musca domestica* (Allen *et al.*, 1983). Los inhibidores del glutatión o de las enzimas antioxidantes GSH-dependientes dan lugar también a toxicidades muy acusadas a las dosis necesarias para lograr las inhibiciones respectivas.

En el pulmón, el tratamiento con AT no dio lugar a ninguna modificación el primer año de medidas, si exceptuamos un incremento del cociente GSSG/GSH en los animales viejos tratados, pero que no llegó a ser significativo. Este incremento pudo ser debido a que la actividad GPx, utilizando cumeno como sustrato, era cuatro veces superior a la actividad GR y esta relación no se vio modificada por el tratamiento. Esta elevación del cociente GSSG/GSH también estaría de acuerdo con el incremento del consumo de oxígeno de ese grupo, el primer año de medidas. A largo plazo, la inhibición de la actividad CAT en el pulmón ha dado lugar a una compensación homeostática mediante la inducción significativa de la actividad GR (90%) después de 14,5 meses de tratamiento y tanto en animales jóvenes como viejos. Esta inducción desaparecerá después de 26,5 meses de tratamiento, al igual que en otros órganos, como comentaremos más adelante. También se observa una tendencia a presentar niveles superiores de GSH, pero que no llega a ser significativa. No existen estudios crónicos sobre el efecto del AT en los parámetros relacionados con los radicales libres del oxígeno, pero sin embargo, se sabe que dosis relativamente bajas de DDC (Frank *et al.*, 1978) o de disulfurinam, que es rápidamente

reducido *in vivo* a DDC (Januszkiewicz *et al.*, 1986), no producen mortalidad en la rata después de 3 y 96 horas respectivamente, a pesar de que la SOD fue parcialmente inhibida. Por otro lado, se ha comprobado que mutantes de *Drosophila melanogaster*, que carecen de actividad CAT, presentan una viabilidad completamente normal (Mackay y Bewley, 1989) sin cambios en su actividad SOD, aunque su resistencia a concentraciones de peróxido de hidrógeno entre el 0,05 y 0,1% se vea disminuida.

En la corteza cerebral de los animales tratados con AT, el descenso de actividad CAT no se ha visto asociado con variaciones en las actividades de la mayoría de enzimas antioxidantes y niveles de GSH, exceptuando un descenso en los animales viejos de la actividad GPx no dependiente tras 2,5 meses de tratamiento y, sobre todo, la potente inducción de actividad GR observada tras 14,5 meses de tratamiento (50-100%) en ambos grupos tratados. Esta inducción parece tener el carácter de una supercompensación, pues va asociada a descensos en la acumulación de lipofuscina y, como veremos más adelante, a una tasa de supervivencia mucho mayor que la de los animales control. Esta relación entre radicales de oxígeno y niveles de acumulación de lipofuscina ya ha sido descrita anteriormente (Miquel *et al.*, 1977; Sohal y Wolfe, 1986; Sohal *et al.*, 1989) y además, se ha visto que la suplementación con antioxidantes como la vitamina E, el GSH o el BHT, reduce su acumulación en células gliales humanas en cultivo (Thaw *et al.*, 1984) y en neuronas de ratones (Constantinides *et al.*, 1986).

Por otro lado, los incrementos de TBA *in vivo* en los animales tratados no se han visto acompañados por una mayor susceptibilidad a la peroxidación. Este hecho, junto con los datos de acumulación de lipofuscina y supervivencia después de 14,5 meses de tratamiento, sugieren que el aumento de este parámetro, sometido a fuertes interferencias, no está relacionado con daño en el tejido. El valor positivo de la inducción de GR se ve apoyado por el hecho de que la pérdida de esta inducción después de 26,5 meses de tratamiento, correlaciona con incrementos en la acumulación de lipofuscina en la corteza cerebral de los animales tratados, así como en la mortalidad. La ausencia en este punto del experimento de un aumento en los valores de peroxidación lipídica de estos animales tratados, sugiere que el factor limitante, de forma parecida a lo que ya ocurría a los 14,5

---

meses, es el daño oxidativo sobre otras dianas celulares como proteínas o DNA, normalmente protegidos por el sistema GR-GSSG/GSH.

Por último, pasamos a comentar los datos en el hígado y riñón de *Rana perezi*, en lo que a efectos del tratamiento se refiere. El hígado ha resultado ser el órgano más sensible al tratamiento con AT y ya, después de transcurridos tan sólo 2,5 meses desde el inicio del experimento, observamos una clara inducción de las actividades enzimáticas SOD (150%) y GR (900%). Estas inducciones, al igual que ha ocurrido también con la GR en el riñón, representan un incremento compensatorio de la capacidad máxima de detoxificación de radicales, sobre todo si tenemos en cuenta que la actividad citocromo c oxidasa no se ve nunca afectada por el tratamiento y se producen en los dos grupos tratados. En el hígado, el tratamiento durante el primer año dio lugar a un incremento del cociente GSSG/GSH en los animales jóvenes, pero no hubo variaciones en los niveles de GSH, GSSG y peroxidación tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta ausencia de cambios en los niveles de peroxidación, parece ser el resultado de las inducciones compensatorias tras el tratamiento a largo plazo, y contrastan con resultados también de nuestro laboratorio en los que después de tratamientos cortos con AT, sí se observaron aumentos en los niveles de peróxidos (López Torres, 1988; Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a). La posibilidad del valor adaptativo de la inducción de GR se ve reforzada por el hecho de que el cociente GPx/GR era mayor de 2 antes del tratamiento y ha descendido hasta 1,5 - 1,3. Esta aproximación entre las tasas máximas de oxidación y reducción de GSH podría resultar adaptativa si la inhibición de la actividad CAT da lugar a un exceso de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, impidiendo de esta forma el peligroso aumento del cociente GSSG/GSH; aunque el aumento de dicho cociente en los animales jóvenes, sugiera que esta compensación mediante la GR no es perfecta.

Se ha demostrado con anterioridad que el tratamiento agudo con AT (60 min.) elimina la actividad CAT en hepatocitos de rata en cultivo, sin variar las actividades GPx y GR o la supervivencia celular después de tres horas (Starke y Farber, 1985). De forma análoga, después de 60 minutos de tratamiento con AT, el 83% de la actividad CAT en corazón de rata perfundido, desapareció, mientras que la actividad GPx no se vio afectada (Thayer, 1986). Tampoco se observaron cambios en los niveles de GSH, GSSG y el cociente

GSSG/GSH en el hígado de rata, 17 horas después de la inyección intramuscular de DDC (Sunderman *et al.*, 1984). Cabe señalar, que en todos estos casos los tiempos de experimentación fueron muy cortos (horas), lo que contrasta con las inducciones observadas por nosotros, tras más de un año de tratamiento continuado.

Tras los resultados del primer año (2,5 meses de tratamiento) en los que sólo se observaron inducciones compensatorias en el caso del hígado y que se correspondían con tasas de supervivencia similares en los grupos controles y tratados, el tratamiento a largo plazo ha dado lugar a una generalización de estas inducciones de actividad GR en todos los órganos después de 14,5 meses de tratamiento, inducciones que en el caso del hígado y del riñón alcanzan alrededor del 1000%. Además, en el hígado se mantiene la inducción de la actividad SOD y también se observan incrementos de los niveles de GSH y ácido ascórbico, con descensos en el cociente GSSG/GSH. En riñón también se observa la inducción de GSH y ácido ascórbico. Es la primera vez que se producen inducciones cuantitativamente tan importantes de cuatro antioxidantes diferentes, de forma simultánea, durante un largo periodo de tiempo y en varios órganos vitales de un vertebrado. Estos animales, además, presentan menor acumulación de lipofuscina y una tasa de supervivencia mucho mayor que la de los controles.

Nuestros resultados muestran claramente cómo un vertebrado puede vivir durante gran parte de su vida careciendo de actividad catalasa en sus tejidos. Esto no significa que la actividad CAT no sea necesaria en condiciones normales. Por el contrario, esta carencia es la responsable de la importante inducción dependiente del tiempo y específica de tejido de SOD, GR, GSH y ácido ascórbico. Estas inducciones explicarían la buena tolerancia de *Rana perezi* a la inhibición por AT a largo plazo. Este tipo de manipulación a lo largo de todo el ciclo vital de una especie sólo se ha llevado a cabo dos veces hasta ahora. Así, la inhibición de la actividad CAT en *Musca domestica* mediante AT dio lugar a inducciones de SOD y GSH (Allen *et al.*, 1983), mientras que en esta misma especie, la inhibición con DDC de actividad SOD provocó un incremento de los niveles de GSH (Sohal *et al.*, 1984). También se ha descrito, después de dos meses de tratamiento con AT 2 mM, un aumento en los niveles de GSH del 20% en el cerebro de rata (Benzi *et al.*,

1990). Por otro lado, en *E. coli*, la diamida, oxidante del GSH, induce las actividades GR, SOD y CAT (Privalle y Fridovich, 1990).

De todos estos estudios se deduce que la compensación homeostática entre diferentes sistemas antioxidantes es un fenómeno general en los sistemas biológicos. En trabajos recientes se ha comprobado que estas inducciones de antioxidantes de tipo compensatorio por un estrés oxidativo, se producen a nivel genético en procariotas (Storz *et al.*, 1990; Tsaneva y Weiss, 1990), *Neurospora crassa* (Munkres, 1990) e incluso, en células humanas (Rushmore *et al.*, 1991). En *E. coli*, el mecanismo incluye un regulón superóxido (*soxR*) que es activado por el radical superóxido (Tsaneva y Weiss, 1990), y un gen *oxyR* y una proteína OXYR que activa la transcripción al ser oxidada por oxidantes, especialmente el  $H_2O_2$  (Storz *et al.*, 1990). De manera similar, el "elemento de respuesta antioxidante" (ARE) de las células de hepatoma humano, también responde a concentraciones de  $H_2O_2$  (Rushmore *et al.*, 1991).

Nosotros no hemos estudiado el mecanismo de inducción de actividad GR en nuestras ranas, pero a la vista de la información bibliográfica disponible, parece razonable pensar que la inhibición de la actividad CAT haya dado lugar a un aumento de la concentración de  $H_2O_2$  y que este aumento sea el responsable de la inducción. A esto hay que unir el que la GPx, enzima alternativa capaz de eliminar el peróxido de hidrógeno, no ha formado parte del grupo de antioxidantes inducidos. Esta ausencia de variaciones en la actividad GPx probablemente esté relacionada con su baja velocidad máxima (y  $K_M$ ), unos tres órdenes de magnitud inferior a la de la CAT. La GPx no eliminaría eficazmente el  $H_2O_2$  si la ausencia de CAT conduce a unas concentraciones de peróxido elevadas en la célula, al menos en los momentos de máxima producción de  $H_2O_2$ .

Esta ausencia de inducción de la actividad GPx por tratamiento con AT, no es la primera vez que se describe. En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (López Torres, 1988; Barja de Quiroga *et al.*, 1989b; López-Torres *et al.*, 1990a) comprobamos cómo, no sólo no se produce una inducción, sino que en muchos casos lo que tiene lugar es un descenso de actividad GPx. Estos descensos pueden ser el resultado de un ataque de especies activas de oxígeno sobre la enzima, secundario a la eliminación de

la actividad CAT por el inhibidor AT. Se ha demostrado que, en mamíferos, el  $H_2O_2$  hace descender la actividad GPx de hígado y riñón (Kihlström *et al.*, 1986) y que el radical superóxido inactiva esta enzima (Blum y Fridovich, 1985). En trabajos previos hemos comprobado que concentraciones de  $H_2O_2$  del orden de 0,25 mM o superiores, *in vitro* inhiben la actividad GPx Se dependiente de anfibios (López-Torres *et al.*, 1988) y lo mismo ocurre con la actividad de eritrocitos humanos (Paglia y Valentine, 1967). Estas concentraciones de  $H_2O_2$  se sabe que son tóxicas para hepatocitos de hígado de rata perfundido (Flohé, 1982) y células humanas y de ratón en cultivo (O'Donnell-Tormey *et al.*, 1987). Además, la ingestión crónica de  $H_2O_2$  en el agua de bebida de ratas adultas ha dado lugar a descensos significativos de la actividad GPx Se dependiente en músculo esquelético, hígado y riñón y de la no Se dependiente en riñón (Kihlström *et al.*, 1986). El hígado de corderos expuestos a un mayor estrés oxidativo por ser alimentados con grandes cantidades de Fe en la dieta, muestra descensos significativos de actividad GPx Se dependiente (Reffett *et al.*, 1986). Con hepatocitos de rata en cultivo se ha visto cómo el tratamiento *in vitro* con AT tampoco provoca modificaciones en la actividad GPx (Starke y Farber, 1985).

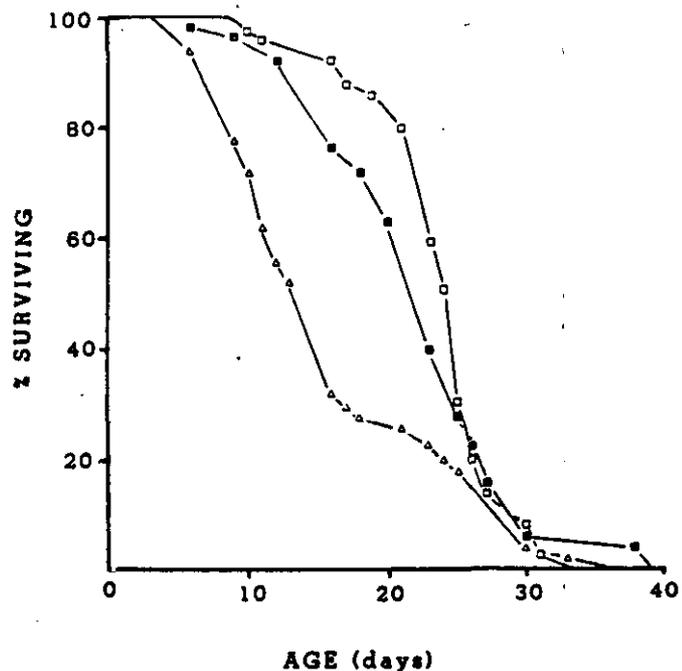
De acuerdo con los conceptos actuales, el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido, a las concentraciones presentes en las células, no tienen reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas biológicas. Sin embargo, en presencia de metales de transición, en lo que se conoce como reacción tipo Fenton catalizada por metales, dan lugar al radical hidroxilo que sí es un iniciador directo del daño peroxidativo. El GSH es capaz de reducir los niveles de radical  $OH^*$  por reacción directa o a través de su interacción con el radical superóxido. En este proceso, el GSH se oxida a GSSG. El glutatión oxidado puede volver a ser reducido por acción de la actividad glutatión reductasa y mantener de esta forma estables, los niveles de GSH y GSSG/GSH en la célula. La inducción generalizada de GR parece indicar que el factor limitante en este modelo de estrés oxidativo es el mantenimiento de cocientes GSSG/GSH bajos. En definitiva, las inducciones observadas de GR, SOD, GSH y ácido ascórbico apuntan hacia el control de los niveles de radical  $OH^*$ , bien directamente, como es el caso del glutatión y el ascorbato, o indirectamente, eliminando radicales superóxido como la enzima SOD o reduciendo el GSSG, acción que realiza la enzima GR, incluso en presencia de elevados niveles de  $H_2O_2$ . La falta de inducción de la GPx estaría también de acuerdo con este razonamiento, pues

contribuiría al mantenimiento de tasas GSSG/GSH bajas. Elevados niveles de  $H_2O_2$  serían tolerados siempre que los niveles de radical  $OH^*$  se mantuviesen bajos, y estos mismos niveles elevados de  $H_2O_2$  serían la señal que desencadenase la inducción a nivel genético.

Como ya hemos indicado anteriormente, los niveles máximos de inducción de antioxidantes se alcanzaron después de 14,5 meses de tratamiento. Los datos de mortalidad nos llevan a considerar estas inducciones como una supercompensación, ya que los animales tratados, tanto jóvenes como viejos, presentan una tasa de supervivencia mucho mayor que los controles durante la mayor parte del experimento. Los animales en los que ha tenido lugar la inducción simultánea de cuatro antioxidantes han mostrado una tasa de supervivencia del 92% durante un largo periodo de tiempo, aproximadamente dos años. Esto ha sido así incluso cuando los animales viejos se estaban aproximando al final de su longevidad máxima y con unos porcentajes de supervivencia de los animales viejos controles de tan sólo un 40%. Las inducciones suponen un balance antioxidante/oxidante mayor en relación a los animales controles, aumentando la resistencia al estrés y a las causas de muertes tempranas. Nuestras conclusiones se ven apoyadas por el hecho de que la pérdida total o parcial de estas inducciones, que se detectó por primera vez después de 25 meses de tratamiento, condujo, a continuación, a una tasa de mortalidad muy alta. Además, en ese momento, los animales tratados mostraron gran acumulación de lipofuscina en la corteza cerebral y fuertes tendencias a presentar valores de GSSG/GSH muy altos. Sin embargo, estos valores no fueron significativos, probablemente debido a que la fase de muertes aceleradas se extendió a lo largo de un periodo de tres meses, durante los cuales se realizaron las medidas bioquímicas. De la curva de supervivencia se deduce que el deterioro fisiológico que conducía a la muerte no se producía a la misma velocidad en todos los animales, lo que da lugar a una elevada variabilidad. El resultado final es que los animales viejos tratados han mostrado una longevidad máxima igual a la de los controles, pero el tratamiento ha reducido considerablemente el número de muertes tempranas, produciéndose una rectangularización de la curva de supervivencia y un incremento de la vida media en ese grupo.

En los dos trabajos previos realizados en *Musca domestica*, que estudian el efecto a largo plazo del AT y del DDC, y ya mencionados anteriormente, no se han

detectado cambios en la longevidad máxima. En el caso del experimento con AT no se produjo ningún tipo de modificación (Allen *et al.*, 1983), mientras que en el del DDC los resultados son totalmente coincidentes con los nuestros (Sohal *et al.*, 1984) y lo que se produjo fue un aumento de la vida media (Ilustración 3), aunque desgraciadamente desconocemos si la inducción de GSH referida en este experimento se perdió al final del ciclo vital (40 días), pues las



Ilustr. 3. De Sohal *et al.*, 1984

medidas fueron realizadas sólo en animales de 9 días. Como se puede ver en el esquema, la forma de la curva de supervivencia del experimento de *Musca domestica* y la del nuestro es extraordinariamente similar; los animales tratados en un caso con DDC y en el otro con AT muestran una curva más rectangular que la de los animales controles. Existe otro experimento, también del grupo de Sohal, en el que se administraron distintas concentraciones de  $H_2O_2$  en el agua de bebida a *Musca domestica*. Únicamente una de las concentraciones utilizadas (10 mM) provocó la inducción de los niveles de GSH y un aumento de longevidad media (Sohal, 1988).

Remontándonos a los experimentos de suplementación de antioxidantes y buscando una explicación para los resultados negativos que se han obtenido en la mayoría de las ocasiones, la respuesta quizá esté en que, en nuestro caso, se ha producido la inducción de cuatro antioxidantes endógenos de forma simultánea; no se trata de dosis puntuales elegidas a gusto del investigador. Se sabe que el efecto de muchos antioxidantes puede ser beneficioso o perjudicial dependiendo de las dosis. La suplementación con un antioxidante concreto puede conllevar el descenso compensatorio de otro antioxidante endógeno no obteniéndose ninguna ventaja.

De todo lo expuesto hasta ahora podemos concluir que, aunque la información de que se dispone actualmente aún es escasa, la manipulación de los niveles de antioxidantes endógenos en el sentido de un aumento de la capacidad antioxidante global, no modifica la longevidad máxima. Pero los datos sugieren al menos que el mantenimiento de un balance antioxidante/prooxidante elevado en los tejidos resulta beneficioso para los individuos, aumentando su resistencia a factores que dan lugar a muertes tempranas y, en definitiva, aumentando la probabilidad de que alcancen la longevidad máxima propia de su especie. Esto significa un aumento de la probabilidad de supervivencia del individuo, o un aumento de la longevidad individual media. Estos resultados están en consonancia con recientes datos epidemiológicos que ponen de manifiesto la correlación entre elevados niveles de antioxidantes en la dieta humana normal (no manipulada) y menor incidencia de las dos principales causas de muertes tempranas en sociedades occidentales, las enfermedades cardiovasculares (Gey, 1990) y el cáncer (Verreault *et al.*, 1989; Buiatti *et al.*, 1990; Comstock, 1991), así como acciones estimuladoras sobre el sistema inmune (Tengerdy, 1989; Meydani *et al.*, 1989; Meydani *et al.*, 1990).

Nuestro trabajo en *Rana perezi* no permite descartar el hecho de que la inducción de antioxidantes endógenos dé lugar a un aumento de la longevidad máxima (MLSP), porque las inducciones, desgraciadamente, se perdieron al final del experimento y no sabemos lo que habría ocurrido en caso de mantenerse. Sin embargo, sí nos permite afirmar que el incremento de antioxidantes endógenos provoca un aumento de la vida media; es la primera vez que este hecho se demuestra en un vertebrado.

## **CONCLUSIONES**

- La supuesta caída de antioxidantes con el envejecimiento, que aceleraría este proceso con la edad, no se produce en *Rana perezi*. Esto nos parece coincidente con un análisis exhaustivo de la bibliografía en los mamíferos. Sin embargo, este hecho no descarta el posible papel de los radicales libres de oxígeno, pues su presencia continua en los tejidos a lo largo del ciclo vital del individuo puede ser responsable del descenso de las funciones vitales.
- Los antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, están sometidos a un fuerte control homeostático a largo plazo en *Rana perezi*, hecho que se describe por primera vez en un vertebrado. Por esta razón, y ante un estrés oxidativo como la inhibición de la enzima antioxidante catalasa, se producen compensaciones y se observan inducciones de otros antioxidantes.
- La catalasa resulta ser una enzima necesaria, aunque su importancia fisiológica haya sido en ocasiones puesta en duda. Mientras su inhibición mediante AT ha sido compensada por las potentes inducciones de otros antioxidantes, la supervivencia de los individuos no se ha visto disminuida. Sin embargo, en el momento en el que estas inducciones han desaparecido total o parcialmente, la mortalidad se ha acelerado.
- No podemos resolver definitivamente si el balance antioxidante/prooxidante de un organismo se relaciona o no con su longevidad máxima, pero sí parece resultar importante para el estado general de salud. Proponemos que un incremento en dicho balance contribuye a aumentar la longevidad media de la población. Esta conclusión es consistente con los datos disponibles en otras especies, incluyendo a mamíferos, sobre los efectos de la suplementación con antioxidantes exógenos en la dieta.

## **BIBLIOGRAFIA**

- AEBI H. (1974). Catalase. En: *Methods in Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U. Ed.). Acad. Press. New York. pp. 673-684.
- ALLEN R.G., FARMER K.J. y SOHAL R.S. (1983). Effect of catalase inactivation on levels of inorganic peroxides, superoxide dismutase, glutathione, oxygen consumption and life span in adult houseflies (*Musca domestica*). *Biochem. J.* **216**: 503-506.
- AMES B.N. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Rad. Res. Comms.* **7**: 121-128.
- AMES B.N. (1991). Oxygen radicals and 8-hydroxyguanine in DNA. *Japanese J. Cancer Res.* **82**: 1.
- AMES B.N., CATHCART R., SCHWIERS E. y HOCHSTEIN P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 6858-6862.
- AMES B.N., HOLLSTEIN M.C. y CATHCART R. (1982). Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA. En: *Lipid Peroxides in Biology and Medicine* (Yagi K. Ed.). Acad. Press. New York. pp. 339.
- ANSARI K.A., KAPLAN E. y SHOEMAN (1989). Age-related changes in lipid peroxidation and protective enzymes in the central nervous system. *Growth Dev. Aging* **53**: 117-121.
- ARAGON C.M.G., ROGAN F. y AMIT Z. (1991). Dose and time-dependent effect of an acute 3-amino-1,2,3-triazole injection on rat brain catalase activity. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 699-702.

- ARAGON C.M.G., SPIVAK K. y AMIT Z. (1985). Blockade of ethanol induced conditioned taste aversion by 3-amino-1,2,4-triazole: evidence for catalase mediated synthesis of acetaldehyde in rat brain. *Life Sci.* 37: 2077-2084.
- ARKING R. y DUDAS S.P. (1989). Review of genetic investigations into the aging processes of *Drosophila*. *JAGS* 37: 757-773.
- ARUOMA O.I., HALLIWELL B., GAJEWSKY E. y DIZDAROGLU M. (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.* 264: 20509-20512.
- ASADA K., TAKAHASHI M., TANAKA K. y NAKANO Y. (1977). Formation of active oxygen and its fate in chloroplasts. En: *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen* (Hayaishi O. y Asada K. Eds.). Univ. Tokyo Press. Tokyo. pp. 45-63.
- AUST S.D. y SVINGEN B.A. (1982). En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W. Ed.). Acad. Press. New York. 5: 1-28.
- BAEYENS D.A., RUSSEL-HOFFERT J. y FROM P.O. (1973). A comparative study of oxygen toxicity in retina, brain and liver of teleosts, amphibian and mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 45: 952.
- BAIRD M.B. y SAMIS H.V. (1971). Regulation of catalase activity in mice of different ages. *Gerontología (Basel)* 17: 105-115.
- BALENTINE J.D. (1982). *Pathology of Oxygen Toxicity* (Harcourt Brace Jovanovich Eds.). Acad. Press. New York. pp. 1-359.
- BALIN A.K. (1982). Testing the free radical theory of aging. En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W.A. Ed.). Acad. Press. New York. Vol. V. pp. 255-275.
- BARASH D.P. (1983). *Aging: an exploration*. University of Washington Press.

- BARJA DE QUIROGA G. (1981). Estudio de la aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente en el desarrollo de *Discoglossus pictus pictus* (Otth). Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- BARJA DE QUIROGA G., GIL P. y ALONSO-BEDATE M. (1984). Effect of assay temperature on the catalase activity in the amphibians. Communication to the First Int. Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Liege (Belgium). August 1984.
- BARJA DE QUIROGA G., GIL P. Y LOPEZ-TORRES M. (1988). Physiological significance of catalase and glutathione peroxidases and *in vivo* peroxidation in selected tissues of the toad *Discoglossus pictus* (Amphibia) during acclimation to normobaric hyperoxia. *J. Comp. Physiol. B.* 158: 583-590.
- BARJA DE QUIROGA G., LOPEZ-TORRES M. Y GIL P. (1989a). Hyperoxia decreases lung size of amphibian tadpoles without changing GSH-peroxidases or tissue peroxidation. *Comp. Biochem. Physiol.* 92A: 581-588.
- BARJA DE QUIROGA G., LOPEZ-TORRES M. y PEREZ-CAMPO R. (1989b). Catalase is needed to avoid tissue peroxidation in *Rana perezi* in normoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 94C: 391-398.
- BARJA DE QUIROGA G., LOPEZ-TORRES M. y PEREZ-CAMPO R. (1992). Relationship between antioxidants, lipid peroxidation and aging. En: Free Radicals and Aging (Emerit I. y Chance B. Eds.). Birkhäuser Verlag. Basel. Switzerland. (en prensa)
- BARJA DE QUIROGA G., LOPEZ-TORRES M., PEREZ-CAMPO R. y ROJAS C. (1991). Simultaneous determination of two antioxidants, uric and ascorbic acid, in animal tissue by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 199: 81-85.

- BARJA DE QUIROGA G., PEREZ-CAMPO R. y LOPEZ-TORRES M. (1990a). Antioxidant defenses and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem. J.* 272: 245-250.
- BARJA DE QUIROGA G., PEREZ-CAMPO R. y LOPEZ-TORRES M. (1990b). Changes on cerebral antioxidant enzymes, peroxidation, and glutathione system of frogs after aging and catalase inhibition. *J. Neurosci. Res.* 26: 370-376.
- BARTHELEMY L., BELAUD A. y CHASTEL C. (1981). A comparative study of oxygen toxicity in vertebrates. *Res. Physiol.* 44: 261-268.
- BEERS R.F. y SIZER I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140.
- BELL J.G., PIRIE B.J.S., ADRON J.W. y COWEY C.B. (1986). Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidase (EC.1.11.1.9.) activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brit. J. Nutr.* 55: 305-311.
- BENON H., BIELSKY J. y GEBÍCKI J.M. (1977). Application of radiation chemistry to biology. En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W. Ed.). Acad. Press. New York. Vol. 3. pp. 1.
- BENZI G., MARZATICO F., PASTORIS O. y VILLA R.F. (1990). Influence of oxidative stress on the age-linked alterations of the cerebral glutathione system. *J. Neurosci. Res.* 26: 120-128.
- BENZI G., PASTORIS O., MARZATICO F. y VILLA R.F. (1988a). Influence of aging and drug treatment on the cerebral glutathione system. *Neurobiol. Aging* 9: 371-375.
- BENZI G., PASTORIS O., MARZATICO F. y VILLA R.F. (1989). Cerebral enzyme antioxidant system. Influence of aging and phosphatidylcholine. *J. Cer. Blood Flow and Metabolism* 9: 373-380.

- BENZI G., PASTORIS O. y VILLA R.F. (1988b). Changes induced by aging and drug treatment on cerebral enzymatic antioxidant system. *Neurochem. Res.* 13: 467-478.
- BERRY S., FITCH J.W. y SCHATTE C.L. (1977). Influence of sex and age on the susceptibility of mice to oxygen poisoning. *Aviat. Space Env. Med.* 48: 37-39.
- BERT P. (1878). Barometric pressure Researches in Experimental Physiology (traducido por Hitchcock M.A. y Hitchcock F.A.). College Book Co. 1943. Columbus, Ohio.
- BIELSKI B.H.J., ARUDI R.L. y SUTHERLAND M.W. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 4759-4761.
- BISHOP J.M. (1978). Adverse effects of oxygen therapy in clinical practice. *Bull. Europ. Physiopathol. Resp.* 14: 130.
- BLUM J. y FRIDOVICH I. (1985). Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 240: 500-507.
- BORDONI A., BIAGI P.L., TURCHETTO E. y HREILA S. (1988). Aging influence of delta-6-desaturase activity and fatty acid composition in rat liver microsomes. *Biochem. Int.* 17: 1001-1009.
- BOURRE J.-M., PICIOTTI M. y DUMONT O. (1990).  $\Delta 6$  Desaturase in brain and liver during development and aging. *Lipids.* 25: 354-356.
- BOVERIS A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. En: *Oxygen and Physiological Function* (Jöbsis F.F. Ed.). Dallas. pp. 67-82.
- BOVERIS A., CADENAS E. y STOPPANI A.O.M. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156: 435-444.

- BOVERIS A. y CHANCE B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
- BOVERIS A., OSHINO N. y CHANCE B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128: 617-630.
- BOZZI A., MAVELLI I., MONDOVI B., STROM R. y ROTILIO G. (1979). Differential sensitivity of tumor cells to externally-generated hydrogen peroxide. Role of glutathione and related enzymes. *Cancer Biochem. Biophys.* 3: 135-141.
- BRAUGHLER J.M., DUNCAN L.A. y CHASE R.L. (1986). The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J. Biol. Chem.* 261: 10282-10289.
- BROWN O.R. y YEIN F. (1978). Dihydroxyacid dehydratase. The site of hyperbaric oxygen poisoning in branched-chain-amino-acid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85: 1219-1221.
- BUCHAN P.B. y SOHAL R.S. (1981). Effect of temperature and different sex ratios on physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp. Geront.* 16: 223-228.
- BUCHER J.R., TIEN M. y AUST S.D. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 777-784.
- BUIATTI E., PALLI D., DECARLI A., AMADORI D., AVELLINI C., BIANCHI S., BONAGURI C., CIPRIANI F., COCCO P., GIACOSA A., MARUBINI E., MINACCI C., PUNTONI R., RUSSO A., VINDIGNI C., FRAUMENI J.F. y BLOT W.J. (1990). A case-control study of gastric cancer and diet in Italy: II. Association with nutrient. *Int. J. Cancer* 45: 896-901.
- BULL A.W. y MARNETT L.J. (1985). Determination of malondialdehyde by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 149: 284-290.

- CADENAS E., BOVERIS A., RAGANI. y STOPPANI A.O.M. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 248-257.
- CAND F. y VERDETTI J. (1989). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 59-63.
- CARRILLO M.C., KITANI K., KANAI S., SATO Y., NOKUBO M., OHTA M. y OTSUBO K. (1989). Differences in the influence of diet on the hepatic glutathione S-transferase activity and glutathione content between young and old C57 black female mice. *Mech. Ageing Dev.* 47: 1-15.
- CASTANET J. (1975). Quelques observations sur la presence et la esturcture des marques squelettiques de croissance chez les Amphibiens. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 100: 603-620.
- CIRIOLO M.R., FISKIN K., DE MARTINO A., CORASANITI M.T., NISTICO G. y ROTILIO G. (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: 287-297.
- CLARK J.M. (1988). Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. *Exp. Lung Res.* 14: 897-910.
- CLARK J.M. y LAMBERTSEN C.J. (1971). Pulmonary oxygen toxicity - a review. *Pharmacol. Rev.* 23: 37-133.
- CLOUD P. (1983). La biosfera. *Investigación y ciencia.* 86: 116-127.

- COMSTOCK G.W., HELZLSOUER K.J. y BUSH T.L. (1991). Prediagnostic serum levels of carotenoids and vitamin E as related to subsequent cancer in Washington country, Maryland. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 63-68.
- CONSTANTINIDES P., HARKEY M. y McLAURY D. (1986). Prevention of lipofuscin development in neurons by anti-oxidants. *Virch. Arch. (Pathol. Anat.)* 409: 583-593.
- COOPER W.J. y ZIKA R.G. (1983). Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science.* 220: 711-712.
- CRAPO J.D. (1986). Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 721-731.
- CRAPO J.D., BARRY B.E., FOUSCUE H.A. y SHELBURNE J. (1980). Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposure to lethal and adaptative doses of oxygen. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122: 123.
- CRAPO J.D. y TIERNEY D.F. (1974). Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.* 226: 1401-1407.
- CRICHTON R.R. (1987). Iron metabolism and oxygen toxicity. *Bioelectrochem. Bioenergetics.* 18: 105-116.
- CUTLER R.G. (1984). Antioxidants aging and longevity. En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W. Ed.). Vol. VI, Chapt. 11. Acad. Press. New York. pp. 371-428.
- CUTLER R.G. (1985). Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4798-4802.
- CUTLER R.G. (1986). Aging and oxygen radicals. En: *Physiology of Oxygen Radicals* (Taylor A.E., Matlon S. y Ward P. Eds.). Am. Physiol. Soc., Bethesda, MD. Clinical Monograph Series. pp. 251-285.

- CUTLER R.G. (1991). Antioxidants and aging. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 373S-379S.
- CHANCE B., SIES H. y BOVERIS A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- CHEVION M. (1988). A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 27-37.
- DANH H.C., BENEDETTI M.S. y DESTERT P. (1983). Differential changes in superoxide dismutase activity in brain and liver of old rats and mice. *J. Neurochem.* 40: 1003-1007.
- DARR D. y FRIDOVICH I. (1985). Inhibition of catalase by 3,3'-diaminobenzidine. *Biochem. J.* 226: 781-787.
- DAVIES K.J.A. (1986). Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an Hypothesis. *J. Free Rad. Biol. Med.* 2: 155-173.
- DAVIES K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- DAVIES K.J.A. y DELSIGNORE M.E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 262: 9908-9913.
- DAVIES K.J.A., DELSIGNORE M.E. y LIN S.W. (1987a). Protein damage and degradation by oxygen radicals II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* 262: 9902-9907.
- DAVIES K.J.A., LIN S.W. y PACIFI R.E. (1987b). Protein damage and degradation by oxygen radicals IV. Degradation of denaturated protein. *J. Biol. Chem.* 262: 9914-9920.

- DE LA TORRE, CASADO A. y LOPEZ-FERNANDEZ M.E. (1990). Superoxide dismutase activity in the Spanish population. *Experientia*. **46**: 854-856.
- DEL MAESTRO R.F. (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.* **492**: 153-168.
- DEL MAESTRO R.F., LOPEZ-TORRES M., McDONALD W., STROUDE E. y VAITHILINGAM I. (1992). The effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on human malignant glial cells. *J. Neurosurgery*. (en prensa).
- DeMASTER E.G., REDFERN B., SHIROTA F.N. y NAGASAWA H.T. (1986). Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 2081-2085.
- DEVASAGAYAM T.P.A. (1986). Senescence-associated decrease of of NADPH-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *FEBS Lett.* **205**: 246-250.
- DEVASAGAYAM T.P.A. (1989). Decreased peroxidative potential in rat brain microsomal fractions during ageing. *Neurosci. Lett.* **103**: 92-96.
- DEVASAGAYAM T.P.A., PUSHPENDRAN C.K. (1986). Changes in ascorbate-induced lipid peroxidation of hepatic rough and smooth microsomes during postnatal development and ageing of rats. *Mech. Ageing Dev.* **34**: 13-21.
- DIPLOCK A.T. (1985). Vitamin E. En: Fat Soluble Vitamins (Diplock A.T. Ed.). Heinemann. London. pp. 154.
- DIZDAROGLU M. y GAJEWSKY E. (1989). Structure and mechanism of hydroxyl radical-induced formation of DNA-protein cross-link involving thymine and lysine in nucleohistone. *Cancer Res.* **49**: 3463-3467.

- DIZDAROGLU M., NACKERDIEN Z., CHAO B-C., GAJEWSKI E. y RAO G. (1991). Chemical nature of *in vivo* DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 388-390.
- DONI M.G., FALANGA A., DELAINI F., VICENZI E., TOMASIAK M. y DONATI M.B. (1984). The effect of vitamin E or selenium on the oxidant-antioxidant balance in rats. *Brit. J. Exp. Pathol.* 65: 75-80.
- DRAPER H.H. y HADLEY M. (1990). A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica.* 20: 901-907.
- EINSELE H., CLEMENS M.R. y REMMER H. (1987). *In vitro* aging of red blood cells and lipid peroxidation. *Arch Toxicol.* 60: 163-166.
- ENESCO H.E., WOLANSKYJ A. y SAWADA M. (1989). Effect of copper on life span and lipid peroxidation in rotifers. *Age.* 12: 19-23.
- ESTERBAUER H., LANG J., ZADRAVEC S. y SLATER F. (1984). Detection of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. En: *Methods in Enzymology: Oxygen Radicals in Biological Systems* (Packer L. Ed.). Acad. Press. London. 105: 319-327.
- FARMER K.J. y SOHAL R.S. (1989). Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 23-29.
- FARR S.B., TOUATI D. y KOGOMA T. (1988). Effects of oxygen stress on membrane function in *Escherichia coli*: role of HPI catalase. *J. Bacteriol.* 170: 1837-1842.
- FEE J.A. (1981). On the question of superoxide toxicity and the biological function of superoxide dismutases. En: *Proceedings of the Third Int. Cong. on Oxidases and Related Redox Systems.* (King T.E., Mason H.S. y Morrison M. Eds.). Acad. Press. New York.

- FEE J.A. (1982). Is superoxide important in oxygen poisoning? *Trends in Biochem. Sci.* 7: 84-86.
- FLOHÉ L. (1982). Glutathione peroxidase brought into focus. En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W. Ed.). Acad. Press. New York. Vol. V, Chapt. 7. pp. 223-253.
- FLOYD R.A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 11: 1447-1450.
- FLOYD R.A., WATSON J.J., WONG P.K., ALTMILLER D.H. y RICKARD R.C. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad. Res. Commun.* 1: 163-172.
- FLOYD R.A., ZALESKA M.M. y HARMON H. (1984). Possible involvement of iron and oxygen free radicals in aspects of aging brain. En: *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease* (Armstrong D. Ed.). Raven Press. New York. pp. 143-161.
- FOOTE C.S., CLOUGH R.L. y YEE B.G. (1978). Photo-oxidation of tocopherols. En: *Tocopherol, Oxygen and Biomembranes* (DeDuve C. y Hayashi O. Eds.). Elsevier. Amsterdam. pp. 13-21.
- FORMAN H.J. y FISHER A.B. (1981). Antioxidant defenses. En: *Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach* (Gilbert D.L. Ed.). Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. pp. 235-249.
- FRACICA P.J., KNAPP M.J. y CRAPO J.D. (1988). Patterns of progression and markers of lung injury in rodents and subhuman primates exposed to hyperoxia. *Exp. Lung Res.* 14: 869-885.
- FRAGA C.G., SHIGENAGA M.K., PARK J-W., DEGAN P. y AMES B.N. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4533-4537.

- 
- FRAGA C.G. y TAPPEL A.L. (1988). Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochem. J.* **252**: 893-896
- FRANK L. (1982). Protection from O<sub>2</sub> toxicity by preexposure to hyperoxia: lung antioxidant enzyme role. *J. Appl. Physiol.: Respir. Environ. Exercise Physiol.* **53**: 475-482.
- FRANK L. y MASSARO D. (1980). Oxygen toxicity. *Am. J. Medicine.* **69**: 117.
- FRANK L., SUMMERVILLE J. y MASSARO D. (1980). Protection from oxygen toxicity with endotoxin. *J. Clin. Invest.* **65**: 1104-1110.
- FRANK L., WOOD D.L. y ROBERTS R.J. (1978). Effect of diethyldithiocarbamate on oxygen toxicity and lung enzyme activity in immature and adult rats. *Biochem. Pharm.* **27**: 251-254.
- FREEMAN B.A., MASON R.J., WILLIAMS M.C. y CRAPO J.D. (1986). Antioxidant enzyme activity in alveolar type II cells after exposure of rats to hyperoxia. *Exp. Lung Res.* **10**: 203-222.
- FRIDOVICH I. (1981). Superoxide radical and superoxide dismutases. En: *Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach* (Gilbert D.L. Ed.). Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. pp. 250-272.
- GABB G. y ROBIN E.D. (1987). Hyperbaric oxygen. A therapy in search of diseases. *Chest.* **92**: 1074-1082.
- GEERTS A. y ROELS F. (1982). *In vivo* cooperation between hepatic catalase and superoxide dismutase demonstrated by diethyldithiocarbamate. *FEBS Lett.* **140**: 245-257.

- GERSCHMAN R., DIEZ O. y ROJO R. (1979). Protective effects of WR-2721 on survival time of mice exposed to high oxygen pressure (Abst. A-31-4). Abst. 6th Int. Cong. Radiat. Res. Tokyo. pp. 108.
- GERSCHMAN R., GILBERT D.L., NYE S.W., DWYER P. y FENN W.O. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*. **119**: 623-626.
- GEY K.F. (1990). Lipids, lipoproteins and antioxidants in cardiovascular dysfunction. *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 1041-1045.
- GIBLIN F.J., SCHRIMSCHER L., CHAKRAPANI B. y REDDY V.N. (1988). Exposure of rabbit lens to hyperbaric oxygen in vitro: regional effects on GSH level. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**: 1312-1319.
- GIL P. y BARJA DE QUIROGA G. (1988). Effect of temperature acclimation on enzymatic activities and thermal sensitivity of catalase, oxygen consumption and concentration of tissue peroxidation products in *Discoglossus pictus* tadpoles. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**: 363-373.
- GILBERT D.L. (1981). Significance of Oxygen on Earth. En: Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach (Gilbert D.L. Ed.). Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. pp. 73-94.
- GORINI A., ARNABOLDI B., GHIGINI B. y VILLA R.F. (1989). Brain cytochrome oxidase activity of non-synaptic mitochondria during aging. *Bas. Appl. Histochem.* **33**: 139-145.
- GRIFFITH O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**: 207-212.
- HALLIWELL B. (1978). The chloroplast at work. A review of recent developments in our understanding of chloroplast metabolism. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* **33**: 1-54.

- HALLIWELL B. (1981). Free radicals, oxygen toxicity and aging. En: Age Pigments (Sohal R.S. Ed.). Elsevier. North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp. 1-62.
- HALLIWELL B. y ARUOMA O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS*. 281: 9-19.
- HALLIWELL B. y GUTTERIDGE J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
- HALLIWELL B. y GUTTERIDGE J.M.C. (1989). Oxygen is poisonous-an introduction to oxygen toxicity and free radicals. En: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. New York. pp. 1-8.
- HARMAN D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
- HARMAN D. (1968). Free radical theory of aging: effects of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF, mice. *J. Gerontol.* 23: 475-482.
- HAUGAARD N. (1968). Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol. Rev.* 48: 311.
- HAZELTON G.A. y LANG C.A. (1980). Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochem J.* 188: 25-30
- HAZELTON G.A. y LANG C.A. (1985). Glutathione peroxidase and reductase activities in the aging mouse. *Mech. Ageing Dev.* 29: 71-81.
- HEIKKILA R.E, CABBAT F.S. y COHEN G. (1976). *In vivo* inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.* 251: 2182-2185.
- HEIKKILA R.E. y COHEN G. (1977). The inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. En: Superoxide and Superoxide

- Dismutases (Michelson A.M., McCord J.M. and Fridovich I. Eds.). Acad. Press. New York. pp. 367-373.
- HERBIG G.H. (1981). The Origin and Astronomical History of Terrestrial Oxygen. En: Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach (Gilbert D.L. Ed.). Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. pp. 65-72.
- HOTHERSALL J.S., EL-HASSAN A., McLEAN P. y GREENBAUM A.L. (1981). Age-related changes in enzymes of rat brain. 2. Redox system linked to NADH and glutathione. *Enzyme* 26: 271-276.
- HUBER G.L. y DRATH D.B. (1981). Pulmonary oxygen toxicity. En: Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach (Gilbert D.L. Ed.). Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. pp. 273-294.
- HUNT J.V., DEAN R.T. y WOLFF S.P. (1988). Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. *Biochem. J.* 256: 205-212.
- IGARASHI T., SATOH T., VENO K. y KITAGAWA H. (1983). Species difference in glutathione level and glutathione related enzyme activities in rats, mice, guinea pigs and hamsters. *J. Pharmacobio-Dynam.* 6: 941-949.
- ISCHIROPOULOS H., NADZIEJKO C.E. y YUTAKA K. (1990). Effect of aging on pulmonary superoxide dismutase. *Mech. Ageing Dev.* 52: 11-26.
- ISMAIL G., SAWYER W.D. y WEGENER W.S. (1977). Effects of hydrogen peroxide and superoxide radical on the viability of *Neisseria gonorrhoeae* and related bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 155: 264-269.
- JACKSON R.M. (1985). Pulmonary oxygen toxicity. *Chest.* 88: 900-905.
- JAMIESON D. (1989). Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 87-108.

- JAMIESON D., CHANCE B., CADENAS E. y BOVERIS A. (1986). The relation of free radical production to hyperoxia. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 703-719.
- JANERO D.R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 515-540.
- JANUSZKIEWICZ A.J., HUNTRAKOON M., WILSON P.K. y FAIMAN M.D. (1986). Isolated perfused lung histamine release, lipid peroxidation, and tissue superoxide dismutase from rats exposed to normobaric hyperoxia. *Toxicology* 39: 37-46.
- JENKINSON S.G., JORDAN J.M. y DUNCAN C.A. (1989). Effects of Selenium deficiency on glutathione-induced protection from hyperbaric hyperoxia in rat. *Am. J. Physiol.* 257 (Lung Cell. Mol. Physiol. 1): L393-L398.
- JENKINSON S.G., LAWRENCE R.A., GRAFTON W.D., GREGORY P.E. y McKINNEY M.A. (1984). Enhanced pulmonary toxicity in copper-deficient rats exposed to hyperoxia. *Fund. and Appl. Toxicol.* 4: 170-177.
- JI L.L., DILLON D. y WU E. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 258 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 27): R918-R923.
- JONES G.L. y NEILL A.R. (1982). The effects of clofibrate and 3-amino-1,2,4-triazole on liver catalase and lipid metabolism in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 712: 420-426.
- KALRA J., LAUTNER D., MASSEY K.L. y PRASAD K. (1988). Oxygen free radicals induced release of lysosomal enzymes *in vitro*. *Mol. Cell. Biochem.* 84: 233-238.

- KANEKO M., BEAMISH R.E. y DHALLA N.S. (1989). Depression of heart sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$ -pump activity by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* **256** (*Heart Circ. Physiol.* **25**): H368-H374.
- KAPPUS H. (1985). Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. En: *Oxidative Stress* (Sies H. Ed.). Acad. Press. London. pp. 273-310.
- KARLSSON K. y MARKLUND S.L. (1988). Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem. J.* **255**: 223-228.
- KASAI H. y NISHIMURA S. (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* **12**: 2138-2145.
- KELLOG E.W. III y FRIDOVICH I. (1976). Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. *J. Gerontol.* **31**: 405-408.
- KETTERER B. y MEYER D.J. (1989). Glutathione transferases: a possible role in the detoxification and repair of DNA and lipid hydroperoxides. *Mutat. Res.* **214**: 33-40.
- KIHLSTRÖM M., SALMINEN A. y VINKO V. (1986). Chronic hydrogen peroxide intake and peroxide metabolizing enzyme activities in some tissues in mice and rats. *Experientia* **42**: 1018-1020.
- KIRKWOOD T.B.L. (1984). Towards a unified theory of cellular ageing. *Monogr. Devl. Biol.* **17**: 9-20.
- KOBAYASHI S. y ANDO W. (1979). Co-oxidation of diphenylisobenzofuran by Haber-Weiss reaction. Is singlet oxygen concerned in this oxidation? *Biochim. Biophys. Commun.* **88**: 676.
- KOHN R.R. (1971). Effect of antioxidants on life-span of C57BL mice. *J. Gerontol.* **26**: 378-380.

- KOIZUMI A., WEINDRUCH R. y WALFORD R.L. (1987). Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J. Nutr.* 117: 361-367.
- KOPPENOL W.H. (1981). On the reactivity of the superoxide anion and the biological function of superoxide dismutase. En: Proceedings of The Third Int. Symposium on Oxidases and Related Redox Systems (King T.E., Mason H.S. y Morrison M. Eds.). Acad. Press. New York.
- KUROBE N., SUZUKI F., KATO K. y SATO T. (1990). Sensitive immunoassay of rat Cu/Zn superoxide dismutase: concentrations in the brain, liver and kidney are not affected by aging. *Biomed. Res.* 11: 187-194.
- LAGANIERE S. y YU B.P. (1989). Effect of chronic food restriction in aging rats II. Liver cytosolic antioxidant and related enzymes. *Mech. Ageing Dev.* 48: 221-230.
- LAMBERTSEN C.J. (1988). Extension of oxygen tolerance in man: philosophy and significance. *Exp. Lung Res.* 14: 1035-1058.
- LAMMI-KEEFE C.J., SWAN P.B. y HEGARTY P.V.J. (1984). Copper-zinc and manganese superoxide dismutase activities in cardiac and skeletal muscle during aging in male rats. *Gerontology* 30: 153-158.
- LAWRENCE R.A. y BURK R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958.
- LeBEL C.P. y BONDY S.C. (1991). Persistent protein damage despite reduced oxygen radical formation in the aging rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 9: 139-146.
- LEVITSKY E.L., GUBSKY Y.I., GOLDSTEIN N.B. y LITOSHENKO A.Y. (1989). Lipid peroxidation and polymerase activities of chromatin fractions of the rat liver in aging. *Bull. Exp. Biol. Med.* 6: 693-694.

- LINK E.M. y RILEY P. (1988). Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/xanthine oxidase system. *Biochem. J.* 249: 391-399.
- LOPEZ TORRES M. (1988). Efecto del aminotriazol sobre las actividades catalasa y glutatión peroxidadas y la peroxidación tisular en cuatro órganos de *Rana perezi* en condiciones de normoxia e hiperoxia. Memoria de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- LOPEZ-TORRES M., GIL P. y BARJA DE QUIROGA G. (1988). Effect of hyperoxia acclimation on catalase and glutathione peroxidase activities and in vivo peroxidation products in various tissues of the frog *Rana ridibunda perezi*. *J. Exp. Zool.* 248: 7-18.
- LOPEZ-TORRES M., PEREZ-CAMPO R. y BARJA DE QUIROGA G. (1990a). Aminotriazole effects on lung and heart H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes and TBARS at two pO<sub>2</sub>. *Pharmacol. Toxicol.* 66: 27-31.
- LOPEZ-TORRES M., PEREZ-CAMPO R. y BARJA DE QUIROGA G. (1990b). Effect of natural ageing and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, and peroxidation, and oxygen consumption, in *Rana Perezi*. *J. Comp. Physiol. B* 160: 655-661.
- LOPEZ-TORRES M., PEREZ-CAMPO R., ROJAS C. y BARJA DE QUIROGA G. (1992). Sensitivity to *in vitro* lipid peroxidation is not increased in the liver and brain of aged rats. *Rev. Esp. Fisiol.* (en prensa).
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LÜCK H. (1965). Catalase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U. Ed.). Verlag Chemie. Weinheim-Bergstrasse. Germany. pp. 885-894.

- LYMAN C.P., O'BRIAN R.C., GREENE G.C. y PAPAFRANGOS E.D. (1981). Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science* 212: 668-670.
- MACKAY W.J. y BEWLEY G.C. (1989). The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: Isolation and characterization of acatalasemic mutants. *Genetics* 122: 643-652.
- MARCILLAT O., ZHANG Y., LIN S.W. y DAVIES K.J.A. (1988). Mitochondria contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins. *Biochem. J.* 254: 677-683.
- MARIUCCI G., AMBROSINI M.V., COLARIETI L. y BRUSCHELI G. (1990). Differential changes in Cu, Zn and Mn superoxide dismutase activity in developing rat brain and liver. *Experientia* 46: 753-755.
- MARKLUND S.L. (1988). Role of toxic effects of oxygen in reperfusion damage. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20: 23-30.
- MARTIN G.M. (1985). Current views on the biology of aging. En: *The Aging Process: Therapeutic Implications* (Butler R.N. y Bearn A.G. Eds.). Raven Press. New York. pp. 21-39.
- MASORO E.J. (1988). Retardation of the aging processes by food restriction: a search for mechanisms. *ISI Atlas of Sci: Biochem.* 1: 329-332.
- MASORO E.J., SHIMOKAWA I. y YU B.P. (1991). Retardation of the aging process in rats by food restriction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 621: 337-352.
- MASOTTI L., CASALI E. y GALEOTTI T. (1988). Lipid peroxidation in tumor cells. *Free Rad. Biol. Med.* 6: 377-386.

- MASSEY V. y WILLIAMS C.H. (1965). On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* 240: 4470-4481.
- MATKOVICS B. (1977). Superoxide Dismutases (Michelson A.M., McCord J.M. y Fridovich I. Eds.). Acad. Press. New York. pp. 50.
- McCARTER R., MASORO E.J. y YU B.P. (1985). Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *Am. J. Physiol.* 248 (Endocrinol. Metab. 11): E488-E490.
- McCAY C.M., MAYNARD L.A., SPERLING G. y BARNES L.L. (1943). Retarded growth, life span, ultimate body size and age changing in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *J. Nutr.* 18: 1-13.
- McCORD J.M. (1974). Free radicals and inflammation. Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529.
- McCORD J.M. y FRIDOVICH I. (1969). Superoxide dimutase: an enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- MEDVEDEV Z.A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev.* 65: 375-398.
- MEYDANI S.N., BARKLUND M.P., LIU S., MEYDANI M., CANNON J.G., MORROW F.D., ROCKLING R. y BLUMBERG J.B. (1990). Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 557-563.
- MEYDANI S.N., MEYDANI M., BARKLUND M.P., LIU S., MILLER R.A., CANNON R.A., ROCKLING R. y BLUMBERG J.B. (1989). Effect of vitamin E supplementation on immune responsiveness of the aged. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570: 283-290.

- MICKEL H.S. (1990). Hyperoxia during reperfusion is a factor in reperfusion injury. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 269.
- MICHAELIS L. (1940). Occurrence and significance of semiquinone radicals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 40: 39.
- MINOTTI G. y AUST S.D. (1987a). An investigation into the mechanism of citrate-Fe<sup>2+</sup>-dependent lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* 3: 379-387.
- MINOTTI G. y AUST S.D. (1987b). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44: 191-208.
- MIQUEL J. (1991). An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12: 99-117.
- MIQUEL J. y FLEMING J. (1984). A two-step hypothesis on the mechanism of *in vitro* cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis. *Exp. Gerontol.* 19: 31-36.
- MIQUEL J., FLEMING J.E. y ECONOMOS A.C. (1982). Antioxidants, mitochondrial respiration and aging in *Drosophila*. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1: 349-363.
- MIQUEL J., LUNDGREN P.R., BENSCH K.G. y ATLAN H. (1976). Effect of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 5: 347-370.
- MIQUEL J., ORO J., BENSCH K.G. y JOHNSON J.E., Jr. (1977). Lipofuscin: fine structural and biochemical studies. En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W. Ed.). Acad. Press. New York. pp. 133-182.
- MIYAZAWA T., FUJIMOTO K. y KANEDA T. (1988). Lipid peroxidation and chemiluminescence in animal tissues. En: *Lipid Peroxidation in Biological*

Systems (Sevanian A. Ed.). American Oil Chemists Soc., Monograph, Chapt. 1. pp. 1-17.

MIYAZAWA T., SUZUKI T., FUJIMOTO K. y KANEDA T. (1990). Phospholipid hydroperoxide accumulation in liver of rats intoxicated with carbon tetrachloride and its inhibition by dietary  $\alpha$ -tocopherol. *J. Biochem.* 107: 689-693.

MIZUNO Y. y OHTA K. (1986). Regional distributions of thiobarbituric acid-reactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adult and aged rat brains. *J. Neurochem.* 46: 1344-1352.

MONBOISSE J-C, GARDÉS-ALBET M., RANDOUX A., BOREL J-P y FERRADINI C. (1988). Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 965: 29-35.

MOPPER K. y ZHOU X. (1990). Hydroxyl radical photoproduction in the sea and its potential impact on marine processes. *Science* 250: 661-664.

MÜLLER D., KRETZSCHMAR M., MARIN E. y HÜBSCHER J. (1989). Influence of training and acute physical exercise on glutathione and lipid peroxides in plasma. En: "Proceedings of the IUBS-XVII. XXXI International Congress of Physiological Sciences". Symposium S3086. Helsinki, Finland. p. 244.

MUNKRES K.D. (1990). Genetic, developmental, and thermal regulation of antioxidant enzymes in *Neurospora*. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 23-28.

MUSCARI C., FRASCARO M., GUARNERI C. y CALDARERA C.M. (1990). Mitochondrial function and superoxide generation from submitochondrial particles of aged rat hearts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1015: 200-204.

- NIKI E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* **44**: 227-253.
- NOHL H. (1986). Oxygen radical release in mitochondria: influence of age. En: Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases (Jonhson J.E., Walford R., Harman D. and Miquel J. Eds.). Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 77-97.
- NOHL H. y HEGNER D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals *in vivo*? *Eur. J. Biochem.* **82**: 563-567.
- NUKOBO M. (1985). Physical-chemical and biochemical differences in liver plasma membranes in aging F-344 rats. *J. Gerontol.* **40**: 409-414.
- O'CALLAGHAN J.P. y MILLER D.B. (1986). Diethyldithiocarbamate increases distribution of cadmium to brain but prevents cadmium-induced neurotoxicity. *Brain Res.* **370**: 354-358.
- O'DONELL-TORMEY J., NATHAN C.F., LANKS K., DEBOER C.J. y HARPE J. (1987). Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J. Exp. Med.* **165**: 500-514.
- ORGEL L.E. (1963). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **49**: 517-521.
- OSHINO N., JAMIESON D., SUGAO T. y CHANCE B. (1975). Optical measurement of the catalase-hydrogen peroxide intermediate (compound I) in the liver of anaesthetized rats and its implication to hydrogen peroxide production *in situ*. *Biochem. J.* **146**: 67-77.
- OZAKI M., KAWABATA T. y AWAI M. (1988). Iron reikase from haemosiderin and production of iron-catalysed hydroxyl radicals *in vitro*. *Biochem. J.* **250**: 589-595.

- PEREZ R., LOPEZ M. y BARJA DE QUIROGA G. (1991). Ageing and lung antioxidant enzymes, glutathione, and lipid peroxidation in the rat. *Free Rad. Biol. Med.* 10: 35-39.
- PIKUL J., LESZCZYNSKI D.E. y KUMMEROV F.A. (1983). Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* 31: 1338-1342.
- PLAYER T.J., MILLS D.J. y HORTON A.A. (1977). Age-dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 1397-1402.
- PRIESTLEY J. (1775). Experiments and observations on different kinds of air. Vol. II, Sections III-V, pp.29-103. En: Priestley J. The Discovery of Oxygen. Part I. Edinburgh: The Alembic Club, 1923 (Faulconer A. and Keys T.C., Eds.). Foundations of Anesthesiology. Vol. 1. Springfield, Illinois. Charles C. Thomas, 1965. pp. 39-70.
- PRIVALLE C.T. y FRIDOVICH I. (1990). Biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. anaerobic induction of active MnSOD by diamide. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 2.
- PRYOR W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 657-667.
- PRYOR W.A. (1988). Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radical Biol. Med.* 4: 219-223.
- PUPPO A. y HALLIWELL B. (1988). Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.* 249: 185-190.

- RAO G., XIA E., NADAKAVUKAREN M.J. y RICHARDSON A. (1990b). Effect of dietary restriction on the aged-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J. Nutr.* 120: 602-609.
- RAO G., XIA E. y RICHARDSON A. (1990a). Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech. Ageing Dev.* 53: 49-60.
- REFFET J.K., SPEARS J.W. y PROBOWO A. (1986). Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase in lambs fed high dietary iron. *Nutr. Rep. Int.* 34: 977-984.
- REISS U. y GERSHON D. (1976). Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase in liver, heart and brain of aging rats and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73: 255-262.
- REITZE H.K. y SEITZ K.A. (1985). Light and electron microscopical changes in the liver of mice following treatment with aminotriazole. *Exp. Pathol.* 27: 17-31.
- RICHIE J.P. y LANG C.A. (1988). A decrease in cysteine levels causes the glutathione deficiency of aging in the mosquito. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187: 235-240.
- RICHTER C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids.* 44: 175-189.
- RIKANS L.E., MOORE D.R. y SNOWDEN C.D. (1991). Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1074: 195-200.
- RIKANS L.E. y MOORE R. (1988). Effect of aging on aqueous phase antioxidants in tissues of male Fisher rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 966: 269-275.
- ROELS F. y GEERTS A. (1982). Cytoplasmic catalase: Cytochemistry and Physiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 386: 534-536.

- ROSS M.H. (1969). Aging, nutrition and hepatic enzyme activity pattern in the rat. *J. Nutr.* 97: 563-602.
- RUBIN R. y FARBER J.L. (1984). Mechanisms of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 2: 450-459.
- RUBNER M. (1908). Das Problem des Lebensdauer. Oldenbourg, Munich. Berlin.
- RUSHMORE T.H., MORTON M.R. y PICKETT C.B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266: 11632-11639.
- SANDALIO L.M., FERNANDEZ V.M., RUPEREZ F.L. y DEL RIO L.A. (1988). Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol.* 87: 1-4.
- SARAN M. y BORS W. (1990). Radical reactions *in vivo* - an overview. *Radiat. Environ. Biophys.* 29: 249-262.
- SAUL R.L., GEE P. y AMES B.N. (1987). Free radicals, DNA damage, and aging. En: *Modern Biological Theories of Aging* (Warner H.L. *et al.* eds.). Raven Press. New York. pp. 113-129.
- SAWADA M. y CARLSON J.C. (1987). Changes in superoxide radical and lipid superoxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech. Ageing Dev.* 41: 125-137.
- SCOTT B. y LEW J. (1988). Effect of chronic hydrogen peroxide exposure on neuronal electric membrane properties. *Neurotoxicology.* 9: 189-196.
- SCHEELE C.W. (1777). *Chemische Abhandlung von der Luft und dem feuer*. Uppsala and Leipzig. Section 2. Chemical treatise on Air and Fire. En: *The Collected Papers of Carl Wilhem Scheele*. Kraus Reprint Co. 1971. pp. 85-178.

- SCHUCKELT R., BRIGELIUS-FLOHÉ, MAIORINO A.R., REUMKENS J., STRASSBURGER W., URSINI F., WOLF B. y FLOHÉ L. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a seleno-enzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequence. *Free Rad. Res. Comms.* 14: 343-361.
- SEMSEI I., RAO G. y RICHARDSON A. (1989). Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a function of age and dietary restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 620-625.
- SEMSEI I., RAO G. y RICHARDSON A. (1991). Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech. Ageing Dev.* 58: 13-19.
- SEVANIAN A. y HOCHSTEIN P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* 5: 365-390.
- SIES H., BARTOLI G.M., BURK R.F. Y WAYDHAS C. (1978). Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment during drug oxidations, and in selenium deficiency. *Eur. J. Biochem.* 89: 113-118.
- SIES H. y CADENAS E. (1983). Biological basis of detoxication of oxygen free radicals. En: *Biological Basis of Detoxication* (Caldwell J. y Iakoby W.B. Eds.). Acad. Press. San Diego. pp. 181.
- SMIRINA E. (1972). Annual layers in bones of *Rana temporaria*. *Zool. Zh.* 51: 1529-1534.
- SMITH L. (1955). Spectrophotometric assays of cytochrome c oxidase. En: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 2 (Gick D. Ed.). Wiley-Interscience. New York. pp. 427-434.
- SMITH J. y SHRIFT A. (1979). Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 39.

- SOHAL R.S. (1986). Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 2: 117-160.
- SOHAL R.S. (1988). Effect of hydrogen peroxide administration on life span, superoxide dimutase, catalase and glutathione in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 23: 211-216.
- SOHAL R.S. (1991). Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. *Mech. Ageing. Dev.* 60: 189-198.
- SOHAL R.S. y ALLEN R.G. (1986). Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv. in Free Rad. Biol. Med.* 2: 117-160.
- SOHAL R.S., ARNOLD L.A. y ORR W.C. (1990a). Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive matherial, GSH/GSSG, NADPH/NADP<sup>+</sup> and NADH/NAD<sup>+</sup> in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 56: 223-235.
- SOHAL R.S., ARNOLD L.A. y SOHAL B.H. (1990b). Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 495-500.
- SOHAL R.S. y BUCHAN P.B. (1981). Relationship between physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 16: 157-162.
- SOHAL R.S. y DONATO H. (1979). Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly *Musca domestica*. *J. Gerontol.* 34: 489-496.
- SOHAL R.S., FARMER K.J., ALLEN R.G. y COHEN N.R. (1983). Effect of age on oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides and chloroform-soluble antioxidant in the adult male housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* 24: 185-195.

- PACIFI R.E., SALON D.C. y DAVIES K.J.A. (1989). Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 521-536.
- PACIFICI R.E. y DAVIES K.J.A. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 37: 166-180.
- PADGAONKAR V., GIBLIN F.J. y REDDY V.N. (1989). Disulfide cross-linking of urea-insoluble proteins in rabbit lenses treated with hyperbaric oxygen. *Exp. Eye Res.* 49: 887-899.
- PAGLIA D.E. y VALENTINE W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- PAOLETTI F., ALDINUCCI D., MOCALI A. y CAPARRINI A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154: 536-541.
- PAOLETTI F., MOCALI A. y ALDINUCCI D. (1990). Superoxide-driven NAD(P)H oxidation induced by EDTA-Manganese complex and mercaptoethanol. *Chem. Biol. Interactions.* 76: 3-18.
- PAPAFRANGOS E.D. y LYMAN C.P. (1982). Lipofuscin accumulation and hibernation in Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *J. Geront.* 37: 417-421.
- PATON D., JUARRANZ A., SEQUEROS E., PEREZ-CAMPO R., LOPEZ-TORRES M. y BARJA DE QUIROGA G. (1991). Seasonal age and sex structure of *Rana perezi* assessed by skeletochronology. *J. Herpetol.* 25: 389-394.

- SOHAL R.S., FARMER K.J., ALLEN R.G. y RAGLAND S.S. (1984). Effects of diethyldithiocarbamate on life span, metabolic rate, superoxide dismutase, catalase, inorganic peroxides and glutathione in the adult male housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* 24: 175-183.
- SOHAL R.S., MÜLLER A., KOLETZKO B. y SIES H. (1985). Effect of age and ambient temperature on n-pentane production in adult housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* 29: 317-326.
- SOHAL R.S. y SOHAL B.H. (1991). Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech. Ageing Dev.* 57: 187-202.
- SOHAL R.S., SOHAL B.H. y BRUNK U.T. (1990c). Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech. Ageing Dev.* 53: 217-227.
- SOHAL R.S., SVENSSON I. y BRUNK U.T. (1990d). Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. *Mech. Ageing Dev.* 53: 209-215.
- SOHAL R.S., SVENSSON I., SOHAL B.H. y BRUNK U.T. (1989). Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech. Ageing Dev.* 49: 129-135.
- SOHAL R.S., TOY P.L. y ALLEN R.G. (1986). Relationship between life expectancy, endogenous antioxidants and products of oxygen radical reactions in the housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* 36: 71-77.
- SOHAL R.S. y WOLFE L.S. (1986). Lipofuscin: characteristics and significance. En: *Progress in Brain Research* (Swaab D.F., Fliers E., Mirmirian M., Van Gool W.A. y Van Haaren F. Eds.). Elsevier. Amsterdam. Vol. 70. pp. 171-183.
- SOKAL R. y ROHLF J. (1981). *Biometry* 2ª ed., Freeman W.H., San Francisco.

- SOSENKO I.R.S., INNIS S.M. y FRANK L. (1988). Polyunsaturated fatty acids and protection of newborn rats from oxygen toxicity. *J. Pediatrics*. **112**: 630-637.
- SOUTHORN P.A. y POWIS G. (1988). Free radicals in Medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.* **63**: 381-389.
- SPITZ D.R. y OBERLEY L.W. (1989). An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.* **179**: 8-18.
- STADIE W.C. y HAUGAARD N. (1945). Oxygen poisoning. V. The effect of high oxygen pressure upon enzymes: succinic dehydrogenase and cytochrome oxydase. *J. Biol. Chem.* **161**: 175-180.
- STADTMAN E.R. (1988). Biochemical markers of aging. *Exp. Gerontol.* **23**: 327-347.
- STADTMAN E.R. (1991). Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 1125S-1128S.
- STARKE P.E. y FARBER J.L. (1985). Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**: 86-92.
- STARKE-REED P.E. y OLIVER C.N. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 559-567.
- STEINBRECHER U.P., ZHANG H. y LOUGHEED M. (1990). Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* **9**: 155-168.
- STEINHOFF D., WEBER H., MOHR U. y BOEHME K. (1983). Evaluation of amitrole (Aminotriazole) for potential carcinogenety in orally dosed rats, mice and golden hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **69**: 161-169.
- STEVENS J.B. y AUTOR A.P. (1980). Proposed mechanism of neonatal rat tolerance to normobaric hyperoxia. *Fed. Proc.* **39**: 3138-3143.

- STOCK M.K., SILVERNAIL K.K. y METCALFE J. (1990). Prenatal oxidative stress: I. malondialdehyde in hypoxic and hyperoxic chick embryos. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 313-318.
- STOHS S.J. y LAWSON T. (1986). The role of glutathione and its metabolism in aging. En: Liver and brain (Kitani K. Ed.). Elsevier. Amsterdam. pp. 59-70.
- STONE W.L., HENDERSON R.A., HOWARD G.H., HOLLIS A.L., PAINE P.H. y SCOTT R.L. (1989). The role of antioxidant nutrients in preventing hyperbaric oxygen damage to the retina. *Free Rad. Biol. Med.* 6: 505-512.
- STORZ G., TARTAGLIA L.A. y AMES B.N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248: 189-194.
- SUGIOKA K., SHIMOSEGAWA Y. y NAKANO M. (1987). Estrogens as natural antioxidant of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett.* 210: 37-39.
- SUNDERMAN F.W., ZAHARIA O., REIT M.C., BELLIBEAU J.F., O'LEARY G.P. y GRIFFIN H. (1984). Effects of diethyldithiocarbamate and nickel chloride on glutathione and trace metal concentration in rat liver. *Toxicology* 32: 11-21.
- TAKAHASHI K., NEWBURGER P.E. y COHEN H.J. (1986). Glutathione peroxidase protein. Absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity. *J. Clin. Invest.* 77: 1402-1404.
- TAYARAMI I., CLOEZ I., CLEMENT M. y BOURRE J.M. (1989). Antioxidant enzymes and related trace elements in aging brain capillaries and choroid plexus. *J. Neurochem.* 53: 817-824.
- TAYLOR A. y DAVIES K.J.A. (1987). Protein oxidation and loss of protease activity may lead to cataract formation in the aged lens. *Free Rad. Biol. Med.* 3: 371-377.

- TAYLOR A.E. Y RIPPE B. (1986). Pulmonary Edema. En: Physiology and Membrane Disorders. Chapter 56 (Andreoli T.E., Hoffman J.F., Fanestil D.D. y Schultz S.G. Eds.). Plenum Publishing Corporation. pp. 1025-1039.
- TENGERDY R.P. (1989). Vitamin E immune response and disease resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570: 335-344.
- TERRY T.L. (1942). Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. *Am. J. Ophthalmol.* 25: 203-208.
- THAW H.H., BRUNK U.T. y COLLINS P.V. (1984). Influence of oxygen tension, prooxidants and antioxidants on the formation of lipid peroxidation products (lipofuscin) in individual cultivated human glial cells. *Mech. Ageing Dev.* 24: 211-223.
- THAYER W.S. (1986). Role of catalase in metabolism of hydrogen peroxide by the perfused rat heart. *FEBS Lett.* 202: 137-140.
- THIBEAULT D.W., MABRY S. y REZAIKHALIGH M. (1990). Neonatal pulmonary oxygen toxicity in the rat and lung changes with aging. *Ped. Pulm.* 9: 96-108.
- TIETZE F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- TIRMENSTEIN M. y REED D. (1989). Effects of glutathione on  $\alpha$ -tocopherol-dependent inhibition of nuclear lipid peroxidation. *J. Lipid Research.* 30: 959-965.
- TJIOE G. y HAUGAARD N. (1972). Oxygen inhibition of crystalline glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and disappearance of enzyme sulphhydryl groups. *Life Sci.* 11: 329.

- TOLMASOFF J.M., ONO T., TETSUYA O. y CUTLER R.G. (1980). Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2777-2781.
- TROMBETTA L.D., TOULON M. y JAMALL I.S. (1988). Protective effects of glutathione on diethylthiocarbamate (DDC) cytotoxicity: a possible mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93: 154-164.
- TSANEVA I.R. y WEISS B. (1990). soxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172: 4197-4205.
- TUNNER H.G. y UZZELL T. (1974). Das seroalbumin bei *Rana ridibunda perezii* (*Salientia, Ranidae*). *Salamandra*. 10:137-139.
- TUNNICLIFF G. y WOOD J.D. (1974). Influence of hyperbaric oxygen upon transmitter enzymes of chick brain. *Int. J. Biochem.* 5: 555-559.
- TURRENS J., FREEMAN B.A. y CRAPO J.D. (1982). Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 411-421.
- TURRENS J.F., ALEXANDRE A. y LEHNINGER A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237: 408-414.
- TURRENS J.F., CRAPO J.D. y FREEMAN B.A. (1984). Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 73: 87-95.
- UCHIYAMA M. y MIHARA M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 86: 271-278.
- UZZELL T. (1982). Immunological relationship of western palearctic water frogs (*Salientia, Ranidae*). *Amphibia-Reptilia*. 3: 135-143.

- VACA C.E. y HARMS-RINGDAHL M. (1989). Interaction of lipid peroxidation products with nuclear macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta.* 1001: 35-43.
- VAN BOEKEL M.A.M. (1991). The role of glycation in aging and diabetes *mellitus*. *Mol. Biol. Reports.* 15: 57-64.
- VAN KUIJK F.J.G.M., SEVANIAN A., HANDELMAN G.J. y DRATZ E.A. (1987). A new role for phospholipase A<sup>2</sup>: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends Biochem. Sciences.* 12: 31-34.
- VANELLA A., VILLA R.F., GORINI A., CAMPISI A. y GIUFFRIDA-STELLA A.M. (1989). Superoxide dismutase and cytochrome oxidase activities in light and heavy synaptic mitochondria from rat cerebral cortex during aging. *J. Neurosci. Res.* 22: 351-355.
- VATASSERY G.T., ANGERHOFER C.K. y KNOX C.A.J. (1984). Effect of age on vitamin E concentrations in various regions of the brain and a few selected peripheral tissues of the rat, and on the uptake of radioactive vitamin E by various regions of rat brain. *J. Neurochem.* 43: 409-412.
- VERREAULT R., CHU J., MANDELSON M. y SHY K. (1989). A case-control study of diet and invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer* 43: 1050-1054.
- VIDELA L.A., BARROS S.B. y JUNQUEIRA U.B. (1990). Lindane-induced liver oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 169-179.
- VITORICA J., MACHADO A. y SATRUSTEGNI J. (1984). Age-dependent variations on peroxide-utilizing enzymes from rat brain mitochondria and cytoplasm. *J. Neurochem.* 42: 351-356.
- WALLING C. (1982). En: *Oxidases and Related Redox Systems* (King T.E., Mason H.S. y Morrison M. Eds.). Pergamon Press. Oxford. pp. 85-97.

- WARSHAW J.B., WILSON C.W., SAITO K. y PROUGH R. (1985). The responses of glutathione and antioxidant enzymes to hyperoxia in developing lung. *Pediatr. Res.* 19: 819-823.
- WILLIAMS R.N., DELAMERE N.A. y PATERSON C.A. (1985). Inactivation of catalase with 3-amino-1,2,4-triazole: an irreversible mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3386-3389.
- WOLBARSCH M.L. y FRIDOVICH I. (1989). Hyperoxia during reperfusion is a factor in reperfusion injury. *Free Rad. Biol. Med.* 6: 61-62.
- WOOD J.D. (1975). Oxygen toxicity. En: *The Physiology and Medicine of Diving and Compressed Air Work* (Elliot D.H. y Bennet P.D. Eds.). Williams & Wilkins. Baltimore. Maryland. pp. 461-474.
- YUSA T., BECKMAN J.S., CRAPO J.D. y FREEMAN B.A. (1987). Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by brain *in vivo*. *J. Appl. Physiol.* 63: 353-358.
- ZHAN.H., SUN C-P., LIU C-G. y ZHOU J-H. (1992). Age-related changes of free radicals generation in liver and sex glands of rats. *Mech. Ageing Dev.* 62: 111-116.

Los resultados correspondientes a la primera parte de esta Tesis Doctoral (2,5 meses de tratamiento) han sido publicados en diferentes revistas internacionales:

*J. Comp. Physiol. B.* 160: 655-661 (1990)

*J. Neurosci. Res.* 26: 370-376 (1990)

*Mech. Ageing Dev.* 56: 281-292 (1990)