

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

*Cumarinas en la prevención
del estrés oxidativo dependiente de la edad*

MEMORIA QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
FARMACIA PRESENTA

Sagrario Martín-Aragón Alvarez

Madrid, 1994

ANGEL M^a VILLAR DEL FRESNO y JUANA M^a BENEDÍ GONZÁLEZ, Catedrático y Profesora Titular, respectivamente, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **SAGRARIO MARTÍN-ARAGÓN ALVAREZ**, ha realizado bajo su dirección el trabajo "Cumarinas en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad" con objeto de obtener el Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a 6 de junio de mil novecientos noventa y cuatro.

Directores



Dr. D. Angel M^a Villar del Fresno



Dra. Dña. Juana M^a Benedí González

Quiero expresar mi sincero agradecimiento:

Al Dr. D. Angel M^a Villar del Fresno, porque una vez más, después de dirigir mi Tesina, me ha brindado su valiosa dirección, apoyo científico, y confianza, para la realización de esta Tesis Doctoral y para mi formación en Farmacología. También quiero destacar mi gratitud por el aprecio que me ha mostrado, y por el buen humor y la actitud optimista que me ha manifestado en los momentos más arduos.

Mi agradecimiento lleno de cariño a la Dra. Dña. Juana M^a Benedí González que, mediante la creciente amistad que nos une, y con su experiencia científica y constante ayuda, ha hecho posible la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de Departamento, especialmente a Paloma y a Jesús, que han estado conmigo más cerca con motivo de este trabajo; a todos ellos agradezco su ayuda, su colaboración, su amistad, y cuanto me han enseñado y he aprendido de ellos.

A las personas de este Departamento que realizan una labor distinta de la docente e investigadora, pero indispensable, quiero expresar mi gratitud y mi aprecio por ellas, y una gran estima por su trabajo.

A todas esas personas amigas que están detrás de esta Tesis Doctoral, les debo su apoyo, empuje y comprensión constantes, especialmente en los momentos de abatimiento.

Finalmente, mi expresión de cariño a mi querida familia, cuyo apoyo insustituible ha sido fundamental en la realización de esta Tesis Doctoral. Y especialmente, a Alberto, mi hermano pequeño, hombre apasionado por el Cine, la Literatura, y las Artes en general, que tanto me ha alentado en mi afán por la investigación.

A todos, mi más sincera gratitud.

A mi querida Familia

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 1 |
| 1. MECANISMOS BIOLÓGICOS DEL ENVEJECIMIENTO | 7 |
| 1.1. Introducción a la biología del envejecimiento | 7 |
| 1.2. Observaciones sobre el envejecimiento | 8 |
| 1.3. Características del envejecimiento | 10 |
| 1.4. Teorías del envejecimiento | 11 |
| 1.4.1. Teorías evolutivas | 11 |
| 1.4.2. Teorías de control genético | 12 |
| 1.4.3. Visión integral de las teorías de desgaste metabólico, diferenciación celular, y radicales libres | 17 |
| 2. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO Y PEROXIDACIÓN TISULAR | 19 |
| 2.1. Oxígeno y especies activas de oxígeno | 19 |
| 2.2. Reducción molecular del oxígeno | 20 |
| 2.3. Peroxidación tisular y envejecimiento | 21 |
| 2.3.1. Mecanismo de peroxidación lipídica | 23 |
| 2.3.2. Productos de la peroxidación lipídica | 25 |
| 2.3.3. Toxicidad y daño | 25 |
| 3. ANTIOXIDANTES | 27 |
| 3.1. Sistemas de protección celular frente a la peroxidación | 28 |
| 3.2. Antioxidantes de síntesis | 36 |
| 3.3. Antioxidantes de origen natural | 37 |
| 4. CUMARINAS | 40 |
| 4.1. Cumarinas: grupo farmacológico seleccionado | 40 |
| 4.2. Cumarinas: antioxidantes fenólicos | 42 |
| 4.3. Otras acciones farmacológicas de cumarinas | 45 |
| 4.4. Acción sobre enzimas | 46 |
| 4.5. Efectos sobre respiración y fosforilación oxidativa | 47 |
| 4.6. Efectos sobre ácido nucleico y metabolismo proteico | 47 |
| 4.7. Metabolismo, farmacocinética y toxicología | 48 |

| | |
|--|-----|
| MATERIAL Y MÉTODOS | 51 |
| 1. MÉTODOS <i>IN VITRO</i> | 52 |
| 1.1. Sistema generador de anión superóxido | 55 |
| 1.2. Sistema generador de radical hidroxilo | 56 |
| 1.3. Sistema generador de peróxido de hidrógeno | 57 |
| 1.4. Peroxidación lipídica microsomal | 59 |
| 2. MÉTODOS <i>IN VIVO</i> | 60 |
| ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO | 63 |
| 1. Test de la cuerda | 63 |
| 2. Test del cilindro rotatorio (Rota-rod) | 64 |
| 3. Test de evitación pasiva | 65 |
| ENSAYOS <i>IN VITRO</i> | 67 |
| 1. Determinación de la actividad de antioxidantes enzimáticos .. | 67 |
| 2. Determinación de un antioxidante no enzimático: el glutathion | 75 |
| 3. Determinación de la peroxidación lipídica | 77 |
| 3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS | 80 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 82 |
| 1. RESULTADOS <i>IN VITRO</i> | 83 |
| 2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS <i>IN VITRO</i> | 95 |
| 3. RESULTADOS <i>IN VIVO</i> | 97 |
| 3.1. RESULTADOS DE COMPORTAMIENTO | 97 |
| 3.2. RESULTADOS DE MEDIDA DE ANTIOXIDANTES Y DAÑO TISULAR | 127 |
| 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS <i>IN VIVO</i> | 155 |
| 4.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE COMPORTAMIENTO .. | 155 |
| 4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA MEDIDA DE ANTIOXIDANTES Y DEL DAÑO TISULAR | 160 |
| CONCLUSIONES | 169 |
| BIBLIOGRAFÍA | 172 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| ${}_{7}$ AM | 7-amín-4-metilcumarina |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ASC _{ox} | Acido ascórbico oxidado |
| ASC _{red} | Acido ascórbico reducido |
| BHA | 2,(3)- <i>terc</i> -butil-4-hidroxianisol |
| BHT | 2,3-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxitolueno |
| C | 7-dimetilaminciclopenta(c)cumarina |
| ${}_{3}$ CA | Ácido cumarín-3-carboxílico |
| CAT | Catalasa |
| CL | Quimioluminiscencia |
| COX | Citocromo c oxidasa |
| DAF | 4-metildafnetina |
| DDL | 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina |
| ${}_{7}$ DI | 7-dimetilamín-4-metilcumarina |
| DIM | 6,7-dimetoxicumarina |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DO | Densidad óptica |
| DTNB | 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) |
| DTPA | Acido dietilentriaminopentaacético |
| EAO | Especies activas de oxígeno |
| EDTA | Acido dietilendiaminotetraacético |
| ESC | Esculetina |
| ESC _A | Esculina |
| ESCO | Escopoletina |
| ESM | Error estándar medio |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FRAX | Fraxetina |
| G6PDH | Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa |
| GPx | Glutation peroxidasa |
| GPx-Se | Glutation peroxidasa selenio dependiente |
| GPx-no-Se | Glutation peroxidasa no selenio dependiente |
| GR | Glutation reductasa |
| GS | Glutamina sintetasa |
| GS \cdot | Radical glutation |
| GSH | Glutation reducido |

| | |
|-------------------------------|---|
| GSSG | Glutation oxidado |
| GSSR | Disulfuro mixto |
| GST | Glutation S-transferasa |
| 5-HETE | 5-hidroieicosatetraenoico |
| HHT | 7-carbono hidroxiaácido |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| ₆ M | 6-metilcumarina |
| ₇ M | 7-metilcumarina |
| ₇ MX | 7-metoxicumarina |
| MAN | Manitol |
| MDA | Malondialdehído |
| M-ESC | 4-metilesculetina |
| MIRIC | Miricetina |
| M-UMB | 4-metilumbeliferona |
| NBT | Azul de nitrotetrazolio |
| NEM | N-etilmaleimida |
| O ₂ | Oxígeno molecular |
| O ₂ ⁻ | Anión superóxido |
| ¹ O ₂ | Oxígeno singlete |
| ·OH | Radical hidroxilo |
| 4OH | 4-hidroxycumarina |
| 7OHAC | Ácido 7-hidroxycumarín-4-acético |
| 3-OHC | 3-hidroxycumarina |
| 7-OHC | 7-hidroxycumarina |
| 7-OHCG | 7-hidroxycumarín-glucurónido |
| PAF | Factor activador plaquetar |
| PMN | Leucocitos polimorfonucleares |
| PMS | Fenazina metosulfato |
| P:O | Coc. respiratorio = fosforilación:utilización de O ₂ |
| R· | Radical alquilo |
| RO· | Radical alcoxilo |
| ROH | Hidróxido orgánico |
| ROO· | Radical peroxilo |
| ROOH | Hidroperóxido orgánico |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| STH o GH | Hormona del crecimiento |
| T ₄ | Tiroxina |

| | |
|-----------|--|
| TBA | Ácido 2-tiobarbitúrico |
| TBArs | Sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico |
| TRI | 7-hidroxi-3,4,8-trimetilcumarina |
| UMB | Umbeliferona |
| VitEO· | Radical tocoferilo |
| VitEOH | Vitamina E |
| 2-VP | 2-vinilpiridina |
| \bar{x} | Media aritmética |

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La generación de **Radicales Libres de Oxígeno** es un fenómeno que tiene lugar en todos los organismos vivos que utilizan el oxígeno molecular (Halliwell, 1990; 1991). Durante la evolución, estos seres vivos han ido desarrollando un sofisticado **sistema antioxidante** para hacer frente a los efectos deletéreos de los productos de la reducción del oxígeno. Estos sistemas (*scavengers*) incluyen compuestos químicos capaces de "captar" o "secuestrar" especies activas de oxígeno (EAO), tales como tocoferoles (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno (vitamina A), y glutatión, así como una serie de enzimas especializadas en la reducción de radicales libres a especies más estables. Las tres enzimas antioxidantes más importantes son superóxido dismutasa (SOD; cobre, zinc, manganeso), catalasa (CAT, hierro), y glutatión peroxidasa (GPx, selenio). Otras, como glutatión reductasa (GR), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), y glutatión S-transferasa (GST), constituyen un soporte para las enzimas antioxidantes primarias. Ya que la generación de radicales libres de oxígeno en la célula está muy localizada, la distribución de estas enzimas es tal que se complementan unas a otras para la destrucción de las especies radicalarias producidas en los mismos compartimentos celulares. Por ejemplo, el 90% del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido en los peroxisomas es eliminado por la CAT antes de que difunda de este orgánulo. Asimismo, casi todo el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) formado en la cadena respiratoria mitocondrial es convertido a H_2O_2 por la isoenzima SOD mitocondrial, que requiere manganeso como grupo prostético (Halliwell, 1989). Las enzimas antioxidantes mitocondriales están codificadas por sus propios genes y reguladas específicamente en respuesta al ambiente mitocondrial. Esto demuestra la importancia de la mitocondria como el lugar principal de consumo de oxígeno y generación de radicales libres (Tappel, 1959; Marco, 1961; Miquel, 1980; Fleming, 1982; Sohal, 1991a; 1991b).

El envejecimiento podría ser el resultado de **continuas reacciones de los componentes celulares con radicales libres de oxígeno durante el período de vida** (Harman, 1956; 1978; 1981). Sin embargo, la relación entre envejecimiento y antioxidantes es todavía un tema controvertido. Por un lado, el envejecimiento está asociado con un descenso en la proliferación celular y en la síntesis proteica, que afecta por tanto, al *turnover* de enzimas antioxidantes. Y, por otro lado, el estrés oxidativo asociado al envejecimiento puede causar cambios adaptativos en el *status* antioxidante de la célula en respuesta a la magnitud del daño (Ji, 1993).

La degeneración funcional de las células somáticas durante el envejecimiento, en buena parte, contribuye al desencadenamiento de **enfermedades degenerativas** como cáncer, alteraciones cardiovasculares, déficits en el sistema inmune, disfunción cerebral, cataratas, etc. (Ames, 1981; 1993).

Además de los efectos protectores de los sistemas antioxidantes endógenos, el **consumo de dietas antioxidantes** parece tener una gran importancia en la prevención de las enfermedades (Gerschman, 1955; 1958).

Las frutas y los vegetales, la fuente principal de antioxidantes de la dieta, están asociados con una disminución en el factor de riesgo para contraer enfermedades degenerativas (Ames, 1993). Hay evidencias sobre la prolongación de la vida media normal y la inhibición espontánea del cáncer mediante la administración exógena de antioxidantes en animales de experimentación (Harman, 1961). Se ha observado que ratones alimentados con dietas que contienen cantidades importantes de antioxidantes viven más tiempo que los alimentados con dietas de laboratorio estándar. La magnitud del efecto varía con la sustancia añadida: α -tocoferol, 2-mercaptoetilamina (Harman, 1961), ditiocarbamatos (Harman, 1968), *tert*-butilhidroxitolueno (BHT) (Harman, 1969), etoiquina (Comfort, 1971), etc. Estos estudios fueron promovidos como consecuencia de la formulada teoría de los radicales libres y envejecimiento (Harman, 1956; Tappel, 1959; 1973; Dormandy, 1969). En ella se postula que tanto el envejecimiento natural como el inducido por radiación puede implicar ataque de radicales libres oxidativos a moléculas o lípidos (Dormandy, 1969), a largo plazo, incluidos los de la mitocondria (Tappel, 1959; Marco, 1961).

La longevidad incrementada en ratones que han recibido un aporte de antioxidantes, es compatible con la hipótesis de envejecimiento por radicales libres. Así se ha comprobado que ratones deficientes en α -tocoferol experimentan un incremento en la sensibilidad al oxígeno (Gerschman, 1955; Taylor, 1958; Machlin, 1963; Diplok, 1984; Packer, 1984; Matsuo, 1992; Meydani, 1992).

Desafortunadamente, el alimentar a los animales con antioxidantes está frecuentemente asociado con la pérdida de peso, factor que podría llegar por sí mismo a un aumento de las expectativas de vida del animal. Por tanto, la asociación entre las expectativas de vida, la longevidad y el consumo de dietas con antioxidantes está aún por determinar (Comfort, 1971).

Muchos antioxidantes, especialmente el BHT, son poderosos inductores enzimáticos (Branen, 1975; Cha, 1982), y Ross (1969) observó que la concentración de enzimas en hígado era correlativa con la ulterior expectativa de vida de ratas sometidas a distintas dietas. Y así afirma, que el envejecimiento biológico es una manifestación de los cambios en las actividades enzimáticas que tienen lugar de forma natural, y que dietas determinadas pueden reducir o modificar estos cambios con la consiguiente reducción en la tasa de envejecimiento.

Aunque todavía permanece oscuro el mecanismo de acción de antioxidantes por el que prolongan la vida media de organismos filogenéticamente distintos, se han realizado estudios sobre el efecto de distintas concentraciones de antioxidantes (propil galato, *terc*-butilhidroxianisol (BHA), y α -tocoferol) en la actividad GR de tejido cerebral y hepático de ratones macho de distintas edades (Khanna, 1992). Dichos compuestos producen un aumento en la actividad enzimática. Este incremento puede ser indicativo de una disminución del daño por radicales libres, ya que la GR mantiene el potencial reductor de la célula en un nivel elevado (Khanna, 1992).

En el desarrollo de la Farmacología de productos naturales, se ha comprobado que diversos **compuestos fenólicos** ejercen efectos protectores en modelos de hepatotoxicidad inducida por xenobióticos y mediados por radicales libres. Y así, se ha mostrado la actividad hepatoprotectora de algunos flavonoides y ácidos fenólicos (Wagner, 1986a; Joyeux, 1990; Payá, 1993b). Muchas de las propiedades biológicas de estos compuestos han sido relacionadas con su capacidad antioxidante (Larson, 1988) y se ha prestado una atención considerable a su acción en el proceso oxidativo. Diversos flavonoides y ácidos fenólicos inhiben la peroxidación lipídica *in vitro* (Laughton, 1989; Mora, 1990; Cholbi, 1991; Rfos, 1992) o son capaces de actuar como "reductores" "atrapadores" (o *scavengers*) o "desactivadores" de las EAO (Robak, 1988; Huguet, 1990; Sichel, 1991; Cotelle, 1992).

En la hepatotoxicidad mediada por ciertos xenobióticos tiene lugar como fenómeno previo la deplección de glutatión, péptido que actúa como un importante sistema antioxidante, ya que su forma reducida en combinación con las GPx, elimina el H₂O₂ y los hidroperóxidos lipídicos (Payá, 1993b). Estos compuestos fenólicos, por tanto, podrían contribuir a vencer los efectos dañinos del estrés oxidativo, cooperando con las moléculas protectoras naturales tales como el glutatión reducido, y con su acción directa como "captadores" de radicales libres (Payá, 1993b).

Estudios previos sobre **CUMARINAS**, que pretendían desarrollar agentes innovadores por su interacción con EAO (inhibición de la peroxidación lipídica no enzimática y "captadores" de radicales superóxido y peróxilo) (Vladimirov, 1991; Payá, 1992a; 1992b; 1993a; 1993b), concluyeron que diversos compuestos de este grupo tenían una capacidad beneficiosa para "captar" radicales y podría esperarse que fueran protectores en el daño tisular causado por la generación de EAO, como puede ser el estrés oxidativo asociado al envejecimiento. Como en el caso de flavonoides y ácidos fenólicos, también se ha descrito una actividad hepatoprotectora de diversos compuestos cumarínicos (Wagner, 1986a; Yang, 1991; Anand, 1992).

Las **CUMARINAS** comprenden un amplio grupo de sustancias benzo- α -pironafenólicas (se han descrito más de mil compuestos) ampliamente distribuidas en la naturaleza. Aunque algunas de ellas son tóxicas para los mamíferos, como las aflatoxinas, y se ha descrito fototoxicidad y fotomutagenicidad para las furanocumarinas, sin embargo, las cumarinas simples son menos tóxicas y presentan un amplio rango de acción farmacológica (Murray, 1982; Egan, 1990).

En los últimos años, el ensayo de un amplio espectro de productos naturales como potenciales "captadores" o *scavengers* de radicales libres de oxígeno, constituye una de las posibles aproximaciones a la terapia de procesos degenerativos inducidos por EAO. Y, siguiendo a Harman (1956) en su teoría sobre la toxicidad del oxígeno y el envejecimiento, y en vista de que una de las predicciones más interesantes de esta hipótesis podría ser la prolongación de la vida media de poblaciones de animales mediante la administración en la dieta de antioxidantes, en este contexto, hemos llevado a cabo el trabajo de investigación de este proyecto de Tesis Doctoral. Se ha seleccionado el grupo farmacológico de las **CUMARINAS** como agentes potenciales en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad. La búsqueda de esta actividad antioxidante en estos compuestos, a primera vista indeterminada, se ha evaluado *in vitro* e *in vivo*.

Primeramente, se ha realizado un *screening* de 19 cumarinas de origen natural y sintético, mediante reacciones químicas de generación de radicales, para evaluar su capacidad *scavenger* ("atrapadora"), así como inhibitoria de la peroxidación lipídica. A partir de estas técnicas *in vitro*, se han seleccionado los compuestos con mayor espectro de actividad anti-radicalaria.

Posteriormente, las cumarinas seleccionadas se han administrado independientemente, de forma crónica durante un tiempo establecido, a animales de experimentación (ratón macho C57BL/6J) de distintas edades. Simultáneamente al tratamiento, se ha ido evaluando el comportamiento animal bajo la influencia de estos compuestos (vitalidad, vigor, coordinación muscular, coordinación motora, memoria,...).

Al final del tratamiento, los animales se han sacrificado mediante descoyuntamiento cervical y se han extraído las muestras biológicas de interés, hígado y corteza cerebral. En ellas se ha hecho un estudio de diversos antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, así como el grado de daño tisular mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBA), con el fin de conocer la influencia de los compuestos seleccionados en los mecanismos protectores antioxidantes endógenos celulares y, por tanto, en la prevención del daño oxidativo.

No es la pretensión de este trabajo de investigación conocer la influencia de ciertas cumarinas en la vida media de pequeñas poblaciones de ratones C57BL/6J de distinta edad, y mucho menos hacer un estudio experimental de envejecimiento de dicha raza de ratón. **El propósito de nuestro estudio se orienta más a establecer una relación entre el comportamiento animal y la concentración de antioxidantes endógenos con el envejecimiento biológico, como consecuencia del tratamiento farmacológico con las cumarinas de elección.**

En la presente Introducción se revisará el estado actual de los conocimientos acerca de:

1. Mecanismos biológicos del envejecimiento.
2. Radicales libres de oxígeno y peroxidación tisular.
3. Antioxidantes.
4. Cumarinas.

Hemos incluido una revisión del grupo de compuestos de las **CUMARINAS**, atendiendo principalmente a sus actividades farmacológicas atribuibles a su capacidad antioxidante.

1. MECANISMOS BIOLÓGICOS DEL ENVEJECIMIENTO

1.1. Introducción a la biología del envejecimiento

El estudio de la biología del envejecimiento ha tenido una historia larga y pintoresca. En la Antigüedad, Aristóteles ya habló sobre la vida media y las teorías del envejecimiento, y catalogó la longevidad máxima de diversas especies. Later, Galeno y Roger Bacon también contribuyeron a la literatura antigua y medieval en este sentido (Cristofalo, 1990).

En 1908 Elie Metchnikoff recibió el Premio Nobel por sus muchas aportaciones al estudio de la biología del envejecimiento. Y definió dicho concepto como el proceso causado por **la absorción continua de toxinas procedentes de las bacterias intestinales** (Cristofalo, 1990).

Comfort (1974) contempla el período moderno de la gerontología, iniciado alrededor de 1950, cuando se llevaron a cabo los estudios sistemáticos que describieron **el fenotipo del envejecimiento en términos de fisiología, bioquímica y morfología celular**. Este avance impulsó el desarrollo creciente de hipótesis cada vez mejor definidas y experimentalmente demostrables. Sin embargo, hasta ahora, las distintas teorías de envejecimiento son frecuentemente presentadas como ideas independientes que no conducen a una interpretación integrada de lo que constituye el fenómeno de envejecimiento.

Una de las dos principales teorías de envejecimiento, es la llamada por Comfort "**Fundamentalista**". Depende en algunos aspectos del *wear and tear* (desgaste y daño), y atribuye el envejecimiento a un tejido específico (por ej., nervioso, endocrino, vascular, conectivo, etc.) (Comfort, 1974).

El otro grupo general de teorías considera el envejecimiento como un **epifenómeno**. Y así, la base del mismo podría encontrarse en los agentes medioambientales como toxinas, rayos cósmicos, gravedad, etc. (Cristofalo, 1990).

Otras teorías, que podrían incluirse en uno de los dos grupos anteriores, contemplan el envejecimiento como **un proceso continuo con desarrollo y morfogénesis** (Warthin, 1929), o **asociado a factores como la deplección de energía y el declinar del crecimiento de células somáticas** (Pearl, 1928).

Versiones más específicas de estas teorías generales han implicado **al sistema inmune, al sistema neuroendocrino, la mutación al azar de células somáticas, fracasos en la reparación del DNA, errores en la síntesis de proteínas, acumulación de productos tóxicos, daño fortuito por radicales libres, y otros** (Martín, 1992).

Las distintas teorías, como quiera que se clasifiquen, no son exclusivas entre sí, ya que el envejecimiento no tiene probablemente una causa sencilla. Es más, los cambios que tienen lugar con la edad pueden ser interdependientes, y la regulación de la tasa de envejecimiento

no parece que dependa de un mecanismo simple. Por tanto, es más posible que exista una combinación del daño medioambiental y de los procesos intrínsecos adicionales que tienen lugar (Kirkwood, 1992)

1.2. Observaciones sobre el envejecimiento

Es preciso hacer una breve revisión de las observaciones y correlaciones asociadas con los procesos de envejecimiento para discutir posteriormente las distintas teorías acerca del mismo.

No existe un conocimiento exhaustivo sobre la naturaleza de los mecanismos involucrados en el proceso de envejecimiento, aunque haya sido acometido su estudio a lo largo de toda la historia (Kirkwood, 1992).

La combinación del daño medioambiental y de los cambios intrínsecos, por un lado, y la utilización de biomarcadores limitados para definir la cinética de los procesos de envejecimiento, por otro, son factores que dificultan la formulación de principios unificadores. Sin embargo, está claro que el envejecimiento se caracteriza por **un incremento de la vulnerabilidad al cambio medioambiental**. Así, cuando un individuo sufre un estrés que interacciona con una de las variables de su medio interno, la edad influye marcadamente en el grado de desplazamiento de la variable y en el tiempo necesario para que la variable vuelva a la normalidad. Como consecuencia, **el aumento de la edad cronológica trae consigo un incremento en la probabilidad de la mortalidad**. De hecho, una expresión matemática del envejecimiento biológico considera este aumento en la probabilidad de mortalidad como una función del tiempo, a diferencia de las cinéticas de procesos no biológicos de deterioro (desintegración radiactiva, especies en tierra salvaje que son extinguidas por predadores o que mueren por accidentes), en que la fracción de la población moribunda es constante en el tiempo. En este último caso, los individuos mueren antes de que tengan la oportunidad de mostrar el aumento de vulnerabilidad que caracteriza al envejecimiento biológico (Cristofalo, 1990).

También parece importante cuestionarse por qué el proceso de envejecimiento biológico de poblaciones protegidas tiene lugar en toda la naturaleza. Si se plantea el envejecimiento como un proceso genéticamente programado, intencionado, determinado, en el que la vulnerabilidad al medio ambiente aumenta con el tiempo, entonces habría que pensar que a lo largo de la evolución se produce una selección mediante una propiedad negativa (Rose, 1980). Quizá, la más atractiva de las ideas en este sentido, sea la propuesta por Medawar y Williams. Ambos argumentan que **la optimización de la reproducción es lo que selecciona**. Medawar (1952) puntualiza que los genes deletéreos asociados con la senescencia pueden aplazar su

expresión hasta el período postreproductivo. Williams (1957) introdujo la idea de **pleiotropía antagonística** que expone que los genes expresados tempranamente en vida y asociados con la optimización de la fecundidad tienen efectos deletéreos finalmente en vida. Así, el envejecimiento puede ser el precio que se paga por los mecanismos que aseguran la próspera reproducción.

Sacher (1968) hace una distinción entre organismos *semelparous* e *iteroparous*. Los primeros, como plantas anuales y salmón del Pacífico, mueren después de experimentar el proceso de reproducción una sola vez. Este envejecimiento rápido, que está fuertemente acoplado a un sencillo evento reproductivo, puede representar una especie de envejecimiento programado, directamente dependiente de la reproducción. Sin embargo, para los organismos *iteroparous*, el éxito de la evolución requiere reproducción repetida, y por ello, la senescencia no tiene un papel positivo. Antes bien, la estabilidad del organismo en un medio ambiente cambiante, es el factor selección. Por ello, el estudio de "los genes que aseguran la longevidad" proporciona mayor información. La comparación de las expectativas de vida máxima de distintas especies de organismos *iteroparous*, ha permitido la identificación de estos genes que aseguran la longevidad. No parece que exista conflicto entre la selección por la senescencia (por ejemplo, pleiotropía antagonística) y el concepto de "los genes que aseguran la longevidad". Quizá, por ejemplo, los mecanismos que reducen la probabilidad de transformación neoplásica se fundamenten en la supresión de la plasticidad de la expresión del gen en el organismo. Esto es, naturalmente, una noción completamente especulativa que muchos científicos pueden encontrar atractiva (Cristofalo, 1990).

Otro problema confuso en la comprensión del envejecimiento es el hecho de que exista un vasto espectro de cambios. El proceso de envejecimiento es probablemente multifactorial en su regulación. Es virtualmente imposible prever qué cambios son primarios a un evento senescencia-regulado y qué cambios son secundarios (Martín, 1992).

Finalmente, hay que decir que existe una confusión entre los conceptos de envejecimiento, enfermedad y muerte. El envejecimiento se caracteriza por una **pérdida en la homeostasis** y, como consecuencia, por un incremento en **la vulnerabilidad a la enfermedad** (Martín, 1992). Por otro lado, durante mucho tiempo, el concepto de muerte ha sido utilizado como la medida del punto final del envejecimiento. Sin embargo, la muerte puede deberse a muchas causas, algunas de ellas relativas al proceso de envejecimiento, sólo secundariamente. El envejecimiento, no tiene lugar en todas las especies o en todos los organismos de la misma especie, en la misma trayectoria exactamente; mientras un tejido puede perder capacidad funcional (envejecimiento, senescencia) rápidamente, otros pueden permanecer completamente "jóvenes" y "escapar" de la suerte de la edad. Es decir, mientras algunas funciones fisiológicas permanecen relativamente estables durante el envejecimiento humano, otras sufren una **pérdida gradual de reserva**. La muerte del

organismo refleja el fracaso de un tipo de célula o tejido del cual depende el organismo entero. Para una mejor comprensión de los procesos biológicos y de los mecanismos del envejecimiento, es preciso desglosar el escenario del envejecimiento, es decir, anatomizar tejido por tejido, y especie por especie (Cristofalo, 1990).

El principio de división del trabajo, que apareció en los organismos multicelulares en una temprana etapa de la evolución y que ha producido estructuras cada vez más complejas, podría explicar la diferenciación entre células mortales e inmortales. A partir de ahí, las células somáticas sobrepasaron en número a las reproductoras y se subdividieron en sistemas de tejidos claramente diferenciados. Al mismo tiempo se perdió el poder regenerativo de partes considerables del organismo, y la capacidad de reproducción pasó a ser competencia exclusiva de las células sexuales. Los mecanismos que permiten la inmortalidad de las células reproductoras y aseguran el envejecimiento y la mortalidad de las células somáticas, constituyen el objetivo principal de la gerontología moderna (Hayflick, 1992).

1.3. Características del envejecimiento

A pesar de todos los aspectos confusos concernientes al proceso de envejecimiento, en mamíferos se pueden destacar las siguientes características sobre el mismo:

1. Mortalidad incrementada con la edad después de la maduración.
2. Cambios en la composición química del organismo con la edad. Estos cambios, estudiados primariamente en mamíferos, conllevan una disminución en la masa corporal magra y un incremento en la grasa. También es característico un mayor acúmulo de lipofuscina (pigmento de la edad) (Miquel, 1974; 1978b; Bodner, 1991) en ciertos tejidos y un incremento en la formación de enlaces cruzados en moléculas matriz como el colágeno (Harrison, 1978).
3. Un amplio espectro de cambios deteriorativos progresivos, demostrado tanto en estudios transversales como longitudinales.
4. Habilidad reducida para responder adaptativamente al cambio medioambiental. Esto puede demostrarse a todos los niveles, desde el molecular al nivel de organismo. Así, los cambios deteriorativos asociados a la edad representan la habilidad más o menos disminuida para volver a los parámetros normales después de un estrés fisiológico.

5. Aumento en la vulnerabilidad a muchas enfermedades con la edad. La comprensión de esta realidad, por el momento, es muy pobre.

1.4. Teorías del envejecimiento

Una forma útil de presentar toda la información que nos proporciona la literatura gerontológica, es agrupar la multiplicidad de teorías en dos clases según su base conceptual fundamental, y a partir de ahí describir los ejemplos notables de ambas clases. Esta clasificación es solamente operacional, y ninguna de las dos clases de teorías, tampoco las teorías en sí mismas, se excluyen mutuamente.

1.4.1. Teorías evolutivas

El envejecimiento es causado por la acumulación de "noxas" procedentes del medio ambiente. Estas alcanzan eventualmente un nivel incompatible con la vida.

El ejemplo específico más notable de esta clase de teorías es la teoría de **MUTACIÓN SOMÁTICA DEL ENVEJECIMIENTO** (Cristofalo, 1990; Martín, 1992). En ella se expone que las mutaciones (daño genético), presumiblemente, resultan de la radiación medioambiental, y quizá, de agentes radiomiméticos que se acumulan eventualmente produciendo fracaso funcional y, muerte. La reducción del tiempo de vida por exposición a la radiación ionizante, es una observación bien documentada que constituye el principal soporte experimental de esta teoría. Pero, el mecanismo por el cual la vida media se acorta por la radiación ¿tiene alguna relación con el mecanismo normal de envejecimiento?. También se habla de la posibilidad de genes variables o genes empalmables que podrían encontrarse fortuitamente en el envejecimiento y que podrían explicar la expresión de genes cambiantes. Tales mecanismos podrían ser importantes no sólo en la limitación de la vida media sino en los procesos de especiación que están de algún modo acoplados a los cambios en la expectativa de vida máxima. Sería interesante una reexaminación de esta teoría a la luz de las genéticas moleculares modernas.

Un segundo ejemplo de teoría estocástica es la **TEORÍA DEL ERROR CATASTRÓFICO**. Articulada primeramente por Orgel (1963), propone que, aunque pueden producirse errores fortuitos en la síntesis proteica, la molécula de proteína que contiene el error es regenerada completamente y la copia siguiente estará libre de error. Si la proteína

errónea está implicada en la síntesis del material genético o en la maquinaria que sintetiza proteínas, esta molécula podría entonces causar de nuevo errores y así extenderse el número de proteínas con error, conduciendo finalmente a una "crisis de error" que sería incompatible con la función propia y, por tanto, con la vida. La habilidad para reparar el daño del material genético está de algún modo asociado con el envejecimiento o la velocidad de envejecimiento. Aunque parece atractiva la hipótesis de que las diferencias en la capacidad de reparación del DNA proceden de las diferencias en la vida media de las especies, actualmente carece de apoyo experimental.

Una teoría relacionada está basada en la formación de **ENLACES CRUZADOS EN MACROMOLÉCULAS** (Cristofalo, 1990). Aunque la formación de estos enlaces cruzados no es exclusiva de proteínas, el estudio experimental ha dirigido su atención preferentemente al colágeno y a la elastina. El colágeno es una molécula presente en la matriz extracelular de la mayor parte de los tejidos del organismo. Se ha comprobado que el número de puentes cruzados en el colágeno aumenta con la edad, favoreciendo así su insolubilidad. Este fenómeno podría explicar la rigidez de las arterias y de las articulaciones, por ejemplo (Harrison, 1978). Por otro lado, la formación de puentes cruzados en el material genético o en las proteínas que regulan la expresión genética, podrían alterar la expresión de la misma.

1.4.2. Teorías de control genético

El envejecimiento es considerado como un proceso continuo con desarrollo controlado y programado genéticamente.

El primer grupo de estas teorías es denominado como **TEORÍAS NEUROENDOCRINAS** del envejecimiento (Cristofalo, 1990; Martín, 1992). En ellas se hace referencia a los descensos funcionales que se producen en neuronas y sus hormonas asociadas. Una versión importante de estas teorías propone que el eje hipotálamo-hipofisario constituye el cronómetro director del organismo, y el regulador primario del proceso de envejecimiento. Los cambios funcionales que experimenta este sistema son regulados por descensos funcionales a lo largo de todo el organismo. Como es sabido, el sistema neuroendocrino regula tempranamente el desarrollo, el crecimiento, la pubertad, el control del sistema reproductor, el metabolismo, y en parte, las actividades de todos los sistemas de órganos importantes del organismo. Así se ha observado, por ejemplo, cómo en ratas viejas macho y hembra, la capacidad reproductora disminuida es debida a una menor liberación hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropina hipofisaria, y puede atribuirse a una disminución en la

actividad de las catecolaminas hipotalámicas (Eleftheriou, 1975). También se ha comprobado que la liberación de la hormona del crecimiento disminuye con la edad de las ratas, y por otro lado, cuando se someten a hipofisectomía y sus hormonas hipofisarias son repuestas, dichos animales viven más tiempo. La hipofisectomía produce, entre otros trastornos debidos a la carencia de las restantes tropinas, una detención del crecimiento con una serie de trastornos bioquímicos a causa precisamente de la falta de somatotropina (STH o GH, hormona del crecimiento). La administración de hormona del crecimiento a los animales hipofisectomizados restablece la replicación del DNA y la síntesis de RNA, y hace que se reempanda el crecimiento con aumento de la masa muscular, disminución del tejido adiposo, aumento de la retención de nitrógeno, normalización de la tolerancia a la insulina, etc (Esplugues, 1978). Por otra parte, Denckla (1974) ha demostrado que las ratas viejas presentan un consumo reducido de oxígeno en respuesta a tiroxina (T_4). Sin embargo, este efecto es abolido mediante hipofisectomía y reposición de hormonas. A partir de esto se concluyó la posible existencia de una hormona hipofisaria no descrita previamente y llamada "hormona de descenso en el consumo de oxígeno", que probablemente comienza a ser elaborada en la pubertad por estimulación de hormonas tiroideas. Parece ser que dicha hormona, cuya existencia permanece por ahora sin demostrar, es la responsable, en el envejecimiento, del descenso en el consumo de oxígeno y de la efectividad disminuida de las hormonas tiroideas (activan en buena parte las oxidaciones a nivel de las mitocondrias, fenómeno decisivo en la producción de energía en forma de ATP) (Esplugues, 1978).

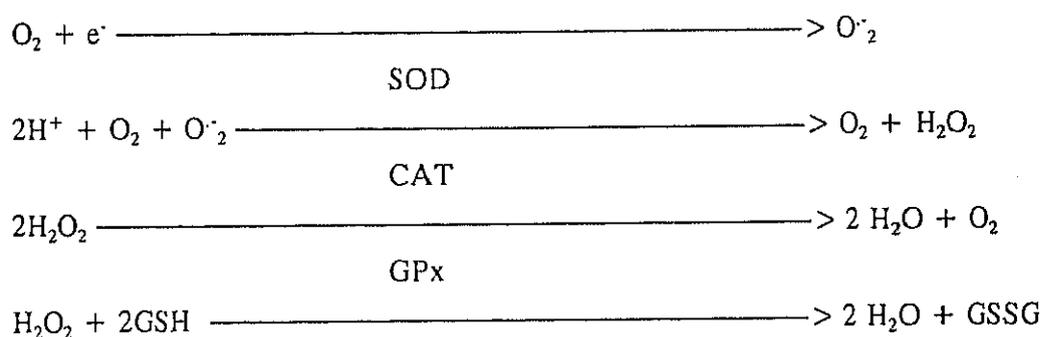
La segunda de estas teorías se denomina como **MUTAGÉNESIS INTRÍNSECA**. Fue propuesta primeramente por Burnet (1974) y aparece como un intento de conciliar las teorías estocásticas de envejecimiento con la regulación genética de la expectativa de vida máxima. Burnet sugiere que cada especie está dotada con una constitución genética específica que regula la fidelidad del material genético y su replicación. El grado de fidelidad regula la tasa de aparición de mutaciones o errores, y así, la vida media. Otro aspecto de esta teoría concierne al incremento en la reparación de la excisión del DNA asociado con la expectativa de vida máxima. Parece ser que la fidelidad de la DNA polimerasa puede disminuir con la edad, aunque no existe por el momento una base experimental que lo confirme.

Una tercera teoría de control genético es la llamada **TEORÍA INMUNOLÓGICA DEL ENVEJECIMIENTO**. Propuesta por Walford (1969), está basada en dos observaciones fundamentales: que la capacidad funcional del sistema inmune disminuye con la edad, como se ha visto en la función reducida de las células T y en la menor vulnerabilidad a contraer enfermedades infecciosas; y que la fidelidad del sistema inmune se ve reducida con la edad, como se pone de manifiesto en el incremento llamativo de la enfermedad autoinmune asociado

a la edad (Solana, 1991). Walford ha relacionado estos cambios del sistema inmune con los genes del complejo principal de histocompatibilidad en ratas y ratones. Y así se ha comprobado cómo animales congénicos, que difieren solamente en el *locus* del complejo principal de histocompatibilidad, parecen tener expectativas de vida máxima diferentes, lo que sugiere que la vida media es regulada por este *locus* (al menos en parte). Este *locus* también regula la SOD y los niveles de oxidasa de función mixta, un hallazgo que relaciona la **teoría inmunológica del envejecimiento** (Martín, 1992) con la **teoría de radicales libres del envejecimiento** (Harman, 1981). Sin embargo, es difícil defender la función del sistema inmune como el cronómetro primario en la biología de todos los organismos.

El cuarto ejemplo de teoría de control genético es la **TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES** (Harman, 1981). En ella se propone que la **mayoría de los cambios que tienen lugar en el envejecimiento, son debidos al daño causado por radicales**. Los radicales libres son átomos o moléculas con un electrón desapareado. Químicamente son especies altamente reactivas que son generadas, generalmente, en reacciones de transferencia electrónica sencilla del metabolismo. Los radicales son rápidamente destruidos por sistemas enzimáticos protectores, tales como la SOD (Miquel, 1989). Sin embargo, algunos radicales escapan a la destrucción por los sistemas defensivos del organismo y causan daño acumulativo en estructuras biológicas importantes. Esta acumulación de daño, eventualmente interfiere con las funciones del organismo y finalmente causa la muerte. En las células, el radical libre mayoritario es el anión superóxido y las moléculas generadas por sus interacciones (Miquel, 1989).

Las reacciones que implican oxígeno y anión superóxido son:



Cuando existe un exceso de oxígeno molecular, puede tener lugar la reacción de Haber-Weiss, produciéndose radical hidroxilo altamente reactivo:



La **peroxidación lipídica** es un ejemplo de daño producido por radicales libres (Lippman, 1989). La lipofuscina, un "pigmento de envejecimiento" (Fletcher, 1973) se acumula en células viejas, y puede ser el producto de la oxidación por la acción de radicales libres sobre ácidos grasos poliinsaturados. La autooxidación de lípidos (Dormandy, 1969) por EAO, puede conducir a la formación de hidroperóxidos que después se descomponen en productos como etano y pentano.

La teoría de los radicales libres parece atractiva porque proporciona un mecanismo para el envejecimiento que no depende de la acción específica del tejido, pero es fundamental a todos los tejidos aerobios (Harman, 1981).

La concentración y localización de las enzimas antioxidantes gobierna el potencial de óxido-reducción de las células, y por tanto controla la muerte de células somáticas y diferenciadas (que es causada por el ataque de radicales libres). La protección antioxidante puede jugar un papel clave en la diferenciación celular (Oberley y Oberley, 1986). Walford (1969) ha señalado el papel clave de los mecanismos antioxidantes programados en la determinación de la vida media de las especies. Y Cutler (1984) subraya que esta función es asumida por los antioxidantes fisiológicos. Estos antioxidantes (cada tipo de célula diferenciada tiene un nivel característico), gobiernan la razón de disdiferenciación de las células y así la razón de envejecimiento del organismo. Este concepto tuvo implicaciones clínicas importantes ya que insuficiencias en la síntesis endógena de antioxidantes podían dar lugar a ciertas enfermedades, y a una aceleración del envejecimiento.

Por otro lado, como el metabolismo *per se* causa daño al organismo, se pensó que una elevada tasa metabólica podría causar un serio calentamiento en un animal grande. En este contexto, se ha observado que, para un grupo limitado de mamíferos, la vida media es más o menos una función directa del tamaño del cuerpo (Sohal, 1993b). Cada especie es capaz de gastar un número determinado de calorías en su tiempo de vida. Las especies que las gastan rápidamente, viven un tiempo corto, y las que las gastan más lentamente, el tiempo de vida es más extenso.

Ya que la tasa metabólica está relacionada directamente con la generación de radicales libres e inversamente con la vida media, parece razonable hipotetizar que la tasa de producción de radicales libres está de alguna forma relacionada con la determinación de la

vida media o la senescencia (López-Torres, 1993a; 1993b; Pérez-Campo, 1993). Por ejemplo, la actividad específica de la SOD en el hígado parece ser directamente proporcional a la expectativa de vida máxima de las especies (Tolmasoff, 1980). Similarmente, otros autores apuntan a la observación hecha en ratas y ratones cuya restricción calórica puede incrementar la expectativa de vida máxima y la vida media, aproximadamente el 50%. **La restricción calórica disminuye la tasa metabólica y así la producción de radicales libres.** Se ha comprobado que protege al DNA del daño oxidativo (Chung, 1992; Ames, 1993).

La restricción calórica y su efecto sobre el incremento de la vida media es quizá una de las investigaciones más prometedoras del mecanismo del envejecimiento. Dicha restricción puede ejercer sus efectos a través del sistema neuroendocrino, ya que Everitt (1980) ha mostrado una similitud entre la restricción dietética y la hipofisectomía.

Una simple extrapolación de la teoría de los radicales libres del envejecimiento, conduce a la conclusión de que individuos activos podrían tener una vida media más corta que individuos inactivos.

Similarmente, el ejercicio vigoroso podría ser una actividad acortadora de la vida, y aunque pueda tener efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades (presumiblemente enfermedades cardiovasculares), al mismo tiempo acelera el envejecimiento a través de la generación incrementada de radicales libres (Zerba, 1990; Ji, 1993; Sastre, 1992). Sin embargo, los aspectos de prevención de la enfermedad podrían oscurecer completamente los efectos de los radicales libres.

TEORÍA GENÉTICO-MITOCONDRIAL DEL ENVEJECIMIENTO (Miquel, 1980; 1984; Fleming, 1982). El genoma mitocondrial desempeña un papel importante en el envejecimiento celular. El sistema genético semiindependiente que contienen estos organelos es necesario para su regeneración a través de un proceso de división mitocondrial. El DNA mitocondrial regula la síntesis de varias proteínas hidrofóbicas de la membrana interna, que son componentes esenciales de los citocromos, citocromo oxidasa y ATPasa. Por ello, si este genoma mitocondrial sufre, con el envejecimiento, mutaciones y otras alteraciones, se producirá una pérdida progresiva de la capacidad de regeneración mitocondrial. Ya que las mitocondrias de las células diferenciadas están expuestas a un continuo ataque por los radicales libres generados durante la reducción univalente del oxígeno, la pérdida de capacidad regenerativa conducirá a una disminución en el número de mitocondrias funcionales y, por consiguiente, a una disminución en la síntesis de ATP ("crisis energética"). Finalmente, se producirá una pérdida en las funciones fisiológicas (Miquel, 1980). El genoma mitocondrial no posee mecanismos de reparación por escisión, ni replicativos, ni postreplicativos. Por ello, es mucho más sensible a las mutaciones que el DNA nuclear (Miquel, 1984).

1.4.3. Visión integral de las teorías de desgaste metabólico, diferenciación celular, y radicales libres

El concepto clásico de **desgaste de las células somáticas como consecuencia de su trabajo fisiológico**, aparece más tarde expresado en lenguaje bioquímico como la teoría de la **toxicidad residual del oxígeno**. Es decir, el envejecimiento tendría lugar por una ligera insuficiencia de las defensas contra la toxicidad del oxígeno. Y Harman afirma que sería la **suma de las reacciones nocivas por radicales libres que tienen lugar continuamente en las células y tejidos** (Harman, 1981).

Estos conceptos, junto con la teoría del *rate of living* de Pearl (1928), según la cual **la intensidad del metabolismo aerobio controla el ritmo de la desorganización senil**, están en concordancia con la disminución regenerativa mitocondrial en las células viejas como consecuencia del ataque por radicales libres de oxígeno y una alteración en la actividad de las enzimas respiratorias (Miquel, 1980).

La pérdida de la inmortalidad de los organismos podría ser debida al **principio de división del trabajo**, que produjo células especializadas destinadas al apoyo de las células reproductoras (Weissman, 1981). Este proceso condujo a la pérdida de poder regenerador de partes considerables del organismo, para concentrarse en las células sexuales la capacidad de reproducir el organismo entero. Paralelamente, Minot (1907) mantiene que la causa fundamental del envejecimiento es el **proceso de diferenciación celular**, que conduce a una pérdida de potencial regenerador. Así, estudios por microscopía electrónica ponen de manifiesto que, mientras células capaces de dividirse no sufren degeneración ultraestructural al envejecer el organismo, las células diferenciadas (que han perdido la capacidad mitótica) degeneran, tanto en los tejidos de los insectos como de los mamíferos.

Los estudios más recientes se presentan como apoyo de la noción de que en las células diferenciadas irreversiblemente, el conflicto entre la desorganización mitocondrial (Miquel, 1980; 1984) por radicales libres de oxígeno y la protección antioxidante de estos orgánulos se desarrolla en favor de una progresiva desorganización estructural y bioquímica. Estas alteraciones producen una depresión en la síntesis de ATP, y proceden de la elevada concentración de radicales de oxígeno que se liberan en la cadena respiratoria de las células diferenciadas. Por tanto, en las células que no han perdido la capacidad mitótica, no hay envejecimiento mitocondrial porque sus orgánulos están protegidos por un mecanismo regenerador muy eficaz, que es la frecuente renovación de las macromoléculas (lípidos estructurales y proteínas de la membrana interna) a través del proceso de división mitocondrial, cuando tiene lugar la división mitótica. Sin embargo, en las células diferenciadas, el *turnover* de los componentes de las membranas mitocondriales es mucho más lento y por lo tanto estas membranas son vulnerables a la desorganización peroxidativa y a la

degradación lisosomal que conducen a la acumulación de lipofuscina en las células viejas. La destrucción mitocondrial en las células diferenciadas conduce a la depresión de la función fisiológica y de la resistencia al estrés, que caracterizan el envejecimiento a niveles más altos de organización biológica (Miquel, 1980; 1984).

2. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO Y PEROXIDACIÓN TISULAR

2.1. Oxígeno y especies activas de oxígeno (EAO)

El hombre ha utilizado el oxígeno para la respiración y la combustión, sin tener conocimiento de ello hasta hace poco tiempo. Leonardo da Vinci observó, hace 500 años, que solamente una parte del aire era utilizada durante la respiración y la combustión. Sin embargo, da Vinci se adelantó a su tiempo, porque el concepto de elemento químico, esencial para explicar sus resultados, no había surgido todavía. Fue Lavoisier quien reconoció el oxígeno como un elemento y demostró que era esencial para la respiración y la combustión, 300 años más tarde. El conocimiento de los mecanismos submoleculares de las reacciones químicas incrementó considerablemente, ya que se identificaron radicales libres en 1900. Actualmente se ha visto, que estos radicales libres son formados como intermediarios en la respiración y en la combustión (Basaga, 1990). Es decir, en el organismo biológico, se producen continuas reacciones de oxidación y reducción, las cuales pueden, y de hecho suele suceder así, generar ciertas EAO, necesarias para realizar funciones fisiológicas, como síntesis de prostaglandinas, metabolización de principios activos (o xenobióticos) en el sistema microsomal hepático, acción peroxidasa, fagocitosis, etc., (Babion, 1982).

Entre las EAO producidas en el organismo humano se encuentran, radicales libres como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), y especies no radicalarias altamente reactivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (1O_2). En definitiva, los radicales libres son especies químicas cargadas o no, que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo (Alvira, 1988a; Halliwell, 1990).

Sin embargo, la producción exacerbada de estas especies puede inducir lesión celular por su alta reactividad y carácter tóxico (enfisema pulmonar, estados de isquemia y reperfusión, toxicidad de herbicidas, efectos radiobiológicos, cáncer, envejecimiento celular, etc.) (Halliwell, 1991; Ames, 1993); la extensión del daño inducido es el resultado del desequilibrio entre las EAO generadas y los sistemas de defensa o protección antioxidante que posee el organismo frente a las mismas (GPx, CAT, SOD, tocoferoles, ácido ascórbico, β -caroteno, etc.) (Halliwell, 1990; 1991).

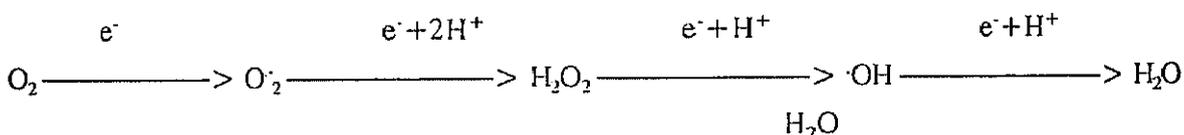
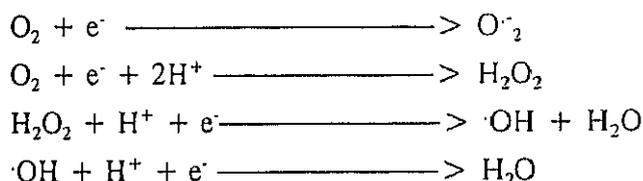
El interés por el estudio de las distintas EAO se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas. Varios factores han contribuido a ello, como la identificación espectroscópica del oxígeno singlete, la apreciación de que el 1O_2 es la especie perjudicial mayoritaria en las oxidaciones fotosensibles, la formación de anión superóxido en la respiración y fagocitosis, y la formación de anión superóxido, radical hidroxilo, y radicales peroxilo por exposición de los sistemas biológicos a radiación de alta energía (Miquel, 1989).

2.2. Reducción molecular del oxígeno

Los organismos aerobios utilizan el oxígeno molecular como aceptor final de los electrones provenientes de la oxidación de combustibles metabólicos, como hidratos de carbono, lípidos y proteínas, convirtiéndolo en agua (Southorn, 1988a):

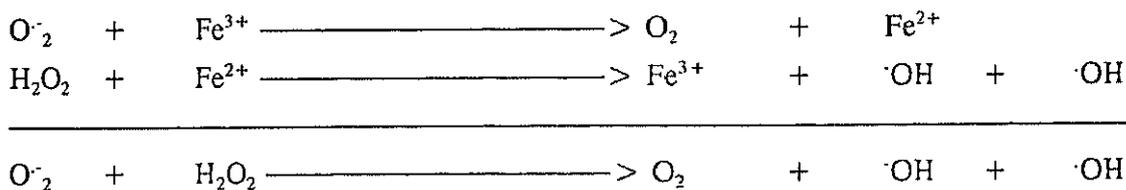


Esta reacción global se lleva a cabo en los organismos vivos desglosada en cuatro etapas:



La vía univalente de reducción del oxígeno da lugar a tres formas "incompletamente reducidas" del mismo, entre éste y el agua: radical superóxido, peróxido de hidrógeno (que no es un radical pero puede generarlos), y radical hidroxilo (Southorn, 1988a).

Hoy día se sabe que el radical superóxido carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas. Sin embargo, en presencia de trazas de metales como hierro o cobre, la combinación de superóxido y peróxido de hidrógeno en la reacción tipo Fenton o Haber-Weiss da lugar a radical hidroxilo (Halliwell, 1991):



Esta reacción es importante en sistemas biológicos (Miquel, 1989); contribuye sobre todo a la acción bactericida del peróxido de hidrógeno y a las reacciones en la fagocitosis. El papel del radical superóxido en esta reacción consiste en reducir el hierro. El $O_2^{\cdot-}$ necesita del peróxido de hidrógeno para producir la especie oxidante $\cdot OH$, mientras que el H_2O_2 no necesita al $O_2^{\cdot-}$ para hacerlo. Por ello, aunque el H_2O_2 no sea un radical libre, tiene capacidad de generar daño oxidativo, cuando se encuentra en las células a concentración aproximadamente mil veces superior a la del radical $O_2^{\cdot-}$. El $\cdot OH$ se considera el principal iniciador del ataque a todo tipo de macromoléculas (Machlin, 1987). Es una de las especies más reactivas presentes en el organismo (Halliwell, 1991). Su electrón desapareado reacciona inespecíficamente con cualquier tipo de molécula a 2-3 diámetros moleculares de su lugar de formación. Su alta reactividad impide su difusión a largas distancias a través de la célula, papel que le correspondería al peróxido de hidrógeno. Este último, por tanto, sería también responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares. Se ha demostrado que existe generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno por parte de enzimas y autoxidación de moléculas en prácticamente todas las fracciones celulares incluyendo la citosólica, mitocondrial, peroxisómica, microsómica, así como en las membranas plasmática y nuclear. La presencia simultánea (o exclusiva de peróxido de hidrógeno) de estas dos especies, asegura la generación significativa de $\cdot OH$ en la mayoría de los rincones celulares. Una fuente continua y significativa de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en todos los tejidos, es la propia cadena respiratoria mitocondrial, a nivel, al menos, de la NADH oxidasa y de la ubiquinona, en la que un 2-5% del oxígeno no da lugar a la formación de agua, sino de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Halliwell, 1991).

2.3. Peroxidación tisular y envejecimiento

La autoxidación de lípidos fue uno de los primeros aspectos de la química de los radicales libres que se estudió con detalle (Gutteridge, 1986).

Remontándonos a 1820, Saussure ya observó que la grasa tenía una gran propensión a reaccionar con el oxígeno, ya que en presencia de este gas, el aceite de nuez cambiaba repentinamente su apariencia física (Miquel, 1989).

Por la misma época, los primeros intentos en el campo de la anestesia clínica provocaron un cuadro patológico serio que se asoció a la liberación de radicales libres en órganos humanos *in vivo* por la utilización del cloroformo y del tetracloruro de carbono. Se observó que ambos gases podían inducir una marcada ictericia y atrofia del hígado. Este interesante fenómeno condujo a numerosas hipótesis, y así, Gallagher (1961) mostró que algunos antioxidantes sintéticos (BHT, propil galato) o naturales (α -tocoferol) podían contrarrestar la toxicidad de esos compuestos químicos orgánicos. Como consecuencia, se

propuso que la acción tóxica de los anestésicos era debida a la formación de peróxidos. En 1945, se observó que los peróxidos lipídicos se originaban en la grasa corporal de animales deficientes en vitamina E (Machlin, 1963). También se determinó una acumulación similar de peróxidos en el tejido adiposo que circunda las venas dañadas, y en la aorta ateromatosa (Meydani, 1992). Al mismo tiempo, se demostró que los peróxidos lipídicos aparecían en la piel por exposición a agentes físicos como la radiación X y UV, y se llegó a la conclusión de que aquellas sustancias estaban implicadas finalmente en la inflamación de tejidos (Miquel, 1989).

A partir de todas estas observaciones, se pudo mostrar que la unión hierro proteína (en hemoglobina y otros pigmentos hemáticos) juega un papel estimulante en la génesis de lipoperóxidos, lo que explica la presencia de estos compuestos incluso en la sangre y en tejidos del hombre y del animal sano. Además, se formaban lipoperóxidos *in vivo* en el cerebro de animales expuestos a hiperoxia (Gerschman, 1958; Taylor, 1958), especialmente en el cortex, y la mitocondria estaba implicada en la génesis de aquellos productos (Tappel, 1959; 1973).

La peroxidación lipídica está relacionada con las funciones fisiológicas, *turnover*, y patología de numerosos orgánulos celulares, incluyendo los peroxisomas, los lisosomas, el retículo endoplásmico y la mitocondria. Los peróxidos lipídicos pueden estar relacionados con los procesos controlados enzimáticamente del tipo lipooxigenasa, que tienen gran interés en relación a la síntesis de prostaglandinas (Southorn, 1988a; Halliwell, 1991).

Por otro lado, la peroxidación lipídica puede también causar daño genético debido a reacciones de enlaces cruzados, produciendo malondialdehído con los grupos amino del DNA. Esto podría conducir no sólo a daño nuclear-genético y cancerígeno (Slater, 1984; Ames, 1993) sino también a mutación o pérdida del genoma mitocondrial, pérdida de mitocondrias, y envejecimiento de células post-mitóticas (Miquel, 1984).

Otro punto de ataque de la peroxidación lipídica, son los fosfolípidos de membranas celulares, que por su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, son "quizá las moléculas más inestables del mundo orgánico". Las membranas biológicas contienen catalizadores activos para la oxidación de ácidos grasos, como hemoproteínas y complejos de hierro no hemo, complejos de cobre, y complejos de manganeso. Estos promueven alteraciones causadas por radicales libres, como cambios en la permeabilidad y fluidez, inactivación enzimática e incluso interferencia con la división celular. Vladimirov (1980), sugiere que las membranas celulares de células primitivas se originaron en atmósferas reductoras y, en el último estado de la evolución, las células desarrollaron sistemas especializados para proteger sus membranas contra la oxidación. Las células pueden incluso haber "aprendido", como una ventaja, la tendencia de los ácidos grasos a sufrir peroxidación con el fin de controlar la composición y propiedades de la membrana.

Las membranas mitocondriales pueden ser especialmente vulnerables a radicales de

oxígeno, ya que aproximadamente el 90% del O_2 utilizado por los mamíferos es procesado en la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial interna (Miquel, 1980). Y así, se ha comprobado que mitocondrias aisladas se desorganizan cuando sufren peroxidación lipídica catalizada por hemoproteína y, como consecuencia, se han encontrado peróxidos en las membranas mitocondriales. Este hallazgo condujo a Lehninger y Beck (1967) a postular que las reacciones peroxidativas estaban implicadas en el proceso normal de inflamación y lisis de la mitocondria, que es inhibido por la CAT y puede contribuir significativamente a la génesis de desechos de membranas peroxidadas (pigmento lipofuscina) en células "viejas" y dañadas.

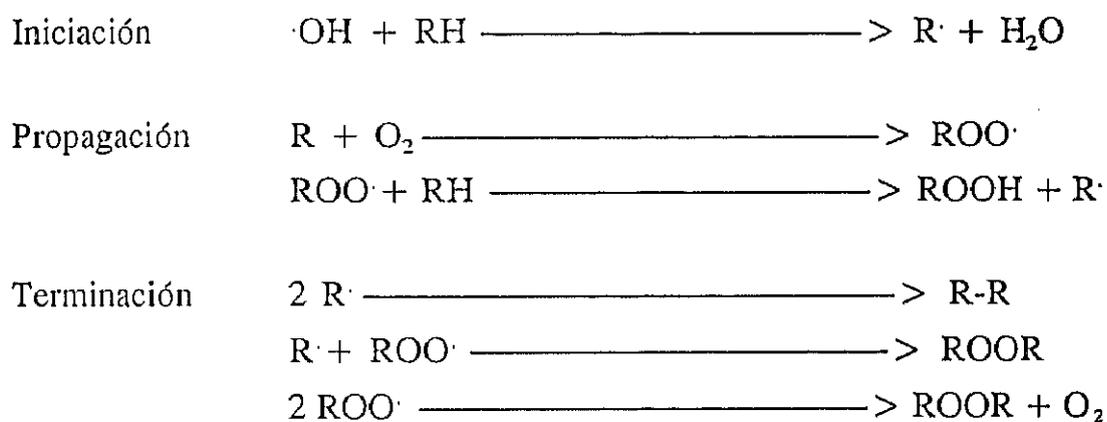
La peroxidación lipídica, es quizá, desde el punto de vista de la toxicidad aguda, el proceso de peroxidación de macromoléculas más importante. Sin embargo, hoy día también se sabe que se producen ataques similares, por parte de radicales libres, a proteínas o ácidos nucleicos (Dean, 1991; Chung, 1992; Ames, 1993; Yu, 1994). Los productos de estas peroxidaciones se acumulan en proporciones menores. A pesar de ello, estos procesos pueden ser de extrema importancia por el carácter cualitativo del daño o por la mayor dificultad de reparación del mismo, como ocurre en el caso del DNA. Las proteínas pueden ser atacadas incluso a nivel de estructura primaria (Yu, 1994).

2.3.1. Mecanismo de peroxidación lipídica

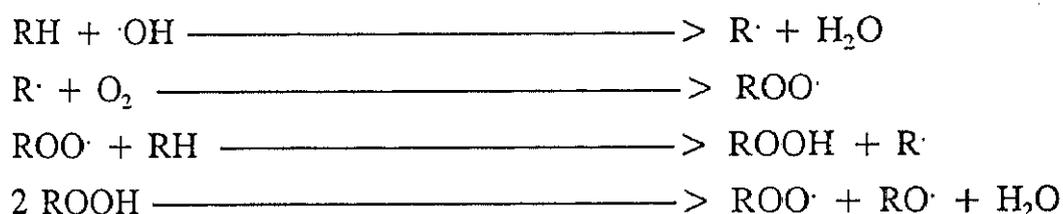
Los ácidos grasos poliinsaturados son normalmente metabolizados en la membrana interna de la mitocondria de la célula a unidades de acetil coenzima A, mediante la β -oxidación. Es un proceso enzimático esencial, controlado, para la vida aerobia. Sin embargo, también puede darse un proceso no controlado de destrucción de ácidos grasos poliinsaturados en los organismos aerobios, mediante reacciones de radicales libres (Basaga, 1990). **La vulnerabilidad de los ácidos grasos poliinsaturados, cuya concentración es elevada en las membranas de las células aeróbicas, podría ser una explicación al porqué estas células tienen que envejecer y finalmente morir.** Solamente las células que se reproducen a velocidad elevada, como las células cancerígenas, evitan la suerte de la degradación, el envejecimiento, y la muerte (Southorn, 1988a; Halliwell, 1991).

Generalmente, este proceso degenerativo de peroxidación lipídica tiene lugar en tres etapas: **iniciación, propagación, y terminación** (Esq. 1)(Esq. 2) (Southorn, 1988a; Yu, 1994). La iniciación consiste en la extracción de un electrón de un carbono contiguo a un doble enlace del ácido graso por parte de un iniciador como el radical hidroxilo $\cdot OH$. Esto hace de los ácidos grasos poliinsaturados las sustancias más sensibles y vulnerables al ataque por radicales libres. Se forma así un radical alquilo ($R\cdot$) que se convierte en peroxilo ($ROO\cdot$) por adición de oxígeno y que en varias reacciones, como su reducción a hidroperóxido ($ROOH$),

puede dar lugar a propagación de la peroxidación al generar otro radical R[·] en el ácido graso contiguo en la membrana. La propagación explica el carácter de reacción en cadena de la peroxidación lipídica, mediante la cual una única iniciación puede dar lugar a daño en gran número de moléculas. El proceso termina por la reacción de radicales contiguos R[·], dando lugar a puentes cruzados (R-R), o mediante la ruptura y destrucción de la molécula de ácido graso para formar etano, pentano y otros residuos encontrados en pigmentos viejos (Southorn, 1988a; Ivy, 1991). Esos residuos están compuestos de mezclas de fragmentos aldehídicos (malondialdehído: el marcador más ampliamente utilizado), bases de Schiff y otros productos fluorescentes insolubles (Miquel, 1974; 1978b).



Esquema 1. Autoxidación de ácidos grasos poliinsaturados.



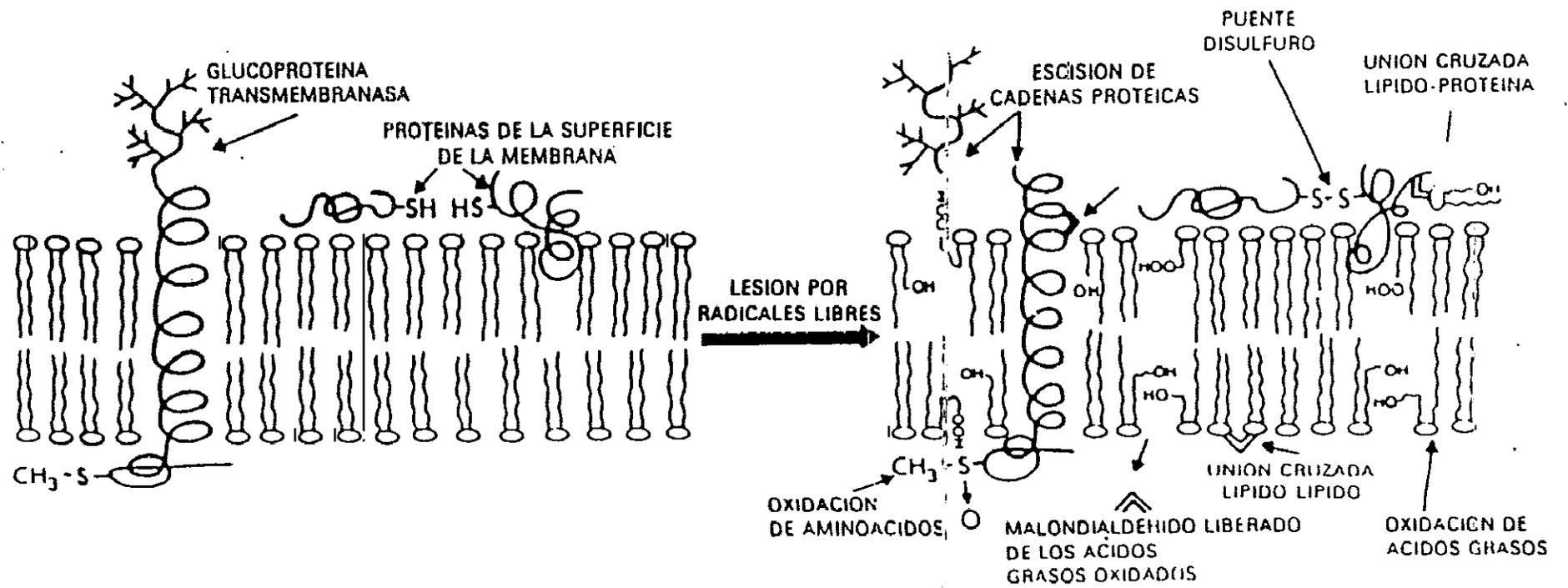
Esquema 2. Reacciones secundarias de iniciación.

2.3.2. Productos de la peroxidación lipídica

El producto primario de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados es la lipofuscina (Miquel, 1974; 1978b; 1989). Morfológicamente, los lisosomas de una célula digieren ácidos grasos poliinsaturados de membranas dañadas mediante un proceso llamado autofagocitosis. Este proceso utiliza la digestión y la degradación mediante enzimas hidrolíticas que granulizan todos los productos de desecho en una vacuola lisosomal cerrada. El desecho resultante en los gránulos finales constituye el pigmento que llamamos lipofuscina, y que se acumula progresivamente durante la vida de un organismo aerobio. Dicho pigmento ha sido estudiado en diferentes especies, comprobándose, por ejemplo, que en el perro se acumula a una velocidad 5.5 veces mayor que en el hombre, aproximadamente. Este interesante hecho se correlaciona con la vida media, 5.5 veces mayor la del hombre respecto del perro. Además, la acumulación de lipofuscina en el hombre se corresponde con una disminución del tamaño del cerebro, corazón, hígado, riñones, nódulos linfáticos, músculos esqueléticos, y vértebras, con el avance de la edad. Por ejemplo, el cerebro del hombre adulto joven con un peso medio de 1555 g, puede disminuir en tamaño a 1000 g, o incluso menos, en un hombre de edad avanzada. Las células de este cerebro senescente pueden contener por encima de un 30 % de lipofuscina. Este cerebro senescente es muy olvidadizo e incapaz de memorizar nueva información o reaccionar rápidamente a estímulos externos (Miquel, 1989).

2.3.3. Toxicidad y daño

Los peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados y otros productos de degradación, son extremadamente tóxicos y dañinos para los sistemas de vida. Destruyen la integridad de la membrana y disminuyen la fluidez y elasticidad de la misma (Slater, 1984) (Fig. 1). Se sabe que están implicados en la aterosclerosis y enfermedades del ventrículo, úlceras pépticas, dificultades gastrointestinales, tumores gástricos, el cáncer (Halliwell, 1991; Ames, 1993; Yu, 1994). También se ha demostrado recientemente, que juegan un papel universal en el envejecimiento del ojo, por ejemplo, opacidad del cristalino, permeabilidad, y formación de cataratas. Asimismo, se ha hecho evidente que destruyen el DNA (Fleming, 1982), incrementan la lipofuscina en el sistema nervioso central (Santavuori, 1984), y deprimen la función de éste mediante un incremento de la actividad monoamino oxidasa. Dichos peróxidos, además, están relacionados con la degeneración nerviosa, pérdida de neuronas, enfermedad de Batten y amiloidosis (Harman, 1981), placas seniles en la enfermedad de Alzheimer, necrosis del hígado, hepatitis, cirrosis, tuberculosis, ateroma hemorrágico, y cambios hepáticos y renales inducidos por drogas analgésicas (Southorn, 1988b; Ames, 1993).



3. ANTIOXIDANTES

El estudio de antioxidantes fue estimulado, en gran parte, por el uso industrial de estas sustancias en la preservación de alimentos (Branen, 1975), ya que previenen la rancidificación que implica la producción de lipoperóxidos. Esta investigación industrial condujo al descubrimiento de que los alimentos que contienen grasas eran naturalmente protegidos por un antioxidante efectivo, llamado vitamina E o α -tocoferol, que también se encontró en tejidos animales (Taylor, 1958; Tappel, 1959). Se vio además, que la defensa antioxidante proporcionada por el tocoferol en la fase lipídica de la célula, era complementada en la fase acuosa de la misma por los tres antioxidantes principales hidrosolubles: vitamina C, ácido úrico, y glutatión (Ames, 1981).

El descubrimiento de los "peroxisomas", ciertos microcuerpos relativamente abundantes en hígado y células de riñón y que contienen CAT, permitió conocer el mecanismo de detoxificación de peróxidos (Miquel, 1989).

La identificación de las enzimas SOD por McCord y Fridovich (1969), ha sido de gran trascendencia para la comprensión de los mecanismos antioxidantes. Estas enzimas eliminan el radical superóxido, previniendo su acción tóxica (Halliwell, 1991).

Atendiendo a la teoría de los radicales libres, se podría predecir que la administración de antioxidantes a poblaciones de animales podría alargar la vida media de éstas (Harman, 1961; 1968; 1969; Hill, 1963; Oldfield, 1963; Comfort, 1971). Se ha observado, por ejemplo, que la administración de ácido tiazolidín carboxílico, un precursor de la cisteína, alarga la vida de la *Drosophila* (Miquel, 1979a).

Se vislumbra que la bioquímica moderna contribuirá en gran manera a resolver algunos problemas clínicos originados por los efectos nocivos de los radicales libres sobre la biología humana, y se podrán conocer con precisión las sustancias antioxidantes que combatirán radicales libres específicos y en lugares precisos, responsables del envejecimiento y de determinadas enfermedades humanas.

A continuación exponemos los principales sistemas de defensa celular frente al estrés oxidativo, así como otros compuestos de síntesis y de origen natural que pueden emplearse en la terapia antioxidante.

- 3.1. Sistemas de protección celular frente a la peroxidación.
- 3.2. Antioxidantes de síntesis.
- 3.3. Antioxidantes de origen natural.

3.1. Sistemas de protección celular frente a la peroxidación

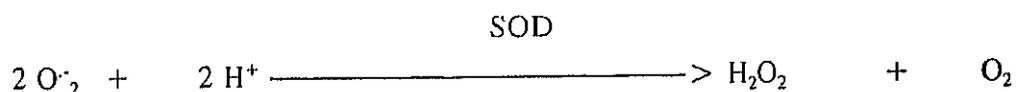
Los organismos aerobios han desarrollado un sistema protector, altamente eficaz, contra peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados y otros precursores de oxígeno activo (Southorn, 1988a). Este sistema de defensa está constituido por antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos (Halliwell, 1991; Yu, 1994). Por lo tanto, la vida aerobia sólo ha sido posible gracias a la aparición muy temprana en la evolución de estos sistemas detoxificantes. En los aerobios superiores, las líneas de defensa frente al oxígeno activo, son complejas y aparecen compartimentalizadas (Alvira, 1988a; 1988b).

a) Antioxidantes enzimáticos

Sólo existen enzimas detoxificantes para el radical anión superóxido y para el peróxido de hidrógeno. Por tanto, el modo de evitar la formación de radical hidroxilo consistirá en eliminar esas dos especies activas (Alvira, 1988a; Yu, 1994).

Superóxido dismutasa (SOD)

Gracias a las investigaciones de I. Fridovich (1969) se ha descubierto que las células aeróbicas contienen el enzima superóxido dismutasa, que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y en oxígeno molecular (Halliwell, 1991):



La SOD se encuentra en dos formas; en el citosol (extramitocondrial), y en la mitocondria. Estas enzimas se hallan presentes en concentración elevada, y son extraordinariamente activas, sugiriendo que los radicales superóxido que se están produciendo continuamente durante la reducción enzimática del oxígeno, por parte de diversos enzimas y sistemas enzimáticos, son rápidamente eliminados (Marklund, 1984).

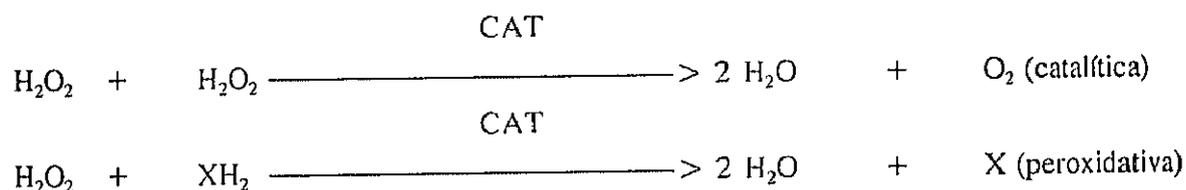
Se han descrito tres tipos de isoenzimas (Yu, 1994). La CuZnSOD, conocida previamente como "eritrocupreína" (Mccord, 1969), fue la primera que se describió. Su peso molecular es de 33 kDa, es un dímero y contiene dos átomos de Cu (el átomo de Cu es el que realiza directamente la dismutación) y dos de Zn, y se ha encontrado en el citosol de todas las células de mamíferos, así como en el espacio intermembranal en la mitocondria. La MnSOD

es una proteína tetramérica que contiene de dos a cuatro átomos de Mn (el átomo de Mn realiza la dismutación), y tiene un peso molecular de 85 kDa. Se ha encontrado en la matriz mitocondrial y también en el citosol en primates. La tercera isoenzima, la EC-SOD, es una glicoproteína tetramérica que contiene cuatro átomos de Zn. Es la principal SOD de los fluidos extracelulares de todos los mamíferos, pero también se puede encontrar en tejidos. Su distribución subcelular es desconocida. Se piensa que puede tener especial relevancia en el control de las reacciones inflamatorias (Marklund, 1984; Halliwell, 1991; Meléndez, 1993).

Catalasa (CAT)

La catalasa se encuentra en los microcuerpos de las células animales, también llamados peroxisomas (por ejemplo en la rata), orgánulos oxidativos especializados. En otras especies se ha demostrado que abunda también en el citosol. Su peso molecular es muy elevado, 240 kDa, y es una hemoenzima tetramérica en la que el átomo de hierro realiza el intercambio redox (Southorn, 1988a; Yu, 1994).

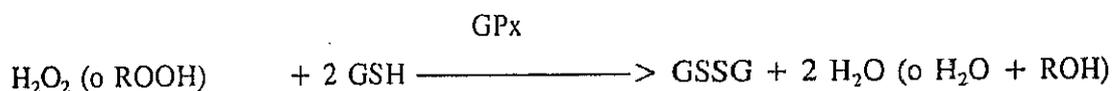
El peróxido de hidrógeno formado por la superóxido dismutasa y por las oxidasas flavino-dependientes, se descompone por la catalasa, enzima que cataliza dos tipos de reacciones:



En la segunda reacción el enzima actúa como peroxidasa, necesitando la presencia de un agente reductor (XH, por ejemplo: etanol) para eliminar el peróxido de hidrógeno. Esta enzima tiene una K_m y una V_{max} muy elevadas por el peróxido de hidrógeno. Por ello, en principio parece la más adecuada para eliminar el peróxido de hidrógeno celular cuando su concentración se presenta elevada (Southorn, 1988a; Alvira, 1988a).

Glutation peroxidasas (GPx)

Las glutatión peroxidasas son enzimas celulares que catalizan la descomposición de hidroperóxidos (ROOH) reduciéndolos a formas estables, hidróxidos (ROH), utilizando específicamente el glutatión (GSH) como reductor (dador de electrones) (Southorn, 1988a; Yu, 1994).

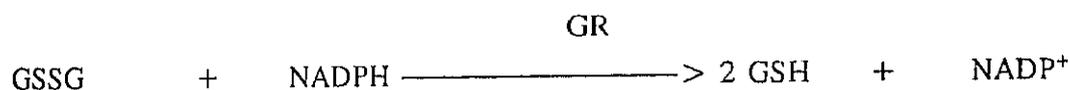


Existen dos formas básicas del enzima, dependiente (GPx-Se) y no dependiente de selenio (GPx-no-Se), respectivamente. En la primera, el selenio es esencial para su actividad y controla la síntesis de la proteína, que es tetramérica y tiene un peso molecular de 76 kDa. Descompone tanto hidroperóxidos orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H₂O₂). La otra forma no contiene selenio, tiene un peso molecular menor, es dimérica (al menos en alguna de sus formas) y sólo es capaz de eliminar hidroperóxidos orgánicos. Esta última actividad enzimática es atribuida, al menos en los mamíferos, a algunas formas (no todas) enzimáticas de las glutatión transferasas (que intervienen en la detoxificación de xenobióticos). Las glutatión peroxidadas están presentes en el citosol y en las mitocondrias (en este caso, GPx-Se principalmente). Poseen una K_m y una V_{máx} bajas por el peróxido de hidrógeno, siendo por ello enzimas idóneas en la eliminación de pequeñas concentraciones de H₂O₂. No tiene actividad en la fracción lipídica, por tanto, eliminan los hidroperóxidos lipídicos (ROOH), reduciéndolos a sus formas estables (ROH), sólo tras la liberación previa del ácido graso peroxidado desde la membrana al citosol por medio de una fosfolipasa A₂. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado otra glutatión peroxidasa dependiente de selenio, que tendría actividad directamente en la fracción lipídica (Alvira, 1988a; Southorn, 1988a; Yu, 1994).

Glutatión reductasa (GR)

Está presente en el citosol y en las mitocondrias. Es de vital importancia para la eliminación del peróxido de hidrógeno por medio de la glutatión peroxidasa, y para la reconstitución del glutatión oxidado no enzimáticamente, ya que el *pool* de glutatión reducido (GSH) es limitado y la elevación de la tasa GSSG/GSH es altamente tóxica para la célula (Southorn, 1988a; Yu, 1994).

Cataliza la reacción:



Es esencial la unión del cofactor FAD (flavín-adenín-dinucleótido) al enzima, ya que la glutatión reductasa actúa como coenzima. Puesto que la glutatión reductasa precisa a su vez de NADPH como fuente de equivalentes de reducción, se suelen considerar, a veces, a las

enzimas de la vía de las pentosas, G6PDH y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (productoras citosólicas de NADPH), como una segunda línea de defensa antioxidante (Yu, 1994).

b) Antioxidantes no enzimáticos

Se ha descrito un gran número de sustancias presentes en el organismo con capacidad antioxidante. Esta actividad, sin embargo, en muchos casos no se manifiesta porque las concentraciones necesarias de dichas sustancias no se ajustan a las presentes en los tejidos, o porque se ha demostrado *in vitro* pero no *in vivo*. Por tanto, destacaremos exclusivamente aquellos antioxidantes de bajo peso molecular cuya actividad *in vivo* está mejor establecida (Alvira, 1988b; Yu, 1994).

Desde el punto de vista de la protección frente a la peroxidación lipídica de las membranas, es preciso distinguir a los antioxidantes hidrosolubles (carecen de acceso a las zonas profundas de la membrana) de los liposolubles.

b.1) Antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles

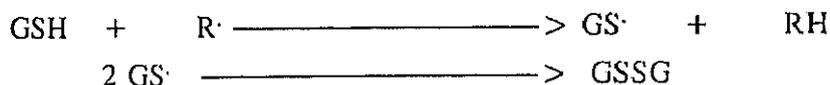
Glutation

El tripéptido glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina) es el principal tiol libre en la mayoría de las células, y participa en diversos procesos biológicos (Akerboom, 1981) tales como detoxificación de xenobióticos, eliminación de hidroperóxidos, protección contra los efectos de la radiación ionizante, mantenimiento del *status* sulfhidrilo de proteínas (protege de la oxidación a grupos -SH esenciales de las proteínas), y modulación enzimática mediante intercambio disulfuro (Halliwell, 1991).

Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiólico de su cisteína. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzimáticas (como la de la glutatión peroxidasa) o no enzimáticas (Akerboom, 1981).

En las células, la oxidación del glutatión (GSH) conduce a la formación de glutatión oxidado o disulfuro (GSSG) y, por intercambio disulfuro catalizado por tiol transferasas, el glutatión puede ser incorporado a disulfuros mixtos (GSSR) (Akerboom, 1981).

El glutatión también puede reaccionar con radicales libres (Halliwell, 1990):



Podría eliminar, por tanto, tanto radicales orgánicos como radicales superóxido e hidroxilo. El resultado es siempre la aparición de glutatión oxidado (GSSG), sustancia altamente tóxica para las células, motivo por el cual éstas mantiene siempre una razón GSSG/GSH enormemente baja (hasta 0.01 o incluso menor, mediante la reducción efectiva del GSSG por la glutatión reductasa, o por el transporte activo del mismo a través de la membrana). **La medida de dicha tasa es uno de los estimadores más fiables del grado de estrés oxidativo tisular.** También se ha descrito la capacidad del glutatión (GSH) en reacciones de "extinción" del oxígeno singlete, devolviéndolo a su estado basal no reactivo, o triplete (Yu, 1994).

Glutatión y envejecimiento celular

En el ratón, por ejemplo, se ha comprobado que la concentración de GSH en eritrocitos disminuye con la edad de la célula y del animal (Abraham, 1978). En el ratón viejo (31 mes), el contenido de GSH es inferior al 30% en el hígado, 34% en el riñón, y 20% en el corazón, respecto a animales maduros (17 meses). La concentración de GSSG en tejidos no varía significativamente con la edad (López-Torres, 1993a).

Se ha comprobado que la actividad de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa declinan en el ratón viejo. La causa del descenso en los niveles de GSH es más bien una síntesis disminuida que una oxidación incrementada, ya que la actividad γ -glutamil cisteína sintetasa está reducida con el envejecimiento (Viña, 1989; Kurata, 1993).

Ya que el glutatión sirve para proteger a la célula (Richie, 1992) contra el poder deletéreo de los radicales libres derivados de oxígeno (Gerschman, 1955), el hecho de que la concentración de GSH en las células de animales viejos esté disminuida, puede ser importante como considera la teoría de los radicales libres de envejecimiento de Harman, cuyo desarrollo por Miquel (1984) ha dado lugar a la teoría de envejecimiento celular "daño mitocondrial por radicales de oxígeno".

Los aminoácidos que contienen grupos sulfuros, por actuar como precursores en la síntesis del GSH (Sastre, 1992), son efectivos en retardar la acumulación de lipofuscina. Se ha comprobado que la suplementación de GSH es también efectiva en retardar la acumulación de lipofuscina en cultivos de células gliales humanas. La efectividad de este tiol como antioxidante, reclama la importancia de los enzimas que utilizan GSH, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasas, en la protección de las células frente al daño oxidativo (Viña, 1989; Sastre, 1992).

Acido ascórbico

El ácido ascórbico (vitamina C) fue descubierto en 1928. En muy pocos animales, como el hombre o el cobaya, puede existir en tres estados redox: ascorbato (reducido), semidehidroascorbato (por la oxidación monoelectrónica del ascorbato), y dehidroascorbato (por la oxidación bielectrónica del ascorbato) (Lippman, 1989). Puede reducir radicales como superóxido e hidroxilo, y también extinguir oxígeno singlete. El dehidroascorbato puede ser reducido de nuevo a ascorbato a partir de equivalentes de reducción del NADH (mediante la catálisis de una NADH-dehidroascorbato reductasa) o del GSH (de forma directa o catalizada por una GSH-dehidroascorbato reductasa) (Halliwell, 1990; 1991; Yu, 1994).

El ácido ascórbico actúa en conexión con la transferrina, un antioxidante del plasma. Esta β -globulina asegura la fijación reversible del catión férrico y participa en su circulación en el plasma (Yu, 1994).

La vitamina C constituye un elemento esencial (Cutler, 1984) en el paso de catión férrico a la ferritina, que se encarga de almacenar los iones ferrosos en el hígado, bazo y médula ósea.

Tanto la vitamina C, como la vitamina E, están estrechamente relacionadas con la síntesis del hemo, que a su vez forma parte del sistema antioxidante de la catalasa, en cuyo grupo prostético se encuentra (Yu, 1994).

Acido úrico

Excelente antioxidante con capacidad de eliminar $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, oxígeno singlete, o radicales $ROO\cdot$. Incluso puede eliminar de la solución trazas de Fe_{2+} , que en caso de estar presente podría actuar como estimulador potente de procesos peroxidativos (Yu, 1994).

Siguiendo la teoría de los radicales libres como causa del envejecimiento, se ha sugerido que la gran longevidad de los primates y el hombre (Ames, 1981; Cutler, 1984), podría estar relacionada con la pérdida del enzima (uricasa) que degrada el ácido úrico, y el aumento notable de su concentración tisular durante la evolución.

Eliminación de iones metálicos

Para la formación de especies oxidantes se requiere la presencia de trazas de metales como el hierro (Fe^{2+}) o el cobre. Por tanto, se puede considerar como segunda línea de defensa antioxidante a cualquier compuesto que disminuya la concentración de dichos metales.

En este sentido, pueden comportarse como antioxidantes, la **transferrina** y la **ferritina** (por ligar hierro en plasma o tejidos) (Halliwell, 1991), los quelantes de iones metálicos, o proteínas que como la **ceruloplasmina** tienen actividad ferroxidasa (oxidan el Fe^{2+} a Fe^{3+}) (Thomas, 1989; Yu, 1994).

b.2) Antioxidantes no enzimáticos liposolubles

Vitamina E (α -tocoferol)

Parece ser el principal antioxidante de las membranas en las células animales, protegiendo a éstas frente a los daños por peroxidación de las capas de lípidos poliinsaturados (Tappel, 1959; Matsuo, 1992; Meydani, 1992; Yu, 1994). Su actividad suele atribuirse al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromano (Acker, 1993). Su solubilidad en la membrana le permite el acceso directo a grupos $ROO\cdot$, reduciéndolos a $ROOH$, que mediante la glutatión peroxidasa serían degradados hasta alcoholes:



Esta reacción es fundamental ya que impide que los radicales $ROO\cdot$ oxiden a otra molécula orgánica, es decir, evita la reacción de propagación (multiplicativa), que es la principal causante del daño peroxidativo.

Otro mecanismo posible es la reacción con radicales alcoxilo ($RO\cdot$), siendo de gran eficacia (limitando también la propagación) en caso de que la degradación de hidroperóxidos por medio de la glutatión peroxidasa, no hubiera sido totalmente eficaz:



En ambos casos, la vitamina E se convierte en radical tocoferilo ($VitEO\cdot$). Dado que el *pool* celular de vitamina E es pequeño, el sistema sólo es funcional si la forma reducida del tocoferol se regenera a la misma velocidad con la que se degrada. Se ha propuesto que esta función regeneradora podría corresponder al ascorbato, teniendo lugar la interacción en la interfase citosol-membrana, lo que plantearía la posibilidad de que ambas formas vitamínicas trabajen en *tandem* desde el punto de vista redox:



Además de sus propiedades antioxidantes, la vitamina E participa en la síntesis del hemo, que forma parte del grupo prostético de la catalasa (defensa antioxidante endógena que elimina hidroperóxidos).

Las experiencias realizadas con la vitamina E conducen a formular algunas conclusiones que se indican a continuación:

- Las deficiencias de α -tocoferol producen envejecimiento rápido del cerebro de algunos animales (ratones, ratas, etc.) con acúmulo de lipopigmentos en el mismo (Matsuo, 1992).
- La administración de dicha vitamina, provoca disminución del acúmulo de lipofuscina en el cerebro de dichos animales (Kruk, 1981).
- Ratas deficientes en vitamina E tienen un sistema nervioso central y pulmón más susceptible a elevadas presiones de oxígeno, que las tratadas con tocoferol (Taylor, 1958).
- La vitamina E inhibe la peroxidación lipídica mitocondrial del hígado de conejo (Tappel, 1959).

Vitamina A y β -carotenos

Los β -carotenos son precursores naturales de la vitamina A (Halliwell, 1991). Estos compuestos tienen gran capacidad para dar lugar a reacciones de extinción, como la del oxígeno singlete a oxígeno triplete (Chen, 1993). Debido a su concentración y a la generación de cantidades importantes de oxígeno singlete en 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. Sin embargo, el hecho de que la molécula de β -caroteno esté compuesta por dos moléculas de vitamina A, ha estimulado también, investigaciones sobre el posible papel antioxidante del retinol.

Kunert y Tappel estudiaron marcadores *in vivo* de la peroxidación lipídica (exhalación de pentano y etano) en cobayas deficientes en vitamina A, y comprobaron que al ser tratados con β -caroteno, disminuía la peroxidación lipídica inducida por tetracloruro de carbono (Yu, 1994).

Krinsky comprobó que las bacterias mutantes deficientes en β -carotenos eran mucho más sensibles a los daños oxidativos que las bacterias con altos contenidos en los mismos (Chen, 1993).

3.2. Antioxidantes de síntesis

Centrofenoxina

También llamado meclofenoxato (dimetilaminoetil 4-cloro-fenoxiacetato).

En terapia humana ha sido considerada como un estimulante metabólico cerebral (nootropo), pues estimula la síntesis de glucosa, el consumo de oxígeno, y la producción de dióxido de carbono (Zs.-Nagy, 1989).

Se ha puesto de manifiesto un aumento de la vida media significativo cuando se administra este compuesto a grupos de ratones, cobayas, ratas, y otros animales (Hochschild, 1973).

Roy observó un incremento en la actividad de la glutatión reductasa en el cerebro de ratas cuando éstas recibían centrofenoxina (Khanna, 1992).

Se sugiere que la centrofenoxina podría rejuvenecer las estructuras sinápticas de las células cerebrales en ratas viejas. Estudios clínicos han demostrado que puede invertir los trastornos psico-mentales, como confusión, astenia psicósomática y trastornos de la memoria y del intelecto (Dean, 1981).

Su posible mecanismo de acción reside en su capacidad *scavenger* de radicales hidroxilo que se puedan generar en las membranas de las células nerviosas cerebrales (Zs.-Nagy, 1989).

Compuestos fenólicos

2,3-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno (BHT), y 2,(3)-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA), presentan propiedades antioxidantes frente a los radicales libres (Cha, 1979; 1982; Sgaragli, 1993).

BHT y BHA son compuestos fenólicos (Branen, 1975) solubles en grasas, que fueron diseñados para evitar el enranciamiento y daño por peroxidación lipídica (Dormandy, 1969) en los alimentos, cosméticos y medicamentos.

Los antioxidantes fenólicos son un grupo de compuestos que protegen de compuestos electrófilos no sólo por interacción directa, rompiendo la cadena radicalaria, sino por inducción de enzimas detoxificadoras (Cha, 1982; Sharma, 1993), como glutatión-S-transferasa, quinona reductasa, epóxido hidrolasa, y UDP-glucuroniltransferasa. La inducción de estas enzimas por BHA y sus análogos en roedores es dependiente de la estructura del fenol, de las especies y estirpes de animales, del tipo de tejido animal, del sexo del animal,

y del enzima inducido. En el mecanismo de inducción enzimática por compuestos fenólicos, es fundamental que el fenol sufra con facilidad reacciones de oxidación-reducción (Cha, 1982).

Harman experimentó que la administración prolongada de BHT a ratones macho LAF (roedores con baja incidencia de tumores) alargaba la duración media de estos animales significativamente (Harman, 1961; 1968; 1969).

Etoxiquina

Compuesto de estructura quinolínic:

6-etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetil quinolina.

La etoxiquina es un potente antioxidante, cuyo uso como conservante de alimentos tiene gran profusión. Protege a los alimentos de la degradación de sus nutrientes (vitaminas, minerales y aminoácidos) durante el almacenaje. Parece ser que prolonga la vida media (Comfort, 1971) eficazmente en ciertos animales de laboratorio. Se comprobó que dosis elevadas de este conservante, administrado en la dieta de ratones LAF, aumentaba en un 74.4% la vida media de los mismos. Esta observación sobre la prolongación de la vida media en ratones, fue corroborada por Comfort (1971).

3.3. Antioxidantes de origen natural

Desferrioxamina

Aislado a partir de *Streptomyces pilosus*. Su fórmula estructural es la siguiente: 1-amino-6,17-dihidroxi-7,10,18,21-tetraoxo-27-(N-acetilhidroxilamino)-6,11,17,22-tetraazaheptaecosano.

Presenta capacidad quelante de hierro y habilidad *scavenger* de radicales libres (Morel, 1992; Soriani, 1993). Existe una relación entre ambas propiedades, con una gran importancia en la aplicación clínica en el daño hepatocelular y fibrosis por un acúmulo excesivo de hierro en los hepatocitos. La agresión hepática, que se ha puesto de manifiesto en cultivos de hepatocitos, se ha relacionado con el inicio de la peroxidación lipídica catalizada por el hierro (Halliwell, 1991; Rice-Evans, 1993).

Flavonoides

Constituyen un amplio grupo de sustancias naturales, muy abundantes en el reino vegetal, cuya estructura común está constituida por el anillo benzo γ -pirona (Harborne, 1980).

Muchos flavonoides son antioxidantes para el ácido ascórbico, por quelación de metales que se encuentran en la mezcla de reacción. Esta quelación es dependiente primariamente de los grupos 3-hidroxi-4-carbonil y 3', 4'-dihidroxi (Mcclure, 1975).

Se investigaron los efectos antioxidantes de varios flavonoides en la carne de vaca y en la manteca de cerdo. Tanto quercetina como miricetina, y sus 3-glucósidos, fueron significativamente efectivos antioxidantes a concentraciones comprendidas entre 0.4 y 2.5 x 10⁻⁵ M (Harborne, 1980). Los efectos antioxidantes (Rfos, 1992) se atribuyeron a la quelación de iones metálicos y al carácter aceptor de radicales libres. Quercetina es un efectivo antioxidante de ésteres metilo de ácidos grasos de aceite de girasol o de aceite de linaza. La metilación de quercetina en las posiciones 3- ó 5- reduce ligeramente su efectividad, mientras que la metilación en las posiciones 3' ó 4' disminuye drásticamente su capacidad antioxidante. A partir de estudios histológicos y la coincidencia de encontrarse en el mismo tejido, Van Fleet sugiere que la principal función de flavonoides en las especies vegetales, es la de antioxidante de lípidos y poliacetilenos de sus tejidos (Harborne, 1980).

La actividad *scavenger* (Robak, 1988; Laughton, 1989; Huguet, 1990; Mora, 1990; Cotellet, 1992; Rfos, 1992) de radicales derivados de oxígeno, ha sido demostrada *in vitro* para un grupo numeroso de flavonoides y otros compuestos fenólicos. La presencia de grupos fenólicos en posición 3 ó 5 y la función ceto en la posición 4 son factores determinantes para la actividad anti-radicalaria, viéndose incrementada por la presencia de múltiples funciones fenólicas en la molécula flavónica, y disminuida por la glicosilación. Dicha propiedad anti-radicalaria podría justificar, al menos en parte, sus efectos antiinflamatorios (Villar, 1984; 1987; Alcaraz, 1989), puesto que pueden prevenir los efectos deletéreos de las interacciones de radicales libres con los tejidos durante el proceso de inflamación. Así, compuestos fenólicos podrían proteger contra la peroxidación lipídica de membranas celulares y de orgánulos (Mora, 1990; Morel, 1993), liberación de enzimas lisosomales, factores quimiotácticos, y componentes de tejido alterado que perpetúan la condición inflamatoria, así como proteger contra la acción despolimerizante de radicales libres sobre el ácido hialurónico del fluido sinovial.

Aunque este grupo de sustancias no pueden considerarse como auténticos factores vitamínicos P por no haberse demostrado aún un estado carencial específico, no puede dudarse, sin embargo, de sus acciones farmacológicas a nivel de la permeabilidad y resistencia capilar. Fue demostrado un efecto sinérgico con la vitamina C en el escorbuto (Harborne, 1980).

Ácidos fenólicos

Diversos ácidos fenólicos han sido descritos como inhibidores de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos. Muchos de ellos ejercen efectos protectores en modelos de hepatotoxicidad inducida por xenobióticos y mediados por radicales libres (Wagner, 1986a; Joyeux, 1990; Payá, 1993b).

En el estudio de la relación estructura-actividad se ha comprobado la importancia de la sustitución pirogalol en los derivados del ácido benzoico (ácido gálico y ácido elágico). La sustitución orto-hidroxi confiere actividad *scavenger* a los derivados del ácido cinámico, ácido cafeico y ácido clorogénico (Montesinos, 1991).

4. CUMARINAS

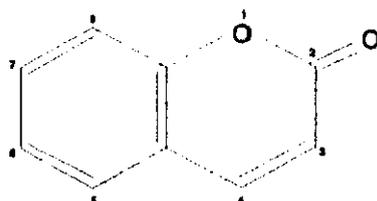
4.1. Cumarinas: grupo farmacológico seleccionado

El estrés oxidativo, en particular, su manifestación más clara, peroxidación lipídica mediada por radicales libres, puede ser la causa de muchos procesos degenerativos (Halliwell, 1991). En tales situaciones, el desarrollo de patologías también es debido a una deficiencia en los sistemas defensivos antioxidantes del organismo. El uso de **agentes terapéuticos que activen el sistema protector antioxidante intrínseco o compensen sus insuficiencias** puede ser un acierto en esta línea. La mayoría de las sustancias deseables en el uso de la práctica clínica son **compuestos naturales**, y es lógica, por tanto, la búsqueda de agentes activos, farmacológicamente, entre los componentes minoritarios de la dieta, que posean propiedades de antioxidantes (Vladimirov, 1991; Ames, 1993).

En el desarrollo de la **Farmacología de productos naturales**, se ha comprobado que **diversos compuestos fenólicos** (flavonoides y ácidos fenólicos) poseen actividad hepatoprotectora en modelos de intoxicación por xenobióticos (tetracloruro de carbono, bromobenceno), mediados por radicales libres (Joyeux, 1990; Payá, 1993b). Muchas de las propiedades biológicas de estos compuestos han sido relacionadas con su capacidad antioxidante (Larson, 1988). También inhiben la peroxidación lipídica *in vitro* (Laughton, 1989; Mora, 1990; Cholbi, 1991; Ríos, 1992) y pueden actuar como "captadores" de radicales libres (Robak, 1988; Huguet, 1990; Sichel, 1991; Cotelle, 1992).

Siguiendo esta línea, pretendemos, por tanto, impulsar el estudio de las **cumarinas** como agentes innovadores del grupo de compuestos fenólicos con actividad anti-radicalaria y antiperoxidativa.

Las **CUMARINAS** constituyen una amplia clase de sustancias benzo(α)pirona-fenólicas (más de mil compuestos descritos) ampliamente distribuidas en la naturaleza. Aunque algunas de ellas son tóxicas para los mamíferos, como las aflatoxinas, y se ha descrito fototoxicidad y fotomutagenicidad para las furanocumarinas, sin embargo, las **cumarinas simples son menos tóxicas y presentan un amplio rango de acción farmacológica** (Murray, 1982). En estas centraremos nuestro estudio.

Estructura química de las cumarinas evaluadas *in vitro*

| | Compuesto | Sustituyentes | | | | |
|----|---------------------------------------|-----------------|----------------------|------------------|----------------------------------|-----------------|
| | | 3 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 1 | Fraxetina | - | - | OCH ₃ | OH | OH |
| 2 | Esculetina | - | - | OH | OH | - |
| 3 | 4-metilesculetina | - | CH ₃ | OH | OH | - |
| 4 | 4-metildafnetina | - | CH ₃ | - | OH | OH |
| 5 | Esculina | - | - | OGlu | OH | - |
| 6 | Umbeliferona | - | - | - | OH | - |
| 7 | 4-metilumbeliferona | - | CH ₃ | - | OH | - |
| 8 | Escopoletina | - | - | OCH ₃ | OH | - |
| 9 | Acido 7-hidroxicumarin-4-acético | - | CH ₂ COOH | - | OH | - |
| 10 | 7-metoxicumarina | - | - | - | OCH ₃ | - |
| 11 | 4-hidroxicumarina | - | OH | - | - | - |
| 12 | 6,7-dimetoxicumarina | - | - | OCH ₃ | OCH ₃ | - |
| 13 | Acido cumarin-3-carboxílico | COOH | - | - | - | - |
| 14 | 7-metilcumarina | - | - | - | CH ₃ | - |
| 15 | 6-metilcumarina | - | - | CH ₃ | - | - |
| 16 | 7-OH-3,4,8-trimetilcumarina | CH ₃ | CH ₃ | - | OH | CH ₃ |
| 17 | 7-amino-4-metilcumarina | - | CH ₃ | - | NH ₂ | - |
| 18 | 7-dimetilamin-4-metilcumarina | - | CH ₃ | - | N(CH ₂) ₂ | - |
| 19 | 7-dimetilaminociclopent a(c)-cumarina | Ciclopentano | - | - | N(CH ₂) ₂ | - |

4.2. Cumarinas: antioxidantes fenólicos

Las cumarinas constituyen un grupo muy extenso de antioxidantes fenólicos naturales (Murray, 1982).

Químicamente, las cumarinas son compuestos heterocíclicos oxigenados derivados de la α -pirona. Son benzo(b) 2-piranonas. Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, como constituyentes de muchas plantas y aceites esenciales, en las familias *Leguminosae*, *Compositae*, y sobre todo, *Umbelliferae* y *Rutaceae* (Bruneton, 1991; Juichi, 1991; Niwa, 1991).

La simple estructura de estos compuestos y la facilidad de modificación química, hace posible la conversión en otros tipos de antioxidantes. Así, por ejemplo, las propiedades antioxidantes de cumarinas 3-heterosustituidas han sido determinadas por su **estructura análoga con dehidroalanina**. Del mismo modo, cumarinas 3,4-diheterosustituidas son **análogos estructurales del ácido ascórbico**. Dicha analogía puede explicar el mecanismo de acción antioxidante de estos compuestos (Halliwell, 1990; Vladimirov, 1991).

Sobre la función neutrofílica, **esculetina (6,7-dihidroxicumarina)**, **reduce efectivamente la producción de radicales de oxígeno por neutrófilos** activados por diversos estímulos, mediante la inhibición de la actividad NADPH oxidasa de la membrana de neutrófilos aislados (Ozaki, 1986) (el complejo NADPH oxidasa es un enzima clave en la producción de radicales de oxígeno por los neutrófilos, y la inhibición de este enzima por un agente podría resultar en una disminución en el índice de producción de radicales de oxígeno por las células en los tejidos).

La **fraxetina (7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina)** se ha mostrado como un **potente inhibidor de la generación de radical superóxido en leucocitos polimorfonucleares (PMN)** peritoneales activados de rata (Payá, 1994a). Cuando los neutrófilos son activados, se produce un marcado incremento en la recaptación de oxígeno, con la conversión por parte del sistema oxidativo enzimático en productos microbicidas como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, con efectos destructivos para los componentes celulares. Al mismo tiempo, la activación de los neutrófilos conduce a la liberación de enzimas granulares y a la síntesis de mediadores de la inflamación, contribuyendo así al daño tisular. Los radicales superóxido, en este proceso aumentan la permeabilidad vascular y la adhesión de los PMN al endotelio, y estimulan la agregación plaquetaria. A este respecto, parece ser que la inhibición de la producción de superóxido por PMN podría contribuir a los efectos vasoprotectores de las cumarinas simples.

También se ha ensayado la **fraxetina** para comprobar su capacidad "captadora" de anión superóxido generado por leucocitos polimorfonucleares humanos activados (Payá, 1994a). La inhibición que ejerce fraxetina en la reducción del ferricitocromo c por el anión superóxido, es debida a su capacidad de atrapar dicho radical (al modo en que lo hace la SOD) más que en evitar su formación. Y así, esto se ha demostrado, utilizando un electrodo de oxígeno para probar los efectos de la fraxetina en el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria de neutrófilos PMN humanos activados. Se vio que dicha cumarina **no ejercía influencia en el aumento del consumo de oxígeno** después de estimular las células, y así se demostraba que **no inhibía la NADPH oxidasa**. Las acciones inhibitorias de la fraxetina en el anión superóxido no son debidas a acciones tóxicas en las células, ya que en el ensayo no se produce liberación del marcador citosólico lactato deshidrogenasa (LDH).

En un estudio comparativo, sobre los efectos de varias cumarinas en la formación de productos de 5-lipoxigenasa (5-HETE, 5-hidroxi-eicosatetraenoico) y ciclooxigenasa (HHT, 7-carbono hidroxiaácido) de leucocitos PMN de conejo, se observó que **esculetina, dafnetina (7,8-dihidroxicumarina), fraxetina, umbeliferona (7-hidroxicumarina), escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina), esculina (7-hidroxi-6-O-glucosil-cumarina) y fraxina (7-hidroxi-6-metoxi-8-O-glucosilcumarina)** inhibieron la formación de 5-HETE, mientras que estimularon la producción de HHT (Kimura, 1985). La síntesis de prostaglandina E₂ vía ciclooxigenasa parece ser que es incrementada o favorecida por algunos *scavengers* de radicales libres, probablemente debido a la inhibición de la actividad enzimática por la inactivación de los radicales de oxígeno generados. Así, los efectos estimulantes de estas cumarinas sobre la formación de HHT pueden ser explicados por **una posible acción scavenger de radicales de oxígeno**.

Mediante sistemas generadores de radicales peroxilo, se ha podido comprobar que **cumarinas dihidroxiladas y sus derivados glicosilados interaccionan favorablemente con EAO tanto en medio acuoso como en medio hidrófobo** (Payá, 1992b). Esta propiedad caracteriza a dichos compuestos como atractivos candidatos para su evaluación como agentes protectores de desórdenes dependientes del estrés oxidativo. Sin embargo, aunque existe una estrecha relación químico-estructural entre cumarinas y tocoferoles por ser ambos derivados del benzopirano, el α -tocoferol sólo puede reaccionar con radicales ROO \cdot en medio lipídico.

Cumarinas orto-dihidroxiadas (esculetina, fraxetina y dafnetina) son **potentes inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico** a través de la vía pro-inflamatoria 5-lipooxigenasa (Craven, 1986; Payá, 1994b). Parece ser que el mecanismo depende de la combinación de las propiedades quelantes de iones hierro implicados en la peroxidación

lipídica, y de la capacidad de donar electrones en el ciclo rédox catión férrico a catión ferroso; propiedades que también confieren actividad beneficiosa como captadores de especies reactivas de oxígeno.

También se ha puesto de manifiesto el efecto **hepatoprotector** de cumarinas de origen natural (wedelolactona y demetil-wedelolactona) en **modelos de intoxicación hepática** inducidos por tetracloruro de carbono (y otros xenobióticos como el bromobenceno, que son depletores de glutatión) y **mediados por radicales libres** (Wagner, 1986b; Yang, 1991; Anand, 1992). La inhibición de la toxicidad por estos compuestos e inducida por xenobióticos (bromobenceno), parece estar relacionada con sus efectos sobre los niveles de glutatión, y con su acción directa como captadores de radicales libres, contribuyendo a vencer los efectos dañinos del estrés oxidativo por cooperación con las **moléculas protectoras naturales**. Además, el glutatión reducido puede actuar como "captador" de radicales libres en asociación con la superóxido dismutasa, que elimina eficientemente el anión superóxido formado en las reacciones entre radicales derivados de glutatión y oxígeno. Como resultado, la deplección de glutatión está relacionada con el comienzo de la peroxidación lipídica y **daño celular**. La capacidad de inhibir la peroxidación lipídica es también relevante en relación con la actividad protectora hepática de las cumarinas, puesto que la necrosis hepática por xenobióticos puede ser prevenida eficazmente por antioxidantes como la vitamina E y por los quelantes como la desferrioxamina (Halliwell, 1991).

En estos últimos años, se ha investigado la actividad antimalárica de **dafnetina** (7,8-dihidroxicumarina), y se ha hecho evidente tanto *in vitro* como *in vivo*. Su **actividad antioxidante le hace capaz de mitigar los efectos hemolíticos oxidantes de la primaquina**, importante fármaco antimalárico que produce anemia hemolítica en pacientes con deficiencia en G6PDH (Hong, 1992). La actividad antimalárica de la primaquina está mediada por la **generación de especies oxidantes procedentes de sus metabolitos**. Uno de estos metabolitos, 5,6-dihidroxi-8-aminoquinolina produce quimioluminiscencia (CL) *in vitro* cuando es incubado en presencia de luminol. Esta CL, mediada por peróxido de hidrógeno (ya que es inhibida por CAT y estimulada por SOD) es inhibida por dafnetina, así como la peroxidación lipídica mediada también por peróxido de hidrógeno. La CL generada por el citado metabolito es dependiente de trazas de **hierro** ya que es inhibida por desferrioxamina, por ello el potente efecto de dafnetina podría deberse a la propiedad de ser un buen quelante de hierro.

La actividad calcio-antagonista de diversas cumarinas (Namba, 1988) **guarda estrecha relación con la actividad antioxidante de las mismas** (Sgaragli, 1993). Los iones

Ca^{2+} activan la fosfolipasa A_2 y muchas proteinasas y nucleasas. Un incremento del Ca^{2+} intracelular produce ruptura de la membrana y subsecuente daño celular. Y así, el Ca^{2+} incrementa el daño causado por radicales libres de oxígeno en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. De este modo, el mecanismo de acción *scavenger* de diversas cumarinas podría transcurrir por un antagonismo del calcio. Por ello, moléculas que combinan las propiedades antioxidantes y antagonistas del calcio pueden ser de particular valor en la protección del daño tisular por isquemia-reperusión.

4.3. Otras acciones farmacológicas de cumarinas

La cumarina fue aislada y purificada por primera vez por Voleg, en 1822, a partir del haba tonka (*Dipteryx odorata*). Más tarde fue sintetizada por Perkin en 1868. Se prohibió su uso por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1950, siendo clasificada erróneamente como carcinogénico y hepatotóxico a partir de resultados experimentales obtenidos en animal (Cohen, 1979). Sin embargo, muchos derivados de cumarina han mostrado **propiedades anticoagulantes** (Vuorela, 1992), **tumoristáticas** e **inmunoestimulantes** (Okuyama, 1990; Roßkopf, 1990).

Un determinado número de cumarinas simples poseen diversas acciones en el sistema cardiovascular (Porcellati, 1990), por un mecanismo de inhibición de la actividad fosfolipasa A_2 o por modulación negativa de uno o más procesos implicados en su activación, o por mecanismo agonista de adrenalina, PAF, Ca^{2+} -ionóforo, etc. Y así, merece mención la acción antianginosa de la escoparona en ratas (Yamahara, 1989a; 1989b), además del efecto hipotensor de la escopoletina y de los efectos inhibitorios de la esculetina y umbeliferona en las células miocárdicas (Namba, 1988).

La cumarina ha mostrado **inhibir la liberación de histamina procedente de los mastocitos**, así como **actividad adrenérgica moderada**. Ello puede ser debido a la inhibición de la catecol-o-metil-transferasa, enzima que metaboliza noradrenalina, produciendo como consecuencia **efecto espasmolítico** (Sgaragli, 1993). La cumarina y sus derivados también poseen **efectos antipiréticos**, como se ha observado en la fiebre inducida por endotoxina en conejos (Egan, 1990).

Otras propiedades farmacológicas importantes de cumarina y sus derivados, han sido observadas en el uso de estos compuestos en el tratamiento del linfedema. Así, la actividad fundamental de cumarina, unida a proteína, tiene lugar mediante el **control de la proteólisis por incremento de la actividad proteásica natural de macrófagos en el lugar dañado** (Bolton, 1975; Piller, 1977).

La cumarina ha sido utilizada en el tratamiento de la brucelosis en humanos. Este uso

ha conducido a hacerse extensivo en el **tratamiento de otras infecciones crónicas**, incluyendo mononucleosis, mycoplasmosis, toxoplasmosis, fiebre Q, y psitacosis (Egan, 1990).

Recientemente se ha visto que la cumarina produce una **supresión moderada en anión superóxido y en la generación de peróxido de hidrógeno por monocitos, pero no por macrófagos** (Egan, 1990).

También se ha demostrado que la cumarina disminuye la actividad de un isoenzima citocromo P-450 tóxico e **incrementa la actividad del P-450 detoxificante** en hígado de rata, después de la administración del inductor tumoral 3-metilcolantreno y anterior a la de la cumarina. Estos datos sugieren que la cumarina actúa **disminuyendo la activación metabólica de potenciales carcinógenos**, previniendo así la iniciación (Egan, 1990).

Se ha puesto de manifiesto que 4-metilesculetina, cumarina, umbeliferona y 4-hidroxicumarina son citostáticas para las células Hela. En la **terapia antitumoral con cumarina**, se ha propuesto que ésta actúa en dos fases: **inhibiendo el crecimiento de algunas células tumorales, y a través de la estimulación de ciertos componentes de la reacción inmune contra el tumor** (Okuyama, 1990; Roßkopf, 1990).

4.4. Acción sobre enzimas

Se ha comprobado que **esculetina inhibe la triptófano 5-hidroxilasa**, en parte, debido a la presencia de la función orto-dihidroxi en el anillo de la cumarina, que puede acomplejar un ion metálico esencial que actúe como cofactor. Todos los compuestos de este grupo con una hidroxilación similar muestran un comportamiento semejante. Además, entre un numeroso grupo de compuestos o-dihidroxi, **esculetina es el más fuerte inhibidor de la prenialanina hidroxilasa** de hígado de rata. Sin embargo, esta actividad inhibitoria se ve muy reducida para 3,4-dihidroesculetina (Murray, 1982).

Ostrutina (6-geranil-7-hidroxicumarina) inhibe la succinato oxidasa. Parece que la cadena del isopreno es necesaria, ya que umbeliferona (7-hidroxicumarina) no presenta tal efecto inhibitorio. La inhibición enzimática depende del número y posición de los grupos hidroxilos en el núcleo de benzopirona. Mientras umbeliferona no ejerce inhibición, 4-hidroxicumarina sí presenta dicho efecto. Derivados dihidroxilados son más efectivos que los monohidroxilados, sobre todo cuando se disponen en agrupamiento catecol. Se sugiere que la base de los efectos inhibitorios de dihidroxicumarinas pueda ser, tanto un **efecto reductor como quelante**, a cargo del grupo catecol (Murray, 1982).

Después de un estudio de la **inhibición de succinato oxidasa por dafnetina**, se ha observado que esta dihidroxicumarina reacciona con el citocromo c para formar un producto que no es muy efectivo como transportador electrónico, pero es capaz de interactuar con la

cadena respiratoria, **inhibiendo así el transporte electrónico** (Murray, 1982).

Un grupo de inhibidores fenólicos de **colina acetilasa**, incluyendo **esculetina**, presentan una correlación entre la capacidad de formar **quinonas** y, la **acción inhibitoria *in vitro*** de dicha enzima (Murray, 1982).

La **inhibición de la glucosa-6-fosfatasa** de hígado de rata tras la administración de cumarina, puede ser atribuida primariamente a dos metabolitos, **2-hidroxifenilacético** y **2-hidroxifenil-láctico** (que son formados rápidamente en el hígado de rata), ya que ambos inhiben el enzima *in vitro*, mientras que cumarina no presenta dicho efecto (Fentem, 1993).

4.5. Efectos sobre respiración y fosforilación oxidativa

La acción de cumarinas simples es similar a la de **2,4-dinitrofenol** sobre la respiración de células de levadura, es decir, mediante un **mecanismo de acción desacoplante de la fosforilación oxidativa** por parte de estos compuestos. En levaduras, la presencia de **cumarina** no hace disminuir la fosforilación. **Ostrutina** disminuye la utilización de oxígeno e **incrementa** el cociente respiratorio, y disminuye la fosforilación en condiciones aerobias. **Umbeliferona** inhibe la respiración y disminuye la tasa P:O en mitocondria de hígado de rata, con **succinato** como sustrato (Murray, 1982).

4.6. Efectos sobre ácido nucleico y metabolismo proteico

El pretratamiento de ratas con cumarinas durante **7 días** incrementa la capacidad de los microsomas hepáticos para incorporar aminoácidos ¹⁴C-marcados a las proteínas *in vitro*. Sin embargo, *in vivo* no se observa influencia en la síntesis proteica endógena cuando se administra una dosis oral de **20-30 mg/kg** durante **3-10 días**, pero *in vitro*, la estimulación de la incorporación de (¹⁴C)-fenilalanina por poli U se incrementó.

Tanto la síntesis proteica endógena como la poli U dirigida, se incrementaron cuando se administró una dosis simple de **146 mg/kg** de cumarina **14-17 horas** antes de la decapitación de los animales. El hecho de que este incremento en la síntesis proteica endógena se vea disminuido por la administración simultánea de actinomicina D, sugiere que el efecto pueda ser síntesis RNA dependiente de DNA (Murray, 1982).

Wald y Feuer hicieron un estudio sobre la relación estructura-actividad de la **cumarina** y nueve compuestos derivados naturales y sintéticos, para inducir enzimas metabolizadoras de fármacos en hígado de rata. Interpretaron que dicha inducción **podría estar asociada con el grupo carbonilo y la estructura α -pirano de la molécula** (Murray, 1982).

La cumarina es una de las moléculas pequeñas más efectivas que afectan a la temperatura de transición de la estructura helicoidal del ácido poliadenílico. Se ha estudiado la unión de la cumarina al retículo endoplasmático de microsomas hepáticos de conejo. Se une al citocromo P-450 y dicha unión se ve afectada por el tratamiento con fenobarbital. Mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* con (3-¹⁴C)cumarina, se ha demostrado la unión de esta a proteínas séricas de sangre de rata (Murray, 1982).

Se ha detectado una pequeña pero bien definida fotorreactividad en los casos de umbeliferona y herniarina (7-metoxicumarina) al DNA, y en menor grado al RNA, presumiblemente indicando la formación de C₄-cicloadductos por reacción con la lactona del anillo de cumarina (Murray, 1982).

4.7. Metabolismo, farmacocinética y toxicología

Nos ha parecido de gran interés, señalar los aspectos principales del metabolismo, farmacocinética y toxicología de cumarinas con el fin de justificar la especie de roedor empleada en la experimentación animal, el ratón, así como la vía de administración y las dosis utilizadas para las distintas edades.

Metabolismo

La cumarina es metabolizada inicialmente por un sistema citocromo P450 específico dando lugar a la hidroxilación previa a la conjugación fase II. Las rutas más comunes de hidroxilación tienen lugar en las posiciones 7 ó 3 para rendir 7-hidroxycumarina (7-OHC) o 3-hidroxycumarina (3-OHC), respectivamente. El metabolito principal de la fase II es un conjugado glucurónido (Egan, 1990).

En el metabolismo de la cumarina existe un grado de variación según las especies, cuantitativo pero no cualitativo. En primates (babuinos, el hombre), el metabolito mayormente formado es 7-OHC (Goeger, 1992). Sin embargo, la actividad de cumarin-7-hidroxilasa es menor en roedores que en microsomas humanos, y a la inversa, la actividad de cumarin-3-hidroxilasa es elevada en roedores mientras que en microsomas humanos está ausente. Además, en el caso del ratón existe una diferencia cuantitativa entre estirpes, debida a diferencias isoenzimáticas (Egan, 1990).

Farmacocinética

La cumarina y el 7-hidroxicumarin-glucurónido (7-OHCG) han mostrado tener las mejores distribuciones correspondientes a un modelo bicompartimental abierto. Se demostró que la vía de administración del fármaco no afecta significativamente a la vida media de la cumarina y del 7-OHC, ya que la administración intravenosa y oral, respectivamente, produjo vidas medias comprendidas entre la hora y la hora y media (Cohen, 1979).

Este comportamiento farmacocinético de la cumarina nos ha permitido seleccionar para nuestro estudio, la vía de administración más cómoda y sencilla, e incluso más adecuada para un tratamiento crónico: la vía oral.

La cumarina experimenta un intenso metabolismo de primer paso para formar 7-OHC (aproximadamente 97%), en el hombre. La 7-OHC formada es rápidamente convertida por conjugación a glucurónido para formar 7-OHCG en el intestino y otros tejidos (Egan, 1990).

Se ha puesto de manifiesto que el perfil farmacocinético de la cumarina en babuinos es similar al del hombre (Fentem, 1993). Los niveles elevados de 7-OHCG en plasma indican que toda la cumarina es absorbida en intestino y distribuida no sólo a órganos con elevado flujo sanguíneo, sino también al fluido extracelular y compartimentos intracelulares de otros tejidos, indicado por el elevado volumen de distribución. El 7-OHCG es excretado por secreción tubular renal activa, y su ruta es la responsable del 90% de la cumarina inicial excretada en orina. La cumarina tiene, por tanto, una vida media corta y baja biodisponibilidad (Egan, 1990).

En un estudio gerontocinético en perro se han evaluado las **alteraciones farmacocinéticas de las cumarinas como una función de la edad**. El aclaramiento total (*clearance*) desciende significativamente en animales viejos con respecto a los jóvenes. Sin embargo, no aparecen cambios significativos en el volumen aparente de distribución y vida media. Las concentraciones de albúmina sérica descienden con la edad, y esto conduce a un incremento en la fracción de compuesto libre. Por otro lado, también desciende la actividad microsomal oxidativa y la capacidad de conjugación (formación del glucurónido) hepática (Ritschel, 1993).

Estas alteraciones en la farmacocinética como consecuencia de la edad, se han de considerar fundamentales para establecer las dosis del compuesto cumarínico en estudio en función de la edad del animal de experimentación.

Toxicología

En ratones, la DL_{50} de la cumarina se encuentra en el rango de 196-780 mg/kg, dependiendo de la raza. Fountain vio que la DL_{50} de 3-OHC en ratones era de 1.8 g/kg, mientras que 3.2 g/kg de 7-OHC en un estudio similar no tuvo efecto (Egan, 1990). Los resultados de estudios de toxicidad aguda en ratones, mostraron que **7-OHC, el mayor metabolito de cumarina en humanos, es remotamente menos tóxico que 3-OHC, el mayor metabolito en roedores** (Fentem, 1991; 1993).

La toxicidad de la cumarina es mayor en la rata que en el ratón, dado que la 3-hidroxilación es una importante ruta metabólica en la rata, y que el metabolito mayoritario es el o-hydroxifenilacetaldehído (Fentem, 1991). Y además, la excreción biliar junto con una posible circulación enterohepática de los metabolitos, contribuyen a una mayor hepatotoxicidad en la rata respecto al ratón.

En vista de estos datos, y a pesar de que el ratón no es buen 7-hidroxilador de cumarina con respecto al hombre, sin embargo, es menos susceptible que la rata a la toxicidad por cumarinas (Wudl, 1980).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MÉTODOS *IN VITRO*.

Se ha realizado un estudio de la posible actividad "captadora" *in vitro* de un grupo de 19 cumarinas, mediante sistemas generadores de EAO y de daño peroxidativo tisular. La actividad "captadora" de estos productos se evalúa mediante el efecto inhibitorio de las reacciones químicas que se desarrollan en cada una de las técnicas. La utilización de la peroxidación lipídica sirve como método de primera elección en la selección de las cumarinas más activas, ya que es un proceso frecuente en la célula y está relacionado con las funciones fisiológicas, *turnover* y patología de numerosos orgánulos celulares (Miquel, 1989).

Por tanto, estas técnicas tienen una finalidad discriminatoria y selectiva de productos con actividad *scavenger* para su posterior ensayo *in vivo*.

Los métodos que hemos utilizado en nuestro estudio se describen a continuación:

1.1. Sistema generador de anión superóxido

1.1.1. Autoxidación del pirogalol

1.1.2. NADH-fenazina metosulfato-O₂-azul de nitrotetrazolio

1.2. Sistema generador de radical hidroxilo

Ácido ascórbico-hierro-EDTA

1.3. Sistema generador de peróxido de hidrógeno

NADPH-microsomas hepáticos

1.4. Peroxidación lipídica microsomal

Sistema ácido ascórbico-catión ferroso

Cumarinas y reactivos empleados

Las cumarinas ensayadas fueron obtenidas comercialmente:

(ALDRICH)

6,7-dimetoxicumarina

Fraxetina (7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina)

Ácido 7-hidroxycumarín-4-acético

7-hidroxi-3,4,8-trimetilcumarina

7-metilcumarina

(EXTRASYNTHÈSE)

4-metildafnetina (7,8-dihidroxi-4-metilcumarina)

(FLUKA)

Esculina (7-hidroxi-6-glucosilcumarina)

Umbeliferona (7-hidroxycumarina)

(JANSSEN CHIMICA)

Ácido cumarín-3-carboxílico

4-hidroxycumarina

4-metilumbeliferona (7-hidroxi-4-metilcumarina)

6-metilcumarina

4-metilesculetina (6,7-dihidroxi-4-metilcumarina)

7-metoxicumarina

(SIGMA)

7-amino-4-metilcumarina

7-dimetilaminociclopenta(c)cumarina

Esculetina (6,7-dihidroxycumarina)

Escopoletina (7-dihidroxi-6-metoxicumarina)

Se utilizaron los siguientes reactivos:

β -NADH, β -NADPH, fenazina metosulfato (PMS), azul de nitro tetrazolio (NBT), pirogalol, ácido dietilentriaminopentaácetico (DTPA), ácido dietilendiaminotetraácetico (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato amónico, sulfato ferroso, tiocianato potásico, azida sódica, miricetina, superóxido dismutasa (de eritrocitos bovinos) y butil-hidroxitolueno (BHT) se obtuvieron de Sigma. Ácido ascórbico, ácido Tris-hidroximetilaminometano, acetilacetona, ácido 2-tiobarbitúrico y manitol fueron proporcionados por Merck. Sulfato férrico amónico, ácido tricloroacético, etanol, cloruro de magnesio, cloruro potásico, fosfato monosódico y fosfato disódico, se obtuvieron de Panreac.

1.1. Sistema generador de anión superóxido

1.1.1. Autoxidación del pirogalol

(Marklund, 1974; 1985)

El pirogalol (1,2,3-bencenotriol) es un fenol muy susceptible a la autoxidación, es decir, se oxida con gran rapidez y facilidad. El rango de autoxidación se incrementa con el pH. Esta reacción de autoxidación ha sido empleada en la eliminación de oxígeno de los gases.

La habilidad de la SOD a pH 8.2 de inhibir la autoxidación del pirogalol (0.15 mM) en un 97.5%, indica una dependencia casi exclusiva de la participación del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$. La catalasa no tiene efecto inhibitorio sobre la autoxidación de este fenol, indicando así que el peróxido de hidrógeno no está implicado en este mecanismo.

La inhibición de la autoxidación del pirogalol por diversas cumarinas, permite determinar la habilidad "captadora" del radical superóxido por parte de las mismas.

La autoxidación se ha valorado tras un período de 20 s de inducción, durante 2 min., tiempo en el que el incremento de absorbancia a 420 nm es lineal. Las experiencias se han realizado a $25^\circ\text{C} \pm 0.1$. El pirogalol se vehiculiza en ácido clorhídrico 10 mM, y la reacción se inicia cuando este fenol es añadido a una concentración final de 0.15 mM, en una solución tampón Tris-hidroximetilaminometano equilibrada con aire, pH 8.2, que contiene 1 mM de DTPA, y el compuesto cumarínico a ensayar o su vehículo (DMSO).

El DTPA es utilizado como un quelante en el ensayo, para suprimir interferencias por iones hierro, cobre y manganeso.

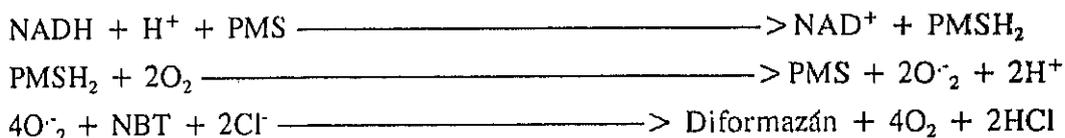
1.1.2. NADH-fenazina metosulfato- O_2 -azul de nitrotetrazolio

(Slater, 1975)

Este método de generación de radicales anión superóxido, no enzimático, está constituido por el sistema NADH/fenazina metosulfato (PMS)/oxígeno molecular O_2 /azul de nitrotetrazolio (NBT).

La reacción se inicia con la reducción del PMS por el NADH; el $PMSH_2$ reducido es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular del aire produciendo el radical anión superóxido que reduce el NBT a diformazán, compuesto altamente coloreado que presenta un máximo de absorción a 560 nm.

Las reacciones citadas transcurren según la secuencia:



La mezcla de incubación contiene NADH (90 μM), NBT (43 μM), los compuestos cumarínicos a ensayar o su vehículo (DMSO), PMS (2.7 μM) y tampón fosfato 19 mM (pH 7.4) en un volumen final de 3.1 ml.

La reacción de reducción del NBT se inicia con la adición del PMS, y se monitoriza espectrofotométricamente a 560 nm (20°C) durante 2 minutos para calcular el incremento de absorbancia por minuto (dA/min).

Sin embargo, hay que decir que, en la mezcla de NADH y PMS también se generan radicales $\cdot\text{OH}$ y se crean otros subproductos.

1.2. Sistema generador de radical hidroxilo

Ácido ascórbico-hierro-EDTA

(Klein, 1981; Rekka, 1990)

Las especies más activas de oxígeno son los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que pueden ser liberados durante la reducción de peróxidos formados vía lipoxigenasa y vía cicloxigenasa.

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un potente agente "captador" de radical hidroxilo. Este interacciona con $\cdot\text{OH}$ para producir radicales $\cdot\text{CH}_3$ que pueden llegar a formar gas metano. La producción de metano procedente del DMSO ha sido utilizada para detectar la generación de radicales hidroxilo en sistemas biológicos. Pero Klein (1981) demostró que también se producía formaldehído, y su formación era mayor que la de metano.

El sistema generador de radicales hidroxilo consta de ácido ascórbico/iones férrico/EDTA. El fundamento de la técnica consiste en la medida del formaldehído producido durante la oxidación del DMSO por el sistema ácido ascórbico/ Fe^{3+} . La oxidación desencadenada por el ascorbato es catalizada por el hierro a 37°C.

La mezcla de incubación consta de EDTA (0.1 mM), complejo Fe^{3+} -EDTA (1:2) (167 μM), DMSO (33 mM), ácido ascórbico (2mM), los compuestos cumarínicos a ensayar o su vehículo (etanol), y tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) en un volumen final de 3 ml.

La reacción se inicia con la adición del ácido ascórbico. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, la reacción se detiene con 1 ml de ácido tricloroacético al 17.5% (P/V),

y en una alícuota de 1.5 ml se mide el formaldehído producido por espectrofotometría (Nash, 1953).

El mismo experimento se repite utilizando manitol (25 y 50 mM) como patrón. El manitol es un conocido "captador" de radicales hidroxilo (Klein, 1981, Thomas, 1989).

La competición entre la cumarina problema (o patrón) y el DMSO por el $\cdot\text{OH}$ generado procedente del sistema ácido ascórbico/ Fe^{3+} (expresado como **porcentaje de inhibición de la producción de formaldehído**) se utiliza para la estimación de la actividad "captadora" de radical hidroxilo de la sustancia problema.

Medida espectrofotométrica del formaldehído (Nash, 1953):

Para detectar el formaldehído producido, se genera mediante una reacción, un producto de color amarillo al visible, llamado 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL), cuya longitud de onda de máxima absorbancia es de 412 nm. El DDL se forma como consecuencia de la reacción de acetato amónico, acetilacetona y formaldehído.

El reactivo revelador del formaldehído producido consta, por tanto, de una mezcla reactiva de acetato amónico y acetilacetona en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4, a una concentración final de 1 M y 0.01 M, respectivamente. Se añaden 2 ml del revelador sobre alícuotas de 1.5 ml (procedentes de cada ensayo), y se incuba dicha mezcla en baño de agua 5 min. a 58°C. Inmediatamente después, los tubos de ensayo se introducen en hielo para detener la reacción. La lectura espectrofotométrica se realiza a 412 nm.

1.3. Sistema generador de peróxido de hidrógeno

NADPH-microsomas hepáticos

(Hildebrandt, 1973; 1975)

Método basado en la formación de peróxido de hidrógeno durante la oxidación microsomal del NADPH. El H_2O_2 producido es estimado directamente por determinación de hierro férrico en forma de tiocianato (los cationes férrico son producidos por el H_2O_2 por oxidación de cationes ferroso).

Preparación de los microsomas

La obtención de la fracción microsomal de un homogenado hepático se lleva a cabo como se describe a continuación:

Se extrae y perfunde el hígado de ratas (Wistar, ambos sexos, 120-200 g) que han sido

mantenidas en ayunas 48 horas con agua *ad libitum*. El hígado, finamente troceado, se lavó con sacarosa 0.25 M a 4°C, para la eliminación de posibles microcoágulos. Se procedió a la homogenización en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4, mediante un *potter* con pistilo de teflón a 2000 g durante 5 min. El volumen final del homogenado fue diez veces el peso del hígado de partida. El homogenado se centrifugó a 750 g durante 10 min., y posteriormente se recogió el sobrenadante en un recipiente mantenido en hielo picado. Se lavó el residuo con sacarosa 0.25 M y se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores. Se reunieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 19000 g durante 20 min. con el fin de obtener la fracción mitocondrial que sedimenta a esta velocidad. Los sobrenadantes mitocondriales se centrifugaron a 100000 g durante 60 min. (Ultracentrífuga KONTRON T-2080). El sedimento microsómico se resuspendió en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4, y se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización.

La determinación de proteína microsomal se realizó siguiendo el método del Biuret.

Mezcla de incubación

La mezcla de reacción está constituida por la fracción microsomal (1.5 mg de proteína microsomal/ml de mezcla de incubación); azida sódica NaN_3 (0.5 mM) (como inhibidor de la actividad de la catalasa microsomal); cloruro potásico KCl (150 mM); cloruro de magnesio MgCl_2 (10 mM); las cumarinas (a distintas concentraciones, DMSO como vehículo); NADPH (300 μM); y tampón fosfato Tris-ClH 50 mM, pH 7.4, en un volumen final de 1.5 ml.

La reacción se inicia con la adición del NADPH, y se mantiene en baño de agua a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la reacción se detiene añadiendo el mismo volumen, 1.5 ml, de ácido tricloroacético frío al 3% (P/V). El precipitado se mantiene a 4°C (en hielo) durante 20 minutos, antes de la centrifugación a 22000 g a 2°C 10 min.

Estimación del peróxido de hidrógeno

La detección y cuantificación del peróxido de hidrógeno formado a partir de la oxidación del NADPH, se realiza mediante una reacción de coloración. Esta técnica determina concentraciones de peróxido de hidrógeno comprendidas entre 10^{-5} y 10^{-6}M .

Se toman alícuotas de 2.5 ml del fluido sobrenadante y se añaden a tubos de vidrio que contienen una mezcla de 0.5 ml de sulfato ferroamónico 10 mM y 0.2 ml de tiocianato potásico 2.5 M. El ensayo químico depende de la formación de tiocianato férrico $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ (procedente de la oxidación del catión Fe^{2+} a Fe^{3+} por el peróxido de hidrógeno), compuesto intensamente coloreado cuya extinción es medida a 480 nm comparada con

controles, una vez que las muestras se hayan mantenido 10 min. en baño de agua a 25°C. El color permanece constante durante 1 hora.

La intensidad del color es muy dependiente de la composición de la solución, y el control cuidadoso de las condiciones es esencial si se desea que el método sea preciso y reproducible.

1.4. Peroxidación lipídica microsomal

Sistema ácido ascórbico-catión ferroso

(Rekka, 1990)

La preparación de microsomas hepáticos se ha realizado según el método descrito anteriormente. Asimismo, mediante la reacción de Biuret, hemos calculado los mg de proteína por ml de fracción microsomal.

La peroxidación lipídica fue inducida por medio del sistema ácido ascórbico/Fe²⁺, utilizando como sustrato microsomas hepáticos inactivados por calor.

La mezcla de incubación contiene la fracción microsomal (1.5 mg de proteína/ml), ácido ascórbico (1.6 mM), las cumarinas a distintas concentraciones disueltas en DMSO (o volumen equivalente de DMSO para los controles), sulfato ferroso (0.2 mM), y tampón fosfato 50 mM, pH 7.4, hasta un volumen final de 0.68 ml.

La reacción se inicia con la adición a la mezcla de la solución recientemente preparada de SO₄Fe, y se mantiene en baño con agitación a 37°C durante 45 min. La reacción se detiene con 1 ml de ácido fosfórico sobre 0.14 ml de muestra.

La peroxidación lipídica es ensayada espectrofotométricamente (535 nm) por **determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Test del TBA)**. Una vez detenida la reacción, se procede al revelado a partir del volumen final obtenido, añadiendo en los distintos tubos, respectivamente, 33 µl de BHT al 0.01% en etanol (es importante añadir este antioxidante para prevenir una peroxidación adicional) y 0.3 ml de TBA al 0.6% (P/V). **Los tubos se introducen en un baño a 100°C durante 45 min.** Posteriormente, la reacción de revelado se detiene con frío introduciendo los tubos en hielo. La extracción del material reactivo al TBA se lleva a cabo con alcohol n-butílico, añadiendo a la mezcla anterior 1.4 ml de este solvente orgánico y agitando vigorosamente con Vortex para centrifugar posteriormente a 3200 g durante 15 min. a 4°C. Finalmente, se recoge la fase orgánica y se lee la absorbancia a 535 nm.

2. METODOS *IN VIVO*

Una vez seleccionadas las sustancias que muestran mayor espectro de actividad en las técnicas de "captación" de radicales *in vitro*, se han realizado ensayos en mamíferos, ratón, probablemente el modelo más utilizado para el estudio de la fisiología y bioquímica del envejecimiento.

Una de las predicciones más útiles e interesantes de la teoría de los radicales es que la administración de antioxidantes a poblaciones de animales -y quizá de seres humanos- podría prolongar su vida media y mejorar su calidad de vida (Comfort, 1971; Yu, 1994). Esta idea ha servido para plantear nuestro estudio de cumarinas como antioxidantes *in vivo*.

Para esta investigación se ha seleccionado el ratón C57BL/6J porque es una raza consanguínea, bien definida genéticamente, y posee una vida media relativamente larga. Además, esta raza de ratón ha sido utilizada ampliamente en investigación gerontológica por lo que se dispone de datos longitudinales sustanciales y de estudios neuroquímicos (Dean, 1981; Miquel, 1978b; Harrison, 1982). El carácter longevo de esta raza es dependiente del sexo, por ello, hemos elegido el macho como modelo animal de envejecimiento.

Los animales fueron suministrados desde Francia por IFFA CREDO. Las condiciones del estabulario en que se mantienen los animales, como temperatura, humedad, ventilación, luz, nutrición, limpieza, olor, ruidos, etc., se han cuidado extremadamente para este estudio de envejecimiento. Los animales fueron mantenidos a una temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y a una humedad relativa del $50 \pm 10\%$. La composición de la dieta estándar adquirida a Panlab y suministrada *ad libitum* al igual que el agua fue: 59.7% de glúcidos (E.L.N.); 3.9% de fibra bruta; 17.2% de proteína bruta; 2.7% de grasa bruta; 5% de vitaminas y minerales; y un 12% de humedad.

Es ineludible utilizar animales "definidos" con el fin de disminuir la variedad animal y poder sacar conclusiones válidas y reproducibles.

Aunque se tenga presente el hecho de que los resultados obtenidos en el animal de experimentación no son siempre superponibles con los obtenidos en el hombre, sirven de orientación y forzosamente deben realizarse antes de comenzar los ensayos clínicos en sus diferentes fases.

Se han establecido lotes de 12 animales de 12, 18 y 21 meses de edad, respectivamente: lotes problema correspondientes a los productos de estudio seleccionados (fraxetina y esculetina), y lotes control (los animales reciben exclusivamente el vehículo de las cumarinas seleccionadas: tween 20 al 10% en agua).

Atendiendo a estudios de longevidad, estos grupos son equivalentes a los períodos adulto, senescente, y muy senescente, en la vida media de esta raza.

El primer grupo de animales seleccionado fue de 12 meses (animal adulto), ya que ciertos estudios han mostrado cómo varios antioxidantes endógenos (Benzi, 1979) pueden estar aumentando durante el desarrollo de animales jóvenes que no son totalmente maduros.

Hemos planteado un tratamiento de 35 días consecutivos (5 semanas) con fraxetina y esculetina, respectivamente, a dosis de 25 mg/kg para la edad de 12 meses y de 15 mg/Kg para la de 18 y 21 meses, debido a su farmacocinética. Como sustancia patrón se eligió el butil-hidroxitolueno (BHT), y se administró a las mismas dosis que en el caso de fraxetina y esculetina.

La vía de administración escogida para el tratamiento de los animales con los respectivos productos seleccionados es la vía oral (p.o). Esta es la vía más adecuada para administrar un medicamento, aunque no siempre es la más útil. Para los pequeños roedores existen cánulas apropiadas que consisten en agujas de calibre grueso y la punta en forma de oliva, evitando así traumatismos. Se debe introducir el dispositivo hasta el nivel gástrico para inyectar la sustancia. Hay que asegurarse de que se está en la vía adecuada antes de inyectar la solución. La penetración de líquido en las vías respiratorias puede llevar a la muerte brusca del animal, según la cantidad, o a producir alteraciones que falsearían los resultados.

El uso de esta vía tiene su justificación por las perspectivas terapéuticas de estos productos, que apuntan a una administración crónica que requiere una vía cómoda como es la oral.

La influencia de estas cumarinas, fraxetina y esculetina, en los animales de experimentación, se ha evaluado mediante:

Ensayos de comportamiento

Durante y/o al final del tratamiento.

1. Test de la cuerda.
2. Test del cilindro rotatorio (rota-rod).
3. Test de evitación pasiva.

Ensayos *in vitro*

Al final del tratamiento el animal es sacrificado y se procede a la extracción de muestras biológicas (hígado y corteza cerebral) a partir de las cuales se hacen las siguientes determinaciones:

1. Determinación de la actividad de **antioxidantes enzimáticos**.
2. Determinación de **antioxidantes no enzimáticos**.
3. Determinación de la **peroxidación lipídica**.

ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO

Los tests de comportamiento en roedores son muy útiles para estudios de envejecimiento en mamíferos, ya que los resultados son muy semejantes a los obtenidos en mono, caballo, y el hombre (Tappel, 1973; Miquel, 1979a).

El objetivo del estudio comportamental consiste, primeramente, en conocer la *influencia de estos compuestos fenólicos en el animal (a cada una de las edades establecidas), respecto a una sustancia patrón de capacidad antioxidante conocida, así como respecto a la ausencia de tratamiento en animales control. Dicha influencia es evaluada mediante procedimientos que prueban un limitado espectro de comportamientos, que implican relativamente desde reflejos y tono muscular simple hasta capacidades más complejas como aprendizaje y memoria. Mediante la observación del comportamiento, podríamos establecer una relación entre la capacidad antioxidante *in vitro* de estas dihidroxicumarinas con la degeneración del organismo dependiente de la edad.

1. Test de la cuerda

(Miquel, 1978a)

Este ensayo permite valorar presumiblemente, la destreza, el equilibrio, la fuerza, y el tono muscular del animal. Es una técnica no invasiva.

El montaje para dicho ensayo consta del siguiente instrumental:

- Dos pies o barras-soporte a los que se anuda la cuerda a la misma altura tomando como referencia la base sobre la que se apoyan ambos soportes.
- Cuerda de cáñamo de 60 cm de longitud entre ambos soportes, tirante, y a una altura de 40 cm de la superficie de apoyo de los mismos.
- Lecho blando, por ejemplo de serrín, en la parte inferior del montaje, entre los soportes, para amortiguar la caída del ratón.

El animal se aclimata durante 5 min., y se pesa.

La prueba comienza provocando al animal un estrés durante 30 s, manteniéndolo suspendido de la cola por encima de la cuerda y permitiendo que se agarre a ella cuatro veces.

Inmediatamente después, se deja al animal sujeto en el centro de la cuerda tirante por las patas delanteras. Instintivamente, tenderá a agarrarse con las cuatro patas para asegurar su posición, y a continuación, con mayor o menor rapidez se deslizará paralelamente a la cuerda,

a través de la misma, hasta alcanzar uno de los extremos (uno de los soportes).

Si el tiempo que transcurre desde que el ratón es colocado en el centro hasta que finaliza su recorrido es menor o igual a 60 s, el test se valora como positivo.

Si el animal cae de la cuerda antes de que hayan transcurrido 60 s, se le somete a una segunda prueba después de 5 min. de recuperación y aclimatación. El estrés que se le provoca esta vez es de 15 s, dejando que se agarre dos veces a la cuerda.

Los datos obtenidos se van anotando del siguiente modo:

| Peso | (t)1 ^{er} intento | (t)2 ^o intento | Exito |
|------|----------------------------|---------------------------|-------|
|------|----------------------------|---------------------------|-------|

Este test se realiza una vez por semana durante los 35 días de tratamiento.

2. Test del cilindro rotatorio (rota-rod)

(Hassert, 1961)

Este ensayo permite valorar la ataxia, coordinación motora, agilidad y destreza del animal.

Descripción instrumental

La prueba se realiza mediante un aparato automático en el cual la velocidad de rotación del tambor, eje con los cuatro habitáculos para la colocación de los animales, es constante y se puede regular mediante un motor de corriente continua.

Un conmutador frontal permite parar el motor en cualquier momento, haciendo posible la interrupción del movimiento rotatorio en los intervalos entre los distintos ensayos. Con el motor parado se puede seleccionar la velocidad requerida, observando la aguja del velocímetro.

Cuando se acciona el conmutador, el tambor comienza a girar con la velocidad seleccionada. La caída del animal desde el tambor acciona las palancas basculantes inferiores. Estas controlan directamente unos microrruptores que a su vez desactivan el contaje de segundos realizado en cada contador frontal. Con la palanca en posición alta los contadores cuentan el tiempo en segundos.

El basculamiento de las palancas se realiza magnéticamente, no necesitando por tanto, ningún mantenimiento.

Desarrollo del test

Los contadores de tiempo (s) se colocan a cero. La velocidad deseada se ajusta en r.p.m. (la primera semana 5 rpm, y las siguientes 10 rpm). Los animales se colocan en el tambor sujetándolos por la cola y con el abdomen dirigido hacia el experimentador. Con un movimiento de balanceo se introduce el animal entre los discos y se le sitúa sobre su cilindro rotor. Es importante que el roedor entre de espaldas a los discos separadores a fin de evitar que con sus garras pueda cogerse a ellos. Se pueden realizar cuatro ensayos simultáneamente, por disponer de cuatro habitáculos. Cuando se acciona la marcha del motor, se inicia al mismo tiempo el conteo de segundos, que expresa el **TIEMPO DE PERMANENCIA** de los animales en el cilindro rotatorio hasta el momento de su caída.

3. Test de evitación pasiva

(Bartus, 1980)

Prueba encaminada a determinar la capacidad de aprendizaje y memoria. Es una técnica invasiva. Se realiza al final del tratamiento.

La caja de "evitación pasiva" consta básicamente de:

- Primer compartimento: superficie 8 x 9 cm²; altura 15 cm. Transparente. Espesor 0.5 cm. Iluminación 40 w, a 17 cm del suelo (de la base).
- Segundo habitáculo: superficie 9 x 18 cm²; altura 15 cm. Paredes opacas. Espesor 0.5 cm. Con ventana transparente de 4 x 5 cm².
- Puerta levadiza (6 cm ancho x 5 cm altura) entre ambos compartimentos.
- Suelo: varillas de 3 mm de diámetro, con una separación de 4 mm entre varilla y varilla.
- *Shocker*: 0.6 mA / 4 s, 80 voltios.

Protocolo

Primer día. El roedor se aclimata durante 5 min. en el habitáculo. Se introduce al ratón de espaldas a la puerta en el primer compartimento; se cierra la puerta levadiza (encendido automático) durante 5 s. Después de este breve tiempo, se abre la puertecilla 5 cm, momento en que se acciona el cronómetro. Cuando pasa la última pata del animal, se anota el tiempo transcurrido, y se cierra la puertecilla de nuevo. Inmediatamente después se aplica un *shock* (descarga eléctrica), y se observa el comportamiento.

A las 24 horas. Se repite el ensayo sin *shock* y se cronometra el tiempo de latencia de entrada en la cámara oscura. El tiempo máximo es de 300 s.

A las 120 horas. Se repite el ensayo.

Se recogen los siguientes datos:

- Tiempo de latencia en prueba de aprendizaje.
- Tiempo de latencia a las 24 horas.
- Valoración de test positivo 300 segundos, a las 24 horas.
- Tiempo de latencia en el quinto día.
- Valoración de test positivo 300 segundos, en el quinto día.

ENSAYOS *IN VITRO*

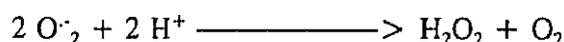
Una de las aproximaciones en el conocimiento del peligro potencial que las EAO suponen para el organismo humano, especialmente en los procesos de envejecimiento, consiste en la medida de los principales antioxidantes endógenos comprobando la variación de sus niveles, con la edad y con un tratamiento antioxidante. De este modo, pretendemos establecer una relación entre la capacidad "captadora" de radicales por parte de cumarinas y la dotación de antioxidantes endógenos según la edad del animal, como consecuencia del tratamiento con dichos compuestos fenólicos.

Una vez realizados todos los ensayos de comportamiento, los animales son sacrificados mediante descoyuntación cervical. Se extrae el hígado y corteza cerebral, y se conservan a -80°C hasta el momento de ser procesados. En estas muestras biológicas se miden los niveles de antioxidantes endógenos, enzimáticos y no enzimáticos, respectivamente. Para ello, los órganos son descongelados y pesados en una balanza de precisión para su posterior homogenización.

1. Determinación de la actividad de antioxidantes enzimáticos

Superóxido dismutasa (SOD)

El enzima SOD convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y en oxígeno molecular:



La determinación de la actividad de la SOD es complicada por la indisponibilidad, en forma pura, de su inestable sustrato, el anión superóxido ($\text{O}^{\cdot -}_2$). Esto implica que el $\text{O}^{\cdot -}_2$ tiene que ser generado en el sistema *in situ*. Además, este anión no es detectado fácilmente por técnicas analíticas convencionales, y por lo tanto, la mayoría de las determinaciones de SOD están basadas en la inhibición de algunas reacciones químicas dependientes del $\text{O}^{\cdot -}_2$.

Para la cuantificación de los niveles de SOD en hígado y corteza cerebral, utilizamos la técnica de autoxidación del pirogalol (Marklund, 1974; 1985). Consiste en la inhibición de la autoxidación de este fenol. (Esta técnica ya ha sido descrita en el apartado de ensayos *in vitro* para la determinación de la actividad "captadora" de $\text{O}^{\cdot -}_2$ de cumarinas).

La autoxidación del pirogalol en solución aerobia es ocasionada por el anión

superóxido, proceso que es inhibido por la SOD. El grado de inhibición puede ser utilizado para evaluar la cantidad de SOD en la muestra. El ensayo es sensible a la temperatura y al pH, pero no depende de la calidad de los reactivos del test. Algunos componentes presentes en las muestras biológicas tales como glutatión, catalasa, y -debido a la capacidad quelante de esta solución- los metales de transición divalentes, no afectan significativamente a los resultados.

La diferencia en el incremento de absorbancia entre los controles y las muestras que contienen SOD, es expresado en porcentaje de inhibición de la oxidación. Una unidad de actividad enzimática de SOD se define como la cantidad de SOD por mililitro de solución test que resulta en un 50% de inhibición.

$$\%INHIBICIÓN = \frac{\Delta DO_{control} - \Delta DO_{muestra}}{\Delta DO_{control}}$$

$$Act\ SOD\ (U/mg\ tej) = \frac{\%Inh}{50} \times \frac{0.8}{V_m} \times \frac{F}{C}$$

- 0.8 = Volumen total en cubeta (ml)
 V_m = Volumen de la muestra (0.025 ml)
 F = Factor de dilución de la muestra
 C = Concentración de tejido en el homogenado (mg tej./ml)

$$Act\ SOD\ (U/mg\ prot) = \frac{\%Inh}{50} \times \frac{0.8}{V_m} \times \frac{F}{C} \times \frac{1}{X}$$

X = mg prot./mg tej.

Catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno formado por la SOD y por las oxidasas flavino-dependientes se descompone por la CAT, hemo-enzima que cataliza la reacción:



Su actividad se determina en las muestras biológicas (hígado y corteza cerebral), por seguimiento de la absorbancia a 240 nm de la descomposición del peróxido de hidrógeno incorporado a la muestra (Pérez-Campo, 1993).

Soluciones

- Tampón fosfato 50 mM, pH 7.4.
- Tritón-X-100 al 10 % en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4. Se utiliza como detergente para liberar enzimas parcialmente ligadas a membranas o contenidas en orgánulos subcelulares (en este caso, en los peroxisomas).
- Peróxido de hidrógeno 15 mM, preparado a partir de solución comercial (30 %).

Método

- Homogenización de hígado en tampón fosfato 50 mg/ml. Si se trata de corteza cerebral 25 mg/ml.
- Sonicación de la muestra homogenizada 3 veces, a intervalos de 20 s, durante 10 s cada vez.
- Centrifugación durante 20 min. a 3200 g (4°C).
- Adición a los sobrenadantes de 0.1 ml de tritón-X-100 por cada ml de tampón fosfato para homogenizar, y mantenimiento en reposo 30 min.
- La mezcla de incubación contiene tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), peróxido de hidrógeno 15 mM y la muestra biológica (0.03 ml), en un volumen final de 0.7 ml.
- El descenso en la absorbancia es registrado a 240 nm durante 2 min. La velocidad de la reacción es elevada y por tanto, el descenso de absorbancia es muy rápido. Es preciso asegurarse de que se toman solamente los valores de velocidad inicial.

Una unidad de actividad enzimática de catalasa se define como la cantidad de enzima que descompone 1 μ mol de peróxido de hidrógeno por min., bajo condiciones específicas de 25°C de temperatura y pH 7.4.

$$Act\ CAT\ (IU/min/mg\ tej) = \frac{\Delta DO/min \times 0.7 \times F}{43.6 \times 10^{-3} \times 0.03 \times C}$$

0.7 = Volumen total en cubeta (ml)

F = Factor de dilución de la muestra

43.6×10^{-3} = Coeficiente de extinción molar del H_2O_2

0.03 = Volumen de la muestra (ml)

C = Concentración de tejido en el homogenado (mg tej/ml)

$$Act\ CAT\ (IU/min/mg\ prot) = \frac{\Delta DO/min \times 0.7 \times F}{43.6 \times 10^{-3} \times 0.03 \times C \times X}$$

X = mg prot./mg tej.

Glutation peroxidasas (GPx)

Existen dos formas básicas del enzima, dependiente (GPx-Se) y no dependiente de selenio (GPx-no-Se), respectivamente.

Para medir ambas actividades en un mismo extracto celular se utiliza el mismo método y se varía el hidroperóxido utilizado como sustrato. El ensayo con peróxido de hidrógeno valora la GPx-Se exclusivamente (Paglia, 1967), mientras que el ensayo con hidroperóxido de cumeno valora ambas enzimas simultáneamente (GPx total) (Lawrence, 1976). En ambos ensayos se valora la actividad GPx siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH y en presencia de un exceso de glutation reductasa (GR).

Conviene hacer la advertencia de la necesidad de realizar una reacción no catalizada, pues en algunos trabajos recientes se han obtenido actividades muy bajas de glutation peroxidasa, debidos al error de omitir tal reacción no catalizada (que siempre se da aunque no haya muestra)(Barja de Quiroga, 1990).

Metodología

Preparación de muestras

- Homogenización del tejido en tampón fosfato 50 mM pH 7.4 frío a una concentración de 50 mg tej/ml.
- Centrifugación durante 20 min. a 3200 g (4°C).
- Recogida del sobrenadante y mantenimiento del mismo en frío hasta el momento de su utilización para la medida de la GPx total y GPx-Se dependiente.

Reactivos

- Solución reactiva. Disolución de 7 mg de azida sódica (para inhibir la actividad de la catalasa, que también descompone el peróxido de hidrógeno), 10 mg de EDTA, 33 mg de GSH (glutation reducido), 5 mg de NADPH y 27 UI de GR (glutation reductasa), en 25 ml de tampón fosfato 50 mM, a pH 7.4 que hayan sido burbujeados

previamente durante 15 min. con N_2 gaseoso. La solución se protege herméticamente para evitar su oxigenación y se mantiene a $4^\circ C$. La solución debe prepararse inmediatamente antes de su utilización, cada día que se realicen medidas.

- Solución de cumeno-OOH. La preparación se realiza a partir de una solución de cumeno comercial, tomando $185 \mu l$ de la misma y completando hasta un volumen final de 50 ml con tampón fosfato 50 mM pH 7.4 (guardar en frío).

- Solución de peróxido de hidrógeno. Se prepara una solución madre que contenga $143 \mu l$ de peróxido de hidrógeno concentrado (30%) en 100 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7.4. Se toma 1 ml de esta solución madre y se le añaden 6 ml más de tampón fosfato. Esta última solución de peróxido de hidrógeno diluído es la que se utiliza para valorar el enzima.

Valoración espectrofotométrica

La solución reactiva se mantiene en el mismo baño que se utilice para termostatar el compartimento de la cubeta del espectrofotómetro, y se sitúa en 340 nm la longitud de onda de lectura. En este ensayo enzimático debe tenerse en cuenta que siempre existe reacción aun en ausencia de enzima. Por ello debe realizarse, cada día que se obtienen las medidas, una reacción en ausencia de muestra (no catalizada) en presencia de cumeno-OOH y otra con peróxido de hidrógeno. El no hacerlo así daría lugar a una sobreestimación de la actividad enzimática real. Por otra parte, esta necesidad tiene como contrapartida la ventaja de que se puede chequear fácilmente en cada sesión de trabajo el estado de los reactivos químicos utilizados, desde el punto de vista de la reacción objeto de estudio.

1) Blanco no catalizada. Se toman 0.7 ml de tampón fosfato en una cubeta y se ajusta el cero de absorbancia.

2) Reacción no catalizada. A 0.675 ml de solución reactiva se adicionan $25 \mu l$ de sustrato (cumeno-OOH ó H_2O_2), lo que pone en marcha la reacción. Se mide el descenso de absorbancia a 340 nm durante 5 min.

3) Blanco catalizada. A 0.675 ml de tampón fosfato se añaden $25 \mu l$ de muestra convenientemente diluída, para ajustar el cero de absorbancia.

4) Reacción catalizada. Sobre 0.650 ml de solución reactiva se incorporan 25 μ l de muestra diluída (igual dilución que en el blanco). Durante 4 min., esta mezcla se mantiene a temperatura ambiente (preincubación). Transcurrido este tiempo, se añaden 25 μ l de sustrato (cumeno-OOH ó H₂O₂) desencadenándose así la reacción. Se mide el descenso de absorbancia a 340 nm durante 5 min.

El grado de dilución de la muestra debe ajustarse hasta obtener varios incrementos de absorbancia consecutivos de la misma magnitud en cada ensayo.

Para el cálculo del incremento medio de absorbancia/min. se desprecia el retraso inicial (menor de 60 s usualmente) y los últimos incrementos (sólo si su valor hubiera empezado a descender sistemáticamente).

Al valor del incremento de absorbancia obtenido con cada muestra se le resta el incremento de absorbancia de la reacción no catalizada correspondiente, y el resultado obtenido se aplica en la siguiente fórmula:

$$Act\ GPx\ (nM\ NADPH/min/mg\ tej) = \frac{\Delta DO/min \times F \times 0.7}{6.22 \times 10^{-3} \times 0.025 \times C \times 1}$$

F = Factor de dilución de la muestra

0.7 = Volumen total en cubeta (ml)

6.22×10^{-3} ml.nmol⁻¹.cm⁻¹ = Coef. de extinción molar NADPH

0.025 = Volumen de muestra en cubeta (ml)

C = Concentración de tejido en el homogenado (mg/ml)

1 = Paso de luz (cm)

$$Act\ GPx\ (nM\ NADPH/min/mg\ prot) = \frac{\Delta DO/min \times F \times 0.7}{6.22 \times 10^{-3} \times 0.025 \times C \times 1 \times X}$$

X = mg prot./mg tej.

Glutation reductasa (GR)

Enzima, que acoplada al sistema NADPH/NADP⁺, mantiene el glutacion intracelular en el estado reducido con efectividad.

La actividad enzimática de GR fue ensayada mediante seguimiento de la oxidación del

cofactor NADPH a 340 nm, en presencia de un exceso de glutatión oxidado (Barja de Quiroga, 1990).

Soluciones reactivas

- Tampón fosfato 50 mM pH 7.4, con EDTA 6.3 mM.
- NADPH 6 mM (concentración final en cubeta 0.3 mM).
- GSSG 80 mM (concentración final en cubeta 4 mM).

Metodología

- Homogenización de tejidos: 50 mg/ml de tampón, excepto para cerebro 25 mg/ml.
- Sonicación 3 veces con un intervalo de 20 s, durante 10 s cada vez.
- Centrifugación durante 20 min. a 3200 g (4°C).
- Diálisis de los homogenados frente a tampón fosfato durante 24 horas a 3-4°C.

En la cubeta de reacción se añaden 0.580 ml de tampón fosfato, 50 µl de muestra biológica, 35 µl de GSSG, y finalmente 35 µl de NADPH. Se mide la absorbancia a 340 nm. No es necesario diluir las muestras.

$$Act\ GR\ (nM\ NADPH/min/mg\ tej) = \frac{\Delta DO/min \times F \times 0.7}{6.22 \times 10^{-3} \times 0.05 \times C \times 1}$$

- F = Factor de dilución de la muestra
- 0.7 = Volumen total en cubeta (ml)
- 6.22.10⁻³ml nmol⁻¹.cm⁻¹= Coef. de extinción molar NADPH
- 0.05 = Volumen de muestra (ml)
- C = Concentración de tejido en el homogenado (mg tej/ml).
- 1 = Paso de luz (cm)

$$Act\ GR\ (nM\ NADPH/min/mg\ prot) = \frac{\Delta DO/min \times F \times 0.7}{6.22 \times 10^{-3} \times 0.05 \times C \times 1 \times X}$$

X = mg prot./mg tej.

Citocromo C oxidasa (COX)

Medimos la actividad de COX como marcador de la capacidad mitocondrial aeróbica máxima en cerebro e hígado.

Se valora su actividad mediante espectrofotometría, por la disminución del nivel de citocromo C como sustrato (ferrocitocromo C), adicionado a la muestra (Smith, 1955).

Soluciones reactivas

- Solución de citocromo C: ferrocitocromo C al 1%. Se prepara a partir de 0.6 ml tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), 6 mg de ferrocitocromo C y 3 mg de ascorbato. Dicha solución se mantiene dializando durante 24 horas, con un cambio de tampón fosfato al cabo de las primeras 12 horas de diálisis.
- Ferricianuro potásico 33 mM.
- Lubrol, 1 mg/0.1 ml de muestra. Se utiliza como detergente para liberar este enzima, que en su mayor parte se halla incluida en el interior de las membranas de los sinaptosomas. De este modo, el sustrato exógeno (ferrocitocromo C) tiene acceso a ella.

Metodología

- Homogenización de tejidos: 50 mg tej/ml de tampón para hígado, y 25 mg tej/ml para cerebro.
- Sonicación de los homogenados 3 veces, con un intervalo de 20 s, durante 10 s cada vez.
- Centrifugación de los homogenados durante 20 min. a 3200 g (4°C).
- Se toma una alícuota de 0.2 ml de las muestras de tejido y se incorporan a los *eppendorf* que contienen 2 mg de lubrol. Se agita bien para facilitar la acción detergente del lubrol, y se espera un tiempo de 30 min.
- Transcurrido este tiempo se hace la lectura al espectrofotómetro a 550 nm:
 - a) Blanco: se añaden en el siguiente orden, 0.650 ml de tampón fosfato, 50 μ l de citocromo C (56 μ M final) y 20 μ l ferricitocromo C (0.9 mM). Se invierte tres veces la cubeta y se esperan 5 min. Esta mezcla permite ajustar el cero de absorbancia.

b) Reacción: se añaden 0.650 ml de tampón fosfato y 50 μ l de citocromo C, y se invierte tres veces la cubeta para facilitar la mezcla. A continuación se adicionan 20 μ l de muestra biológica, invirtiendo la cubeta de reacción una sola vez para inmediatamente hacer la lectura al espectrofotómetro.

Es preciso, en la medida de lo posible, que transcurra siempre el mismo tiempo desde que se añade la muestra hasta que se realiza la lectura al espectrofotómetro.

El criterio de eliminación de un dato es el siguiente:

no se considera un valor menor al anterior en un porcentaje superior al 50 %.

$$Act\ total\ COX\ (\mu\ mol\ Cit\ ox./min/mg\ tej) = \frac{\Delta DO/min \times F \times 0.7}{18.5 \times 0.02 \times C \times 1}$$

18.5 (ml).(μ mol⁻¹).(cm^{-1}) = Coef. de extinción molar citocromo C

0.02 = Volumen de la muestra (ml)

C = Concentración del tejido en el homogenado (mg tej/ ml)

$$Act\ total\ COX\ (\mu\ mol\ Cit\ ox./min/mg\ prot) = \frac{\Delta DO/min \times F \times 0.7}{18.5 \times 0.02 \times C \times 1 \times X}$$

X = mg prot./mg tej.

2. Determinación de un antioxidante no enzimático: el glutatión

El contenido de glutatión total en muestras biológicas es determinado mediante un ensayo enzimático de reciclado basado en la glutatión reductasa (Griffith, 1980).

El glutatión es oxidado por 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) y es reducido por NADPH en presencia de glutatión reductasa. La tasa de formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico es monitorizado espectrofotométricamente a 412 nm, y el glutatión presente es evaluado mediante una curva patrón. El ensayo detecta glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y, posiblemente, glutatión unido a otros tioles solubles. El glutatión oxidado (GSSG) es determinado selectivamente por enmascaramiento del glutatión reducido (GSH) con 2-vinilpiridina (2-VP) (mejor reactivo que N-etilmaleimida (NEM) para la derivatización del glutatión). La glutatión reductasa no es inhibida significativamente por 2-VP,

y por consiguiente, el exceso de esta no necesita ser eliminado antes del ensayo en la muestra biológica. En contraste a NEM, 2-VP reacciona con el glutatión a valores de pH ligeramente ácidos, donde la formación espontánea de glutatión oxidado es mínima (Griffith, 1980).

Soluciones reactivas

- Tampón fosfato pH 7.4 con EDTA 6.3 mM.
- Ácido tricloroacético al 5% con ClH 0.01 N. Esta solución debe burbujearse con nitrógeno antes de su uso, durante 5 min. a 1l flujo/min.
- NADPH 0.3 mM.
- GR (20 U/ml).
- DTNB 6 mM.

Las tres últimas soluciones han de prepararse en el día de su utilización.

Método

- Homogenización de tejidos a 50 mg/ml (corteza cerebral a 25 mg/ml) con ácido tricloroacético (5%) que posee ácido clorhídrico 0.01 N.
- Centrifugación durante 5 min. a 3200 g (4°C).
- El extracto procedente de la centrifugación se divide en dos partes. Una de ellas nos permitirá valorar el glutatión total presente en la muestra. Y la otra, el glutatión oxidado, por adición inmediatamente de 2-vinilpiridina a concentración final de 1 M. Se agita vigorosamente, y el extracto se mantiene a 25°C en baño termostático, durante 1 hora.
- La lectura espectrofotométrica se realiza a 412 nm. Conviene seguir el siguiente orden al añadir los reactivos en la cubeta de reacción: NADPH, DTNB, muestra biológica, y finalmente GR.

Los valores de glutatión reducido son calculados a partir de la diferencia entre el glutatión total y el glutatión oxidado.

Al final debe realizarse también una valoración espectrofotométrica de la reacción sin adición de muestra biológica con el fin de evitar una sobrevaloración del glutatión existente y chequear el estado de los reactivos.

Por tanto, obtenemos un incremento de absorbancia que resulta de:

$$\Delta DO_{\text{reacción con muestra}} - \Delta DO_{\text{reacción sin muestra}} = \Delta DO$$

Este incremento de absorbancia (ΔDO) se utiliza para el cálculo del glutatión/g tejido.

Mediante la obtención de una curva patrón de glutatión ($y = a + bx$), siendo $y = \text{ng glutatión reducido}$ y $x = \Delta\text{DO}/\text{min}$, se hace el cálculo de la concentración de glutatión presente en la muestra.

$$\mu\text{M GSH/g tej} = \frac{(a + bx) \times F \times 20}{0.07 \times 10^6 \times 0.30733}$$

$$\mu\text{ GSH/g tej} = \frac{(a + b\text{DO}) \times F \times 20}{21513.1}$$

F = Factor de dilución de la muestra

20 = 1000 / 50. Al hacer la curva patrón, la solución madre de glutatión se diluye al 50% en cada medida (A 1 ml ó 1000 μ l de solución madre se añade 1 ml de tampón fosfato).

0.07 = Volumen de la muestra (ml)

10⁶ = Factor de conversión de ng a mg

0.30733 = El peso molecular (GSH) es de 307.33. Se multiplica este número por 10⁻³ para expresar la concentración de GSH como $\mu\text{M GSH}$.

Finalmente, obtuvimos el cociente GSSG/GSH como índice estimador del estrés oxidativo de los tejidos.

• Determinación de la peroxidación lipídica

La peroxidación de los tejidos se determina mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Uchiyama, 1978). Con esta técnica, se miden las sustancias reactivas al TBA expresadas en concentración de malondialdehído (MDA). El MDA es uno de los productos que se forman en las reacciones peroxidativas, y en presencia de TBA da lugar a la formación de un compuesto coloreado.

Se hacen dos tipos de determinación:

- Medida de los niveles de sustancias endógenas reactivas al TBA (TBARS) *in vivo*.
- Medida de la sensibilidad a la peroxidación estimulada *in vitro*.

TBA in vivo

Soluciones

- Acido fosfórico al 1%.
- TBA al 0.6%.
- BHT al 0.01% en etanol.

Metodología

- Homogenización de tejidos en tampón fosfato (50 mM, pH 7.4) a concentración de 50 mg tej./ml, excepto para cerebro, 25 mg tej./ml.
- Sonicación de los homogenados de tejido tres veces con intervalos de 20 s, durante 10 s cada vez.
- Centrifugación de los homogenados durante 20 min. a 3200 g (4°C).
- A una alícuota de muestra de 0.14 ml se adicionan en este orden: 1 ml ácido fosfórico 1%, 33 µl BHT 0.01%, y 0.3 ml TBA. (El BHT es un antioxidante, y se añade a la mezcla de reacción para evitar que se produzcan peroxidaciones adicionales de la muestra durante la fase de calentamiento, que por su magnitud, pueden constituir una sobreestimación en la determinación del daño peroxidativo).
- Se prepara además, un blanco con 0.14 ml de tampón fosfato (50 mM, pH 7.4), en lugar de muestra. Se procede del mismo modo que con las muestras.
- Los distintos tubos donde tiene lugar la reacción, se introducen en un baño a 100°C durante 45 min.
- Al cabo de este tiempo, se detiene la reacción mediante frío, introduciendo los tubos en hielo.
- A cada tubo se añaden 1.4 ml de alcohol n-butílico, y se agitan vigorosamente, para extraer con este solvente las sustancias reactivas al TBA. A continuación se centrifuga durante 15 min. a 3200 g (4°C). Finalmente se recoge la fase orgánica, y a partir de esta se hace la lectura espectrofotométrica a 535 nm (Se debe esperar un minuto antes de tomar la medida).

La realización de una curva patrón de malondialdehído (MDA) ($y = ax + b$), permite expresar los valores de absorbancia obtenidos para las distintas muestras a 535 nm, en concentración de MDA:

$$nM \text{ MDA } /g \text{ tej} = \frac{DO - a}{b} \times \frac{1}{C} \times \frac{1000}{0.14}$$

- 1 = Volumen de ácido fosfórico adicionado (1 ml)
 C = Concentración de tejido en el homogenado (mg/ml)
 0.14 = Volumen de muestra (ml)

TBA in vitro

La sensibilidad a la peroxidación *in vitro* es estimada por incubación de las muestras con ascorbato 0.4 mM y sulfato ferroso 0.05 mM, durante 30-60 min. (dependiendo del tejido) a 25°C, antes de llevar a cabo el ensayo de TBA.

Soluciones

- Sulfato ferroso 0.2 mM.
- Ascorbato 1.6 mM.

Metodología

- En distintos tubos de ensayo, se adicionan en el siguiente orden: 170 μ l SO₄Fe, 170 μ l ascorbato, y 340 μ l de muestra. Esta mezcla se incuba a 25°C con agitación, durante 30 min. si es corteza cerebral, o 60 min. si es hígado.
- Pasado este tiempo, se extrae respectivas alcuotas de muestra de 0.14 ml, y se adicionan en tubos que contiene 1 ml de ácido fosfórico.
- A continuación se añaden BHT y TBA, siguiendo el mismo protocolo que en el TBA *in vivo*. (En la realización de los cálculos, la DO final obtenida se multiplica por 2).

En el test *in vivo*, también reaccionan con el TBA otras muchas sustancias endógenas como aldehídos, azúcares, pentosas, etc., por lo que su interpretación se hace dificultosa.

Sin embargo, el test *in vitro*, si puede representar la sensibilidad global del tejido a la peroxidación. Al inducirse peroxidación lipídica, se producen en mayor concentración MDA, hidroperóxidos orgánicos, etc. (positivos al TBA), de modo que una interferencia inicial de un 40% aproximadamente en el test *in vivo*, puede quedar minimizada a un 4% en los valores del test *in vitro*.

3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

(Tallarida, 1987)

a) *Test t de Student*

Se ha utilizado en las pruebas de "captación" *in vitro* para comparar la actividad del compuesto problema respecto de la reacción control. El nivel de mínima diferencia significativa seleccionado ha sido de $p < 0.05$.

b) Análisis de varianza (ANOVA)

En el análisis de resultados de los ensayos de comportamiento, hemos hecho previamente una ANOVA de una vía para conocer la influencia de la edad y del tratamiento, independientemente. Y de dos vías con el fin de determinar si hay variación significativa respecto de la edad y del tratamiento simultáneamente.

De igual forma hemos procedido en el estudio estadístico de los resultados de antioxidantes enzimáticos.

En todos los casos se seleccionó el nivel $p < 0.05$ como el punto de mínima diferencia significativa en cada comparación.

c) *Test de Newman-Keuls*

Cuando el estudio estadístico mediante ANOVA ha sido significativo, se ha aplicado el test de Newman-Keuls de comparación múltiple, y a partir de él hemos destacado las diferencias significativas de los distintos tratamientos respecto de la ausencia de tratamiento, tanto en ensayos de comportamiento como en las medidas de antioxidantes y TBA.

Se seleccionó el nivel $p < 0.05$ como el punto de mínima diferencia significativa en cada comparación.

d) *Test no paramétrico de Mann-Whitney*

Este test es particularmente utilizado en la investigación farmacológica para comparar los efectos comportamentales de un grupo tratado con un fármaco, frente a un grupo control no tratado. En este caso no se conoce la distribución de la población a la que pertenecen las muestras.

Este test agrupa todos los datos de las muestras que intervienen en el análisis, en un único grupo, y los ordena de menor a mayor. Y de este modo, compara las sumas de los rangos de los animales correspondientes a cada uno de los grupos. Bajo la hipótesis nula, el test supone que las sumas son coincidentes y que las pequeñas desviaciones son debidas al azar.

Se seleccionó el nivel $p < 0.100$ como el punto de mínima diferencia significativa en cada comparación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RESULTADOS *IN VITRO*

1.1. Sistema generador de anión superóxido

1.2. Sistema generador de radical hidroxilo

1.3. Sistema generador de peróxido de hidrógeno

1.4. Peroxidación lipídica microsomal

1.1. Sistema generador de anión superóxido

1.1.1. Autoxidación del pirogalol

Los porcentajes de inhibición de la autoxidación del pirogalol obtenidos para cada una de las distintas cumarinas, aparecen en la Tabla I.

Los compuestos cumarínicos orto-dihidroxiados se comportaron como inhibidores selectivos del anión superóxido; pero la introducción de un grupo metilo en posición 4 del núcleo estructural de cumarina, anuló la actividad *scavenger* de estos compuestos (4-metilesculetina, 4-metildafnetina), para producir como consecuencia un efecto pro-oxidante.

Fraxetina, y escopoletina (ambos compuestos poseen un sustituyente metoxi en posición 6) se comportaron de modo similar como inhibidores de la autoxidación del pirogalol (Fig. 1).

La generación de anión superóxido procedente de la oxidación del pirogalol, fue prácticamente inhibida por la SOD a concentración de 1.56×10^{-3} mg/ml (5.86 U/ml). Miricetina (flavonoide utilizado como patrón por su conocida actividad antioxidante y por su analogía estructural con cumarinas) (Laughton, 1989; Rankin, 1993) ejerce una inhibición de 69.59 ± 1.23 a concentración de $20 \mu\text{M}$.

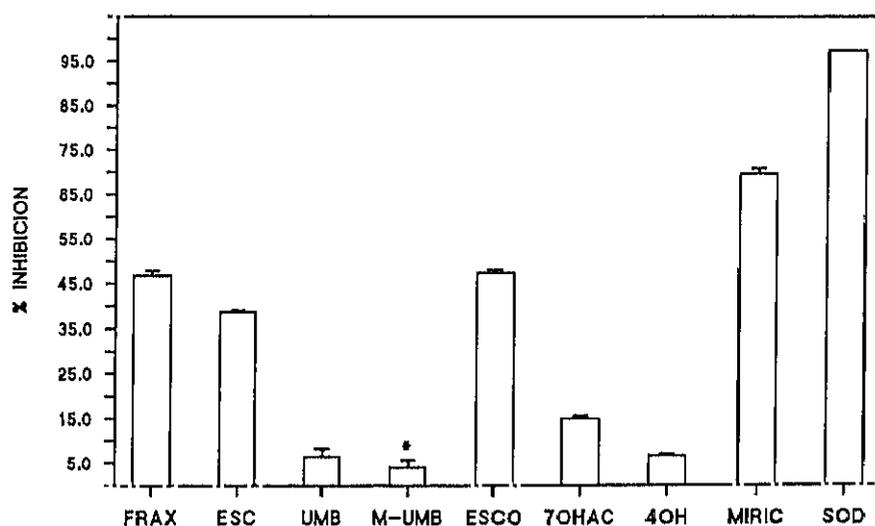


Fig. 1. Porcentaje de inhibición de la autoxidación del pirogalol
($p < 0.01$ excepto * NS, para *t-Student*).

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la autoxidación del pirogalol

| CUMARINA | % INHIBICIÓN \pm ESM (1 mM) |
|--|-------------------------------|
| 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina | 46.86 \pm 1.11* |
| 6,7-dihidroxicumarina | 38.70 \pm 0.39* |
| 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina | -23.13 \pm 1.05** |
| 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina | 0.35 \pm 0.98 |
| 7-hidroxi-6-glucosilcumarina | -59.43 \pm 2.97** |
| 7-hidroxicumarina | 6.51 \pm 1.68* |
| 7-hidroxi-4-metilcumarina | 4.07 \pm 1.65 |
| 7-hidroxi-6-metoxicumarina | 47.45 \pm 0.70* |
| Ácido 7-hidroxicumarín-4-acético | 15.01 \pm 0.52* |
| 7-metoxicumarina | -1.55 \pm 1.03 |
| 4-hidroxicumarina | 6.62 \pm 0.32* |
| 6,7-dimetoxicumarina | -0.95 \pm 2.41 |
| Ácido cumarín-3-carboxílico | 0.43 \pm 0.18 |
| 7-metilcumarina | -1.22 \pm 2.19 |
| 6-metilcumarina | -1.59 \pm 1.56 |
| 7-hidroxi-3,4,8-trimetilcumarina(=) | -5.25 \pm 1.91 |
| 7-amin-4-metilcumarina(=) | -4.21 \pm 2.19 |
| 7-dimetilamin-4-metilcumarina(=) | -4.49 \pm 3.93 |
| 7-dimetilamin ciclopenta(C)cumarina(=) | -19.76 \pm 2.62 |

Compuestos de referencia:

- % Inh. (SOD 1.56×10^{-3} mg/ml = 5.86 U/ml) = 97.29 \pm 0.13*

- % Inh. (Miricetina 20 μ M) = 69.59 \pm 1.23*

Los resultados muestran el valor de la media \pm ESM de seis ensayos.

El estudio estadístico se hizo aplicando el test de la *t de Student* para muestras no apareadas.

* Los resultados indican valores decrecientes significativamente, respecto de la reacción control ($p < 0.01$).

** Indica valores crecientes significativamente, respecto de la reacción control ($p < 0.01$).

(=) Estas cumarinas han sido ensayadas a concentración 0.1 mM porque a 1 mM precipitan en la mezcla de reacción.

1.1.2. NADH-fenazina metosulfato-O₂-azul de nitrotetrazolio

Las cumarinas ensayadas por su inhibición en la reducción del NBT, y los resultados obtenidos, aparecen en la Tabla 2.

La inhibición máxima (85.62 ± 0.10) de la reducción del NBT por la SOD se alcanza a concentraciones de la misma, mayores que en el sistema de autooxidación del pirogalol. Miricetina, al igual que SOD, ha mostrado menor actividad antioxidante en este sistema (58.88 ± 1.01) que en el anterior, a $20 \mu\text{M}$, aunque el porcentaje de máxima inhibición (97.43 ± 0.18) se ha alcanzado a concentración de 0.1 mM .

Los resultados obtenidos sugieren la importancia de una función orto-dihidroxi en la estructura de cumarina para la actividad *scavenger* (fraxetina, 4-metildafnetina, 4-metil-esculetina y esculetina) (Fig. 2).

El bloqueo de un OH activo por glicosilación es desfavorable para la actividad *scavenger*. Este fenómeno puede observarse comparando esculetina con esculina.

Las cumarinas monohidroxiladas mostraron menor potencia inhibitoria. La introducción de grupos metilo en 7-hidroxicumarinas, disminuye la potencia de los compuestos resultantes. Así ocurre con 4-metilumbeliferona y 7-hidroxi-3,4,8-trimetilcumarina. Por el contrario, la introducción de grupos ácidos incrementa el efecto inhibitorio (ácido 7-hidroxicumarín-4-acético).

Cumarinas metiladas, metoxiladas y con sustituyentes amfínicos, respectivamente, se comportaron de forma pro-oxidante.

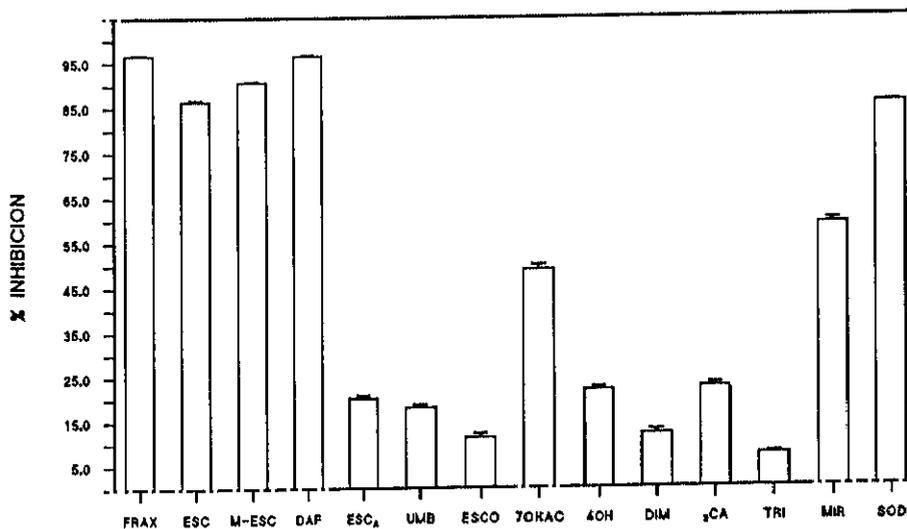


Fig. 2. Porcentaje de inhibición de la reducción del NBT.

($p < 0.01$ en todos los casos para *t-Student*).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la reducción del NBT.

| CUMARINA | % INHIBICIÓN (1mM) |
|--|--------------------|
| 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina | 96.66 ± 0.12 |
| 6,7-dihidroxicumarina | 86.41 ± 0.34 |
| 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina | 90.65 ± 0.24 |
| 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina | 96.45 ± 0.19 |
| 7-hidroxi-6-glucosilcumarina | 20.27 ± 0.63 |
| 7-hidroxicumarina | 18.19 ± 0.69 |
| 7-hidroxi-4-metilcumarina | -1.66 ± 1.41* |
| 7-hidroxi-6-metoxicumarina | 11.32 ± 0.97 |
| Ácido 7-hidroxicumarín-4-acético | 49.02 ± 1.01 |
| 7-metoxicumarina(=) | -5.86 ± 0.49* |
| 4-hidroxicumarina | 22.02 ± 0.66 |
| 6,7-dimetoxicumarina(=) | 12.04 ± 0.99 |
| Ácido cumarín-3-carboxílico | 22.56 ± 0.86 |
| 7-metilcumarina(=) | -10.07 ± 0.89* |
| 6-metilcumarina(=) | -17.99 ± 0.15* |
| 7-hidroxi-3,4,8-trimetil(=) cumarina | 7.31 ± 0.35 |
| 7-amin-4-metilcumarina(=) | -3.42 ± 0.23* |
| 7-dimetilamin-4-metil cumarina(=) | -6.21 ± 0.58* |
| 7-dimetilaminciclopenta(C) cumarina(=) | -3.85 ± 0.25* |

Compuestos de referencia:

- % Inh. (SOD $3.23 \cdot 10^{-3}$ mg/ml = 12.10 U/ml) = 85.62 ± 0.10

- % Inh. (Miricetina 0.1 mM) = 97.43 ± 0.18

% Inh. (miricetina 20 μM) = 58.88 ± 1.01

Los resultados muestran el valor de la media ± ESM de seis ensayos. El estudio estadístico se ha realizado aplicando el test de la *t de Student* para muestras no apareadas.

Todos los resultados indican valores decrecientes significativamente, respecto de la reacción control ($p < 0.01$).

* Indica valores crecientes significativamente, respecto del control ($p < 0.01$).

(=) Estas cumarinas se han ensayado a concentración 0.1 mM ya que a 1 mM precipitan en la cubeta de reacción.

1.2. Sistema generador de radical hidroxilo:

Ácido ascórbico-hierro-EDTA

Los resultados de interacción de estas cumarinas con el radical hidroxilo se presentan en la Tabla 3.

A concentración 1 mM del compuesto cumarínico, la estimulación de la generación de $\cdot\text{OH}$ por el sistema hierro-EDTA, fue inhibida ($p < 0.05$) únicamente por tres cumarinas: 4-hidroxicumarina, escopoletina y ácido cumarín-3-carboxílico.

Para la actividad *scavenger* de radicales hidroxilo se han requerido, en general, dosis más elevadas de cumarina, 5 mM, (Fig. 3) que en los demás sistemas generadores de radicales.

Casi todas las cumarinas mostraron ser significativamente más potentes que el manitol, conocido *scavenger* de radicales hidroxilo. Este fenómeno podría ser atribuido a que las cumarinas sean efectivos agentes quelantes de hierro.

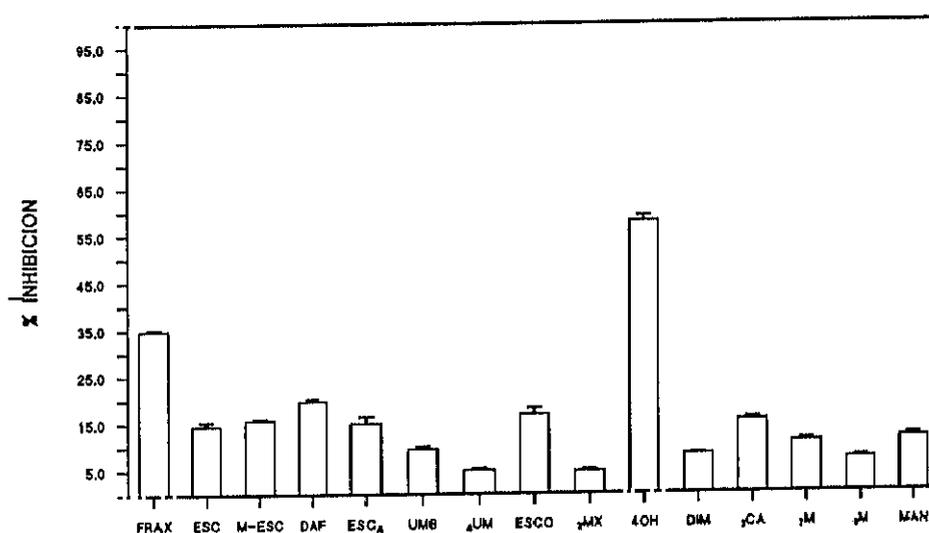


Fig. 3. Porcentaje de inhibición de la producción de formaldehído a concentración 5 mM de cumarina ($p < 0.05$ en todos los casos para *t-Student*).

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la producción de formaldehído.

| CUMARINA | % INHIBICIÓN | |
|-------------------------------------|---------------|---------------|
| | 1 mM | 5mM |
| Fraxetina | 2.98 ± 3.71 | 34.80 ± 0.37* |
| Esculetina | 7.11 ± 1.09 | 14.43 ± 0.92* |
| 4-metilesculetina | 6.6 ± 1.21 | 15.75 ± 0.32* |
| 4-metildafnetina | 7.01 ± 2.06 | 19.71 ± 0.54* |
| Esculina | 3.15 ± 1.32 | 15.02 ± 1.46* |
| Umbeliferona | 1.12 ± 1.09 | 9.45 ± 0.62* |
| 4-metilumbeliferona | -3.45 ± 2.18 | 5.05 ± 0.34* |
| Escopoletina | 6.61 ± 0.28* | 16.85 ± 1.42* |
| Ác. 7-hidroxi cumarín-4-acético | -1.61 ± 0.97 | 4.76 ± 0.61 |
| 7-metoxicumarina | 2.79 ± 0.57 | 4.76 ± 0.33* |
| 4-hidroxycumarina | 16.35 ± 1.15* | 57.86 ± 1.17* |
| 6,7-dimetoxicumarina | -1.87 ± 1.75 | 8.28 ± 0.22* |
| Ác. cumarín-3-carboxílico | 6.30 ± 0.55* | 15.38 ± 0.62* |
| 7-metilcumarina | 0.38 ± 1.24 | 10.77 ± 0.47* |
| 6-metilcumarina | 1.88 ± 1.42 | 7.18 ± 0.27* |
| 7-hidroxi-3,4,8-trimetilcumarina | -5.10 ± 0.78 | 2.27 ± 1.34 |
| 7-amin-4-metilcumarina | -2.45 ± 1.30 | 6.59 ± 2.44 |
| 7-dimetilamin-4-metilcumarina | -7.10 ± 1.65 | NE |
| 7-dimetilamin ciclopenta(c)cumarina | -20.93 ± 9.53 | NE |

Compuesto de referencia:

% Inh. (Manitol 1 mM) = -0.13 ± 1.63

% Inh. (Manitol 5 mM) = 11.56 ± 0.70*

Los resultados muestran el valor de la media ± ESM de seis ensayos.

NE, cumarina no ensayada a esa concentración porque precipita en la cubeta de reacción.

El estudio estadístico se ha realizado mediante el test de la *t de Student* para muestras no apareadas.

* Indica valores significativamente menores respecto del control (p < 0.05).

1.3. Sistema generador de peróxido de hidrógeno:

NADPH-microsomas hepáticos

Los resultados de inhibición de la formación de peróxido de hidrógeno, a partir de microsomas hepáticos, se muestran en la Tabla 4.

Las cumarinas, en general, disminuyeron la tasa de formación del tiocianato férrico. La sustitución en las posiciones 6,7,8 en el núcleo de cumarina es una condición estructural favorable para la actividad *scavenger*.

4-metildafnetina y fraxetina son los compuestos con mayor capacidad inhibitoria, no sólo por los porcentajes de inhibición alcanzados, sino porque además fueron ensayados a concentraciones más bajas, al igual que esculina y umbeliferona, que el resto de las cumarinas.

La introducción de sustituyentes metilo en las posiciones 3,4,8 no es desfavorable para la actividad (Fig. 4).

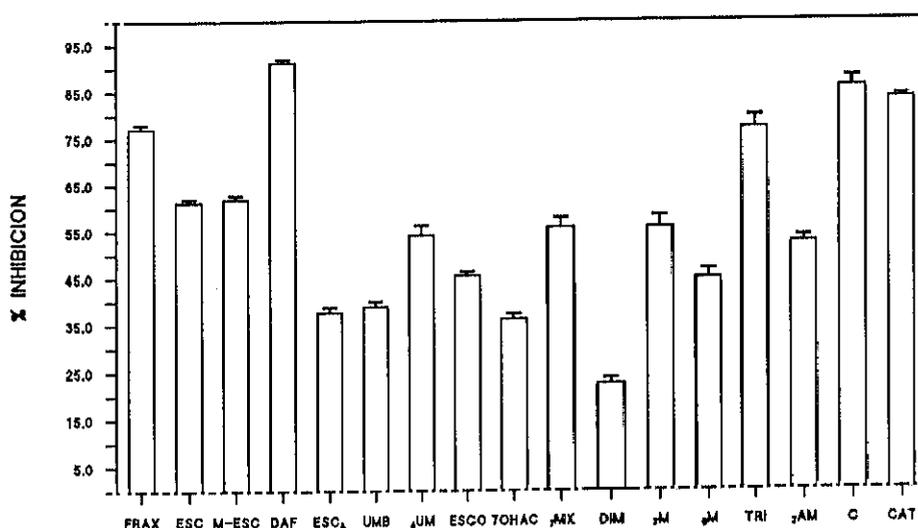


Fig. 4. Porcentaje de inhibición de la producción de peróxido de hidrógeno ($p < 0.05$ en todos los casos para *t-Student*).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la formación de peróxido de hidrógeno.

| CUMARINA | % INHIBICIÓN (1 mM) |
|-----------------------------------|---------------------|
| 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina(=) | 77.07 ± 0.98* |
| 6,7-dihidroxicumarina | 61.20 ± 0.85* |
| 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina | 61.75 ± 1.01* |
| 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina(=) | 91.08 ± 0.76* |
| 7-hidroxi-6-glucosilcumarina(=) | 37.58 ± 1.20* |
| 7-hidroxicumarina(=) | 38.85 ± 1.12* |
| 7-hidroxi-4-metilcumarina | 54.10 ± 2.03* |
| 7-hidroxi-6-metoxicumarina | 45.36 ± 0.89* |
| Ácido 7-hidroxicumarín-4-acético | 36.07 ± 1.22* |
| 7-metoxicumarina | 55.74 ± 2.00* |
| 4-hidroxicumarina | -3.28 ± 1.39 |
| 6,7-dimetoxicumarina | 22.41 ± 1.29* |
| Ácido cumarín-3-carboxílico | 6.01 ± 2.30 |
| 7-metilcumarina | 55.73 ± 2.45* |
| 6-metilcumarina | 44.81 ± 1.96* |
| 7-hidroxi-3,4,8-trimetilcumarina | 77.05 ± 2.54* |
| 7-amin-4-metilcumarina | 52.46 ± 1.35* |
| 7-dimetilamin-4-metilcumarina | NE |
| 7-dimetilaminciclopenta(c)cumarin | 85.79 ± 2.12* |

Compuesto de referencia:

$$\% \text{ Inh. (Catalasa bovina 1000 U/ml)} = 83.24 \pm 0.68^*$$

Los resultados muestran la media ± ESM para tres ensayos.

NE, cumarina no ensayada porque a esa concentración no es posible la lectura espectrofotométrica.

El estudio estadístico se ha realizado mediante el test de la *t de Student* para muestras no apareadas.

* Indica valores significativamente menores respecto de la reacción control ($p < 0.05$).

(=) El ensayo para estas cumarinas se realizó a concentración 0.1 mM, ya que a 1 mM precipitan en la mezcla de reacción.

1.4. Peroxidación lipídica microsomal:

Sistema ácido ascórbico-catión ferroso

La habilidad de estas cumarinas para inhibir la peroxidación lipídica no enzimática en microsomas hepáticos, inducida por el sistema ácido ascórbico/ Fe^{2+} , aparece en la Tabla 5.

Cumarinas con dos grupos hidroxilo libres poseen actividad inhibitoria significativa. Nuestros resultados muestran que estos compuestos fenólicos tienen una buena actividad quelante de hierro y por ello son capaces de eliminarlo del medio.

Fraxetina, esculetina, 4-metilesculetina y 4-metildafnetina son inhibidores selectivos de la peroxidación lipídica hierro dependiente (más potentes que el patrón utilizado, BHT) debido a la formación de complejos inertes de hierro.

El bloqueo de un grupo OH activo por metoxi o glicosilación disminuye la potencia inhibitoria (esculina, escopoletina).

La introducción de un grupo amino en posición 7 del esqueleto de cumarina, puede ser una cualidad estructural favorable para la actividad inhibitoria mostrada por tales compuestos, como es el caso de la 7-dimetilamín-ciclopenta(c)cumarina (Fig. 5).

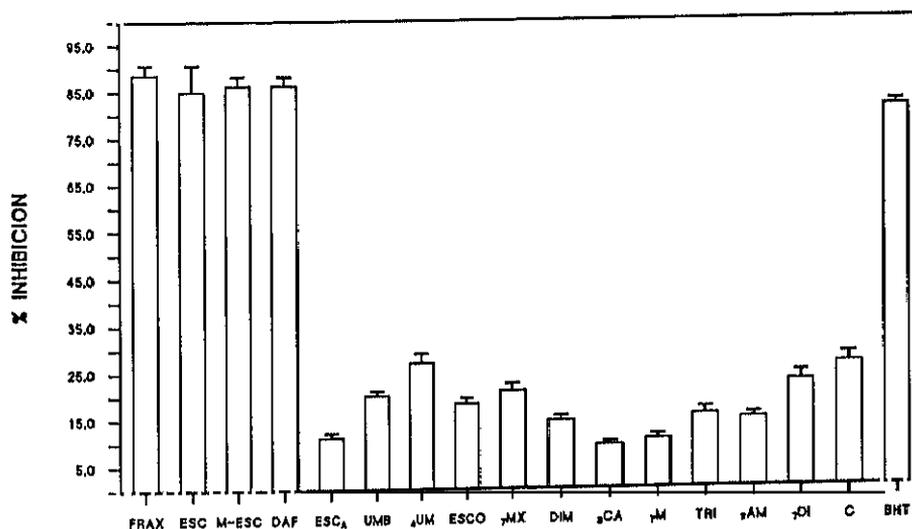


Fig. 5. Porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica.

($p < 0.05$ en todos los casos para *t-Student*).

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica microsomal.

| CUMARINA | % INHIBICIÓN (1 mM) |
|-----------------------------------|---------------------|
| 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina | 88.47 ± 2.08 |
| 6,7-dihidroxicumarina | 84.91 ± 5.73 |
| 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina | 86.16 ± 2.09 |
| 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina | 86.16 ± 1.98 |
| 7-hidroxi-6-glucosilcumarina | 11.05 ± 1.02 |
| 7-hidroxicumarina | 20.04 ± 1.04 |
| 7-hidroxi-4-metilcumarina | 26.91 ± 2.08 |
| 7-hidroxi-6-metoxicumarina | 18.25 ± 1.22 |
| Ácido 7-hidroxicumarín-4-acético | 6.50 ± 2.01* |
| 7-metoxicumarina | 20.85 ± 1.54 |
| 4-hidroxicumarina | 12.70 ± 1.56* |
| 6,7-dimetoxicumarina | 14.51 ± 1.07 |
| Ácido cumarín-3-carboxílico | 9.23 ± 0.69 |
| 7-metilcumarina | 10.41 ± 1.01 |
| 6-metilcumarina | 4.92 ± 1.76* |
| 7-hidroxi-3,4,8-trimetilcumarina | 15.62 ± 1.45 |
| 7-amin-4-metilcumarina | 14.78 ± 0.98 |
| 7-dimetilamin-4-metilcumarina | 22.64 ± 2.00 |
| 7dimetilaminciclopenta(c)cumarina | 26.37 ± 2.09 |

Compuesto de referencia:

$$\% I (\text{BHT } 1 \text{ mM}) = 81.02 \pm 1.03^*$$

Los resultados muestran la media ± ESM para tres ensayos.

El estudio estadístico se ha realizado mediante el test de la *t de Student* para muestras no apareadas.

Todos los resultados indican valores significativamente menores respecto de la reacción control ($p < 0.05$).

* Indica valores no significativos.

Finalmente, y a modo de resumen, exponemos los resultados obtenidos con las 19 cumarinas en los distintos sistemas generadores de EAO (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad *scavenger* de EAO de las cumarinas ensayadas.

| | CUMARINA | Autox. pirogalol (O ⁻²) | Reducción NBT (O ⁻²) | Oxidación DMSO (·OH) | Formación (SNC) ₃ Fe (H ₂ O ₂) | Peroxidac. Lipídica |
|----|-------------------------------|---|--|----------------------------|--|------------------------|
| 1 | Fraxetina | +++ | ++++++ | +++ | +++++ | +++++ |
| 2 | Esculetina | +++ | ++++++ | ++ | +++++ | +++++ |
| 3 | 4-metilesculetina | - | ++++++ | ++ | +++++ | +++++ |
| 4 | 4-metildafnetina | - | ++++++ | ++ | ++++++ | +++++ |
| 5 | Esculina | - | ++ | ++ | +++ | + |
| 6 | Umbeliferona | + | ++ | + | +++ | ++ |
| 7 | 4-metilumbeliferona | - | - | + | ++++ | ++ |
| 8 | Escopoletina | +++ | + | ++ | +++ | ++ |
| 9 | Ác. 7-OH-cumarín-4-acético | + | ++++ | - | +++ | - |
| 10 | 7-metoxicumarina | - | - | + | ++++ | ++ |
| 11 | 4-hidroxycumarina | + | ++ | ++++ | - | - |
| 12 | 6,7-dimetoxicumarina | - | + | + | ++ | ++ |
| 13 | Ác. cumarín-3-carboxílico | - | ++ | ++ | - | + |
| 14 | 7-metilcumarina | - | - | + | ++++ | + |
| 15 | 6-metilcumarina | - | - | + | +++ | - |
| 16 | 7-OH-3,4,8-trimetilcumarina | - | + | - | +++++ | ++ |
| 17 | 7-amin-4-metilcumarina | - | - | - | ++++ | ++ |
| 18 | 7-dimetilamin-4-metilcumarina | - | - | NE | NE | ++ |
| 19 | 7dimetilaminciclop(c)cumarina | - | - | NE | ++++++ | ++ |

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS *IN VITRO*

La implicación de las EAO en el daño tisular y en el estrés oxidativo asociado al envejecimiento, y por otro lado, las múltiples actividades biológicas que presentan las cumarinas, nos ha sugerido el estudio previo de la actividad *scavenger in vitro* de estos compuestos fenólicos.

Se ha estudiado la influencia de **19 cumarinas** (de origen natural y sintético) en la formación y "captación" de EAO (Tabla 6).

La actividad "captadora" de **anión superóxido** por parte de estas cumarinas, se ha establecido siguiendo dos métodos.

Cumarinas con el grupo catecol (fraxetina y esculetina) disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) la concentración de anión superóxido detectable, en ambos sistemas.

La acción *scavenger* de estas cumarinas fue mayor en el sistema fenazina metosulfato que en la autooxidación del pirogalol, a la misma concentración de compuesto cumarínico. Es posible que sea debido a que en el primer caso se generan también otras especies de radicales (Halliwell, 1989), mientras que en el segundo existe prácticamente una generación exclusiva de anión superóxido (Marklund, 1974).

Algunas cumarinas mostraron propiedades pro-oxidantes en ambos sistemas, pudiendo atribuirse al hecho de que sufran autooxidación cuando son adicionadas a un medio de reacción acuoso (Kostyuk, 1989; Laughton, 1989).

La adición de EDTA y hierro-EDTA incrementa la oxidación del dimetilsulfóxido al interactuar con el **radical hidroxilo** (agente "captador" de radical hidroxilo) (Feierman, 1983). La inhibición significativa de la oxidación del dimetilsulfóxido en presencia de hierro-EDTA requiere concentraciones elevadas de cumarina. Sin embargo, tres de ellas, a la concentración menor ensayada, 1 mM, mostraron inhibición significativa de la producción de formaldehído: 4-hidroxycumarina, escopoletina y ácido cumarín-3-carboxílico. Estos resultados podrían ser atribuidos a las características estructurales de estas cumarinas que hacen posible la quelación de iones hierro y así competir con el EDTA.

Por otra parte, hemos ensayado la interacción de estas cumarinas con el **peróxido de hidrógeno**. Un posible mecanismo de acción de estos compuestos podría ser la conveniente distribución electrónica derivada de su estructura química, para reaccionar con el peróxido de hidrógeno, o una suficiente solubilidad lipídica que facilita el acceso a las estructuras lipídicas y que disminuye la incorporación de oxígeno NADPH-dependiente a los microsomas hepáticos.

La deplección de NADPH hace a las células más vulnerables al daño oxidativo (Sasame, 1979). Ya que las cantidades de NADPH oxidado a NADP^+ disminuyen por adición de cumarinas en la mezcla de reacción, se podría sugerir que estos compuestos resultarían efectivos antihepatotóxicos *in vivo*.

La sustitución orto-dihidroxi en el núcleo de cumarina (grupo catecol) parece ser condición estructural para la actividad **inhibidora de la peroxidación lipídica**, debido al efecto quelante de iones hierro mediante la formación de complejos inertes de hierro incapaces de iniciar dicha peroxidación. El bloqueo de un grupo OH activo por metoxilación o glicosilación es desfavorable para la actividad. La relación estructura-actividad de cumarinas metiladas y metoxiladas es diferente a la de cumarinas hidroxiladas, lo que hace suponer un diferente mecanismo de acción.

La introducción de grupos metilo y metoxilo implica un cambio en las características estructurales antiperoxidativas, y una disminución de la hidrofilia de la molécula que puede favorecer el acceso a las estructuras lipídicas microsomales. Así, cumarinas metiladas y metoxiladas pueden ser consideradas como inhibidores de la peroxidación lipídica no enzimática.

A partir de estos estudios *in vitro*, seleccionamos los compuestos cumarínicos que han presentado mayor espectro de actividad inhibitoria en los distintos sistemas generadores de radicales. Y, ya que la peroxidación lipídica es un fenómeno frecuente en la célula, y está relacionado con funciones fisiológicas, *turnover* y patología de numerosos orgánulos celulares, es quizás el método de estudio de elección para la selección de las cumarinas.

La efectividad de **fraxetina** y **esculetina** como antioxidantes en los distintos ensayos bajo distintas condiciones *in vitro*, nos sugiere proponer estas cumarinas como agentes atractivos para una ulterior evaluación clínica como antioxidantes. Es por ello necesario, confirmar los resultados experimentales *in vitro* mediante estudios *in vivo*, que incluyan la administración de estos compuestos cumarínicos a animales de experimentación.

3. RESULTADOS *IN VIVO*

3.1. RESULTADOS DE COMPORTAMIENTO

A. / Test de la cuerda

El fracaso del ratón para alcanzar uno de los polos de la cuerda, bien por caída, bien por no progresar lo suficiente hacia el extremo en el tiempo permitido de 1 min., es calificado como negativo en dicha prueba. Entonces, se le da una segunda oportunidad.

Los resultados pueden expresarse como **porcentaje de ratones que han alcanzado un polo** en una de las dos oportunidades ofrecidas en el mismo día. Sin embargo, con el fin de minimizar la influencia favorable del peso corporal ligero en la calificación, es más ventajoso expresar los resultados como **biomasa transportada**. Este valor se halla dividiendo la suma del peso corporal de todos los ratones que han sido calificados como positivos (+) en cada grupo de edad y tratamiento, por el número total de ratones ensayados (incluyendo los que no han tenido éxito en el test) de ese grupo.

BIOMASA TRANSPORTADA = peso (g) ratones (+)/nº total de ratones

Esta prueba se ha realizado una vez por semana, durante los 35 días de tratamiento.

Los valores de biomasa transportada obtenidos para cada grupo de edad y tratamiento en las cinco semanas consecutivas, se indican a continuación en las siguientes tablas:

- Las tablas 1-3 permiten conocer las variaciones en la biomasa transportada dependientes del tratamiento y de la semana en que se realiza el test, para un mismo grupo de edad.
- Las tablas 4-8 expresan las variaciones en función de la edad y del tratamiento.

Tabla 1. Biomasa transportada.- Ratonés C57BL/6J 12 meses.

| BIOMASA TRANSPORTADA - EDAD DE 12 MESES | | | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1 ^a SEMANA | 2 ^a SEMANA | 3 ^a SEMANA | 4 ^a SEMANA | 5 ^a SEMANA |
| CONTROL | 21.862 | 26.823 | 21.269 | 28.892 | 24.023 |
| FRAXETINA | 22.473 | 23.033 | 23.713 | 25.867 | 27.940 |
| ESCULETINA | 18.689 | 21.211 | 28.000 | 25.167 | 25.656 |
| BHT | 17.460 | 19.950 | 20.380 | 22.650 | 22.650 |

Para ANOVA de dos vías, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) dependientes del tiempo (de la semana) pero no del tratamiento (Fig. 1).

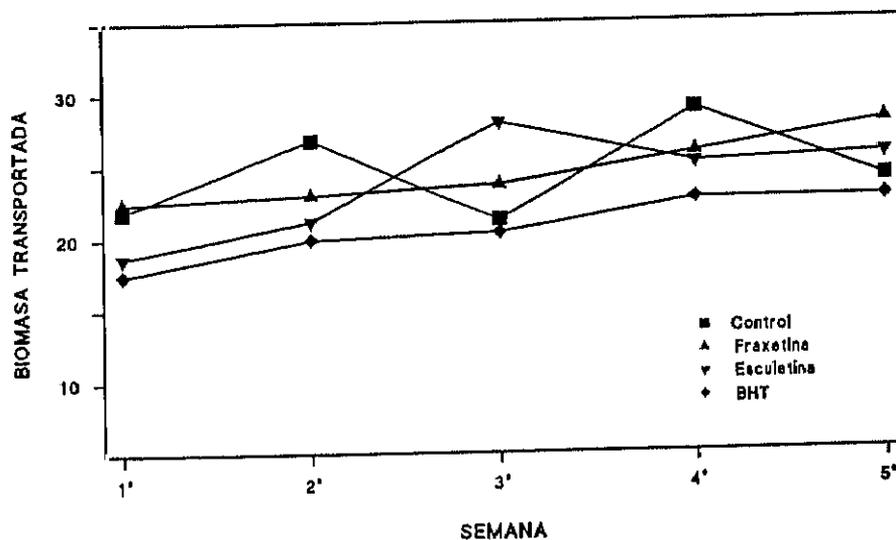


Fig. 1. Biomasa transportada en las distintas semanas en que se realiza el test. Ratón C57BL/6J de 12 meses.

Tabla 2. Biomasa transportada.- Ratonés C57BL/6J 18 meses.

| BIOMASA TRANSPORTADA - EDAD DE 18 MESES | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
| | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA |
| CONTROL | 16.393 | 20.800 | 27.167 | 25.058 | 24.580 |
| FRAXETINA | 12.090 | 18.780 | 23.978 | 22.000 | 22.820 |
| ESCULETINA | 29.230 | 29.180 | 29.180 | 29.180 | 29.180 |
| BHT | 17.800 | 30.100 | 24.100 | 27.100 | 26.778 |

Para ANOVA de dos vías, existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos y entre las sucesivas semanas, a $p < 0.05$ (Fig. 2).

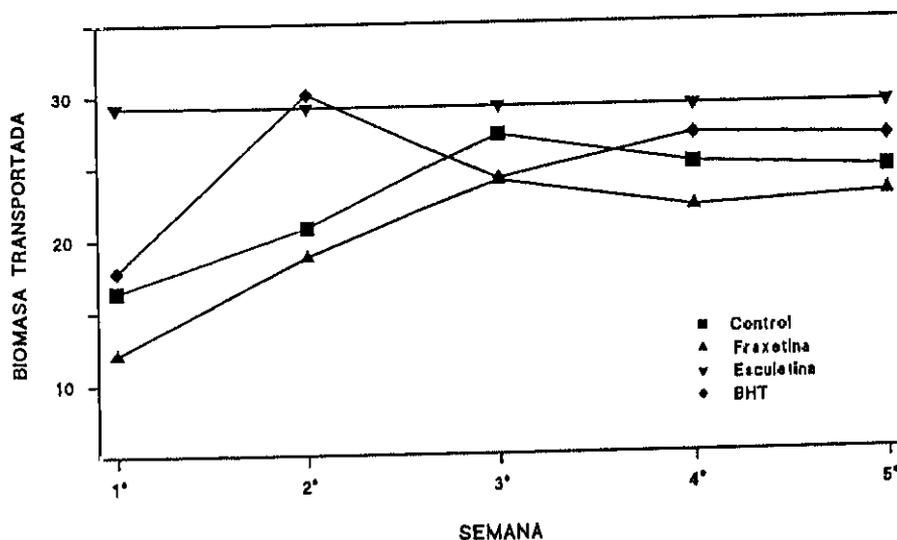


Fig. 2. Biomasa transportada en las distintas semanas en que se realiza el test. Ratón C57BL/6J de 18 meses.

Tabla 3. Biomasa transportada.- Ratonés C57BL/6J 21 meses.

| BIOMASA TRANSPORTADA - EDAD DE 21 MESES | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
| | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA |
| CONTROL | 23.210 | 25.550 | 22.930 | 28.350 | 22.780 |
| FRAXETINA | 18.350 | 18.270 | 27.000 | 27.310 | 26.980 |
| ESCULETINA | 14.767 | 18.467 | 25.833 | 25.833 | 29.338 |
| BHT | 12.240 | 15.000 | 21.340 | 21.290 | 21.290 |

Para ANOVA de dos vías, existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos a $p < 0.01$, y entre las distintas semanas a $p < 0.05$ (Fig. 3).

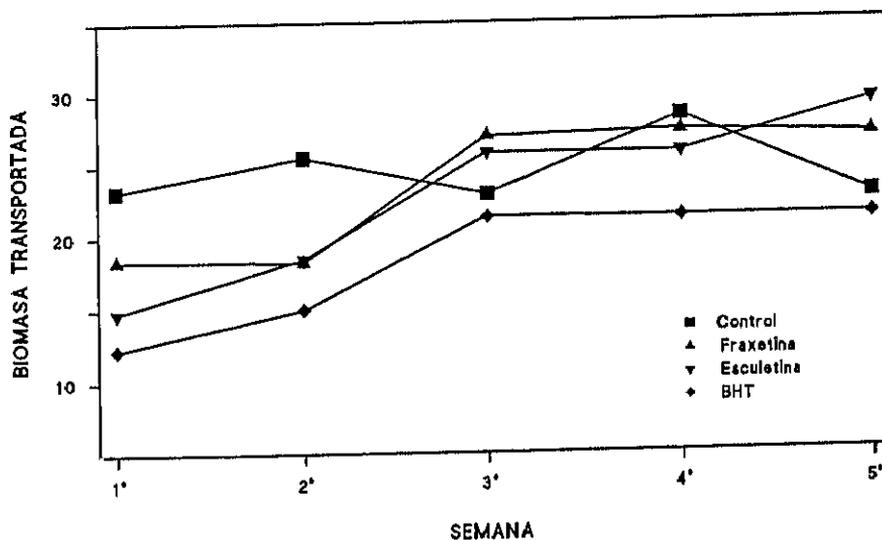


Fig. 3. Biomasa transportada en las distintas semanas en que se realiza el test. Ratón C57BL/6J de 21 mes.

Tabla 4. Biomasa transportada. - Ratones C57BL/6J 1ª semana.

| BIOMASA TRANSPORTADA - PRIMERA SEMANA DEL TEST | | | |
|--|----------|----------|----------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 21.862 | 16.393 | 23.210 |
| FRAXETINA | 22.473 | 12.090 | 18.350 |
| ESCULETINA | 18.689 | 29.230 | 14.767 |
| BHT | 17.460 | 17.800 | 12.240 |

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas entre los distintos **tratamientos** ni entre los tres grupos de edad a $p < 0.05$ (Fig. 4).

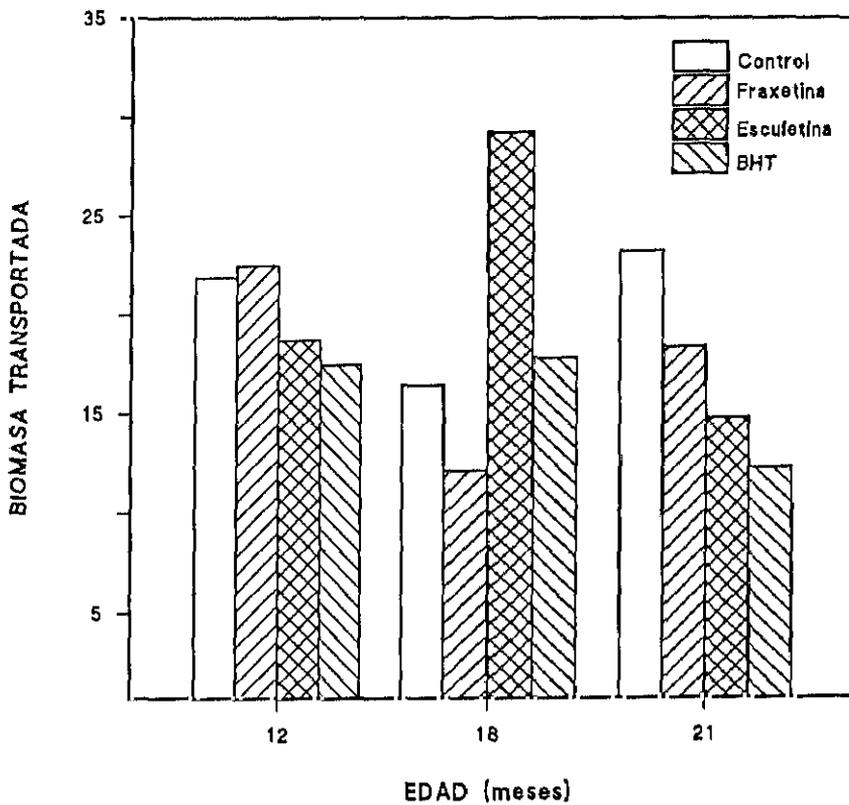


Fig. 4. Biomasa transportada en la 1ª semana del test para cada una de las edades.

Tabla 5. Biomasa transportada.- Ratonos C57BL/6J 2ª semana.

| BIOMASA TRANSPORTADA - SEGUNDA SEMANA DEL TEST | | | |
|--|----------|----------|----------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 26.823 | 20.800 | 25.550 |
| FRAXETINA | 23.034 | 18.780 | 18.270 |
| ESCULETINA | 21.211 | 29.180 | 18.467 |
| BHT | 19.950 | 30.100 | 15.000 |

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos ni entre los tres grupos de edad a $p < 0.05$ (Fig. 5).

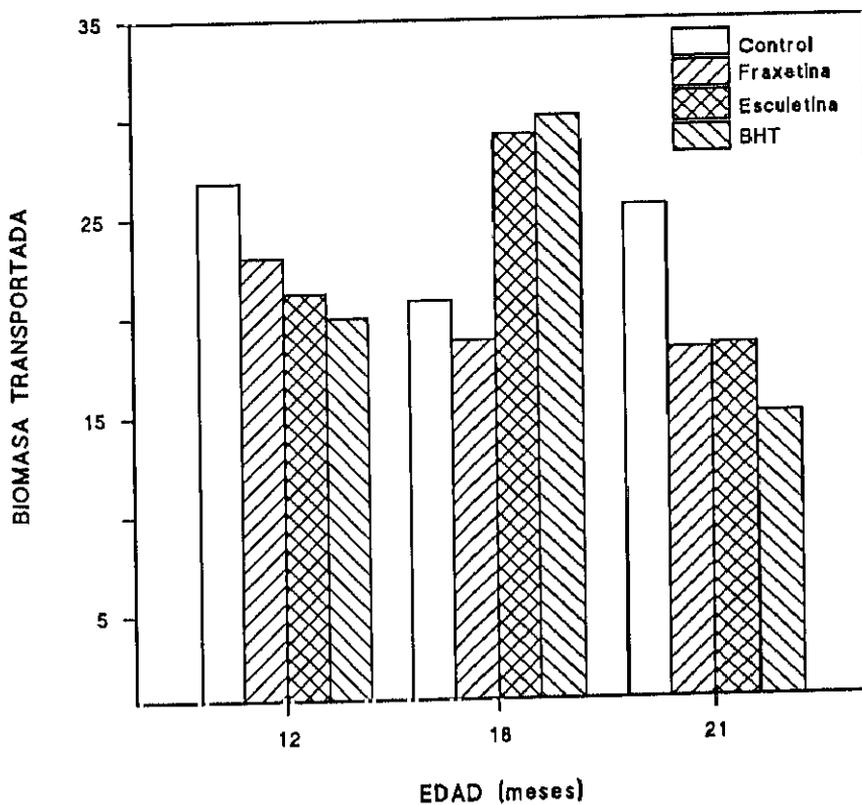


Fig. 5. Biomasa transportada en la 2ª semana del test para cada una de las edades.

Tabla 6. Biomasa transportada.- Ratonos C57BL/6J 3ª semana.

| BIOMASA TRANSPORTADA - TERCERA SEMANA DEL TEST | | | |
|--|----------|----------|----------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 21.269 | 27.167 | 22.930 |
| FRAXETINA | 23.713 | 23.978 | 27.000 |
| ESCULETINA | 28.000 | 29.180 | 25.833 |
| BHT | 20.380 | 24.100 | 21.340 |

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos ni entre los tres grupos de edad a $p < 0.05$ (Fig. 6).

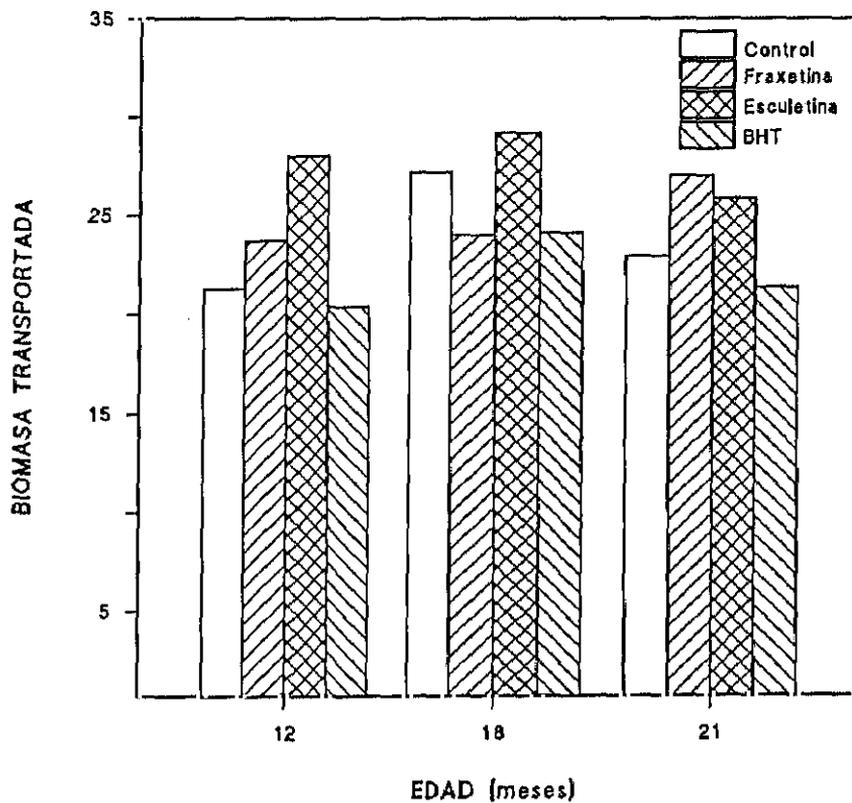


Fig. 6. Biomasa transportada en la 3ª semana del test para cada una de las edades.

Tabla 7. Biomasa transportada.- Ratones C57BL/6J 4ª semana.

| BIOMASA TRANSPORTADA - CUARTA SEMANA DEL TEST | | | |
|---|----------|----------|----------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 28.892 | 25.058 | 28.350 |
| FRAXETINA | 25.867 | 22.000 | 27.310 |
| ESCULETINA | 25.167 | 29.180 | 25.833 |
| BHT | 22.650 | 27.100 | 21.290 |

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos ni entre los tres grupos de edad a $p < 0.05$ (Fig. 7).

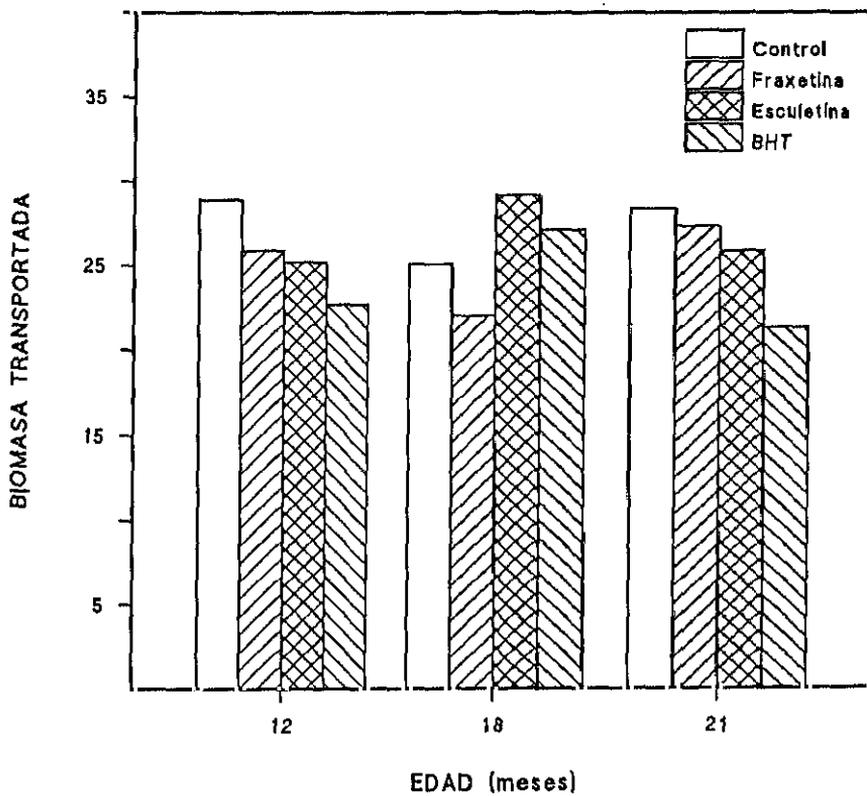


Fig. 7. Biomasa transportada en la 4ª semana del test para cada una de las edades.

Tabla 8. Biomasa transportada.- Ratonos C57BL/6J 5ª semana.

| BIOMASA TRANSPORTADA - QUINTA SEMANA DEL TEST | | | |
|---|----------|----------|----------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 24.023 | 24.580 | 22.780 |
| FRAXETINA | 27.940 | 22.820 | 26.980 |
| ESCULETINA | 25.656 | 29.180 | 29.338 |
| BHT | 22.800 | 26.778 | 21.290 |

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos ni entre los tres grupos de edad a $p < 0.05$ (Fig. 8).

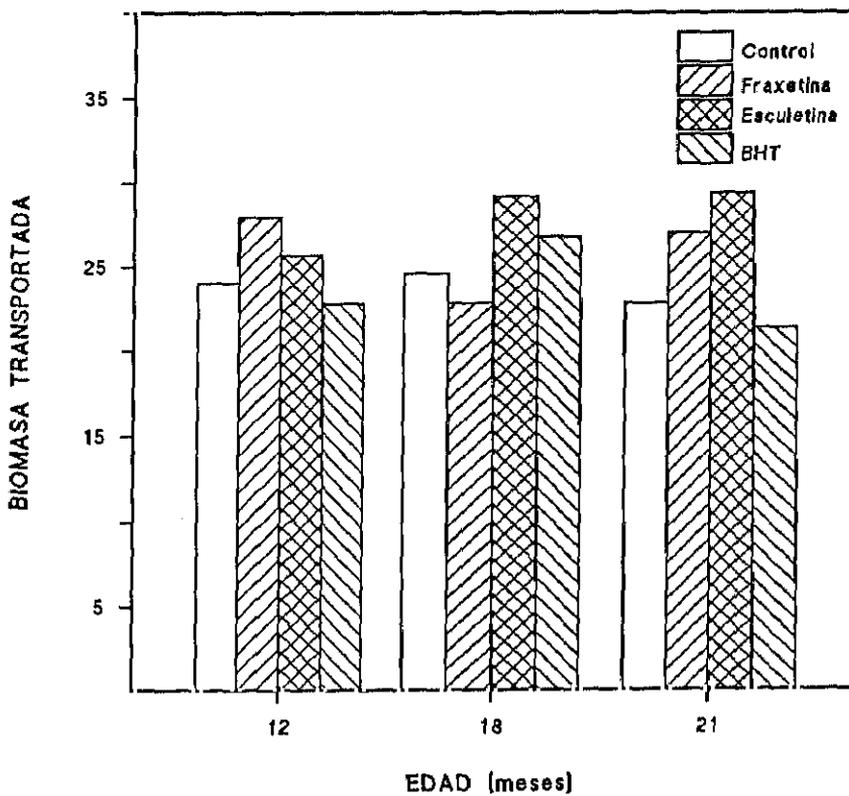


Fig. 8. Biomasa transportada en la 5ª semana del test para cada una de las edades.

Tabla 9. Biomasa transportada ($X \pm ESM$). Ratones C57BL/6J 12, 18 y 21 meses.

| BIOMASA TRANSPORTADA ($X \pm ESM$) | | | |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 24.574 \pm 1.454 | 22.800 \pm 1.902 | 24.564 \pm 1.072 |
| FRAXETINA | 24.605 \pm 1.013 | 19.934 \pm 2.143 | 23.582 \pm 2.153* |
| ESCULETINA | 23.745 \pm 1.670* | 29.190 \pm 0.010** | 22.848 \pm 2.687 |
| BHT | 20.618 \pm 0.968** | 25.176 \pm 2.075* | 18.232 \pm 1.933 |

Los resultados expresan la media aritmética \pm el error estándar medio de los valores de biomasa transportada (para $n = 12$ ratones) obtenidos en las cinco semanas (Fig. 9).

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como: * $p < 0.05$, y ** $p < 0.01$.

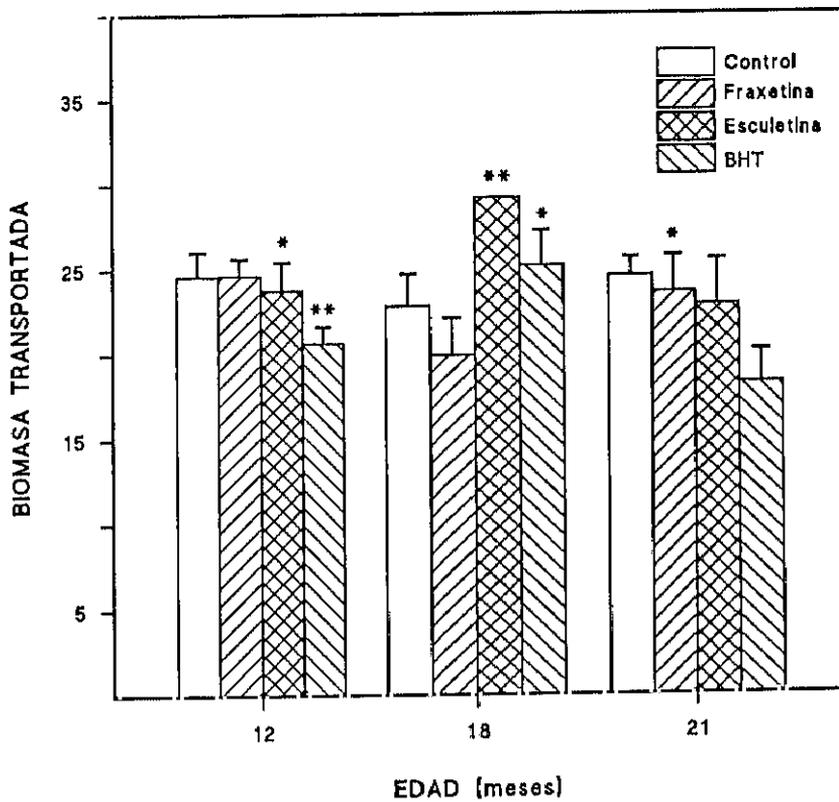


Fig. 9 Biomasa transportada ($X \pm ESM$) para cada una de las edades, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, para el test de Newman-Keuls).

El estudio estadístico mediante el análisis de la varianza (ANOVA) indica efectividad de estos compuestos respecto del control, a la edad de 18 meses para esculetina y BHT, como viene expresado por la media aritmética \pm error estándar medio. A la edad de 12 y 21 meses no se aprecia influencia manifiesta de estos compuestos en la vitalidad de los animales, evaluada por el ensayo de su vigor y coordinación muscular.

Considerando cada semana independientemente, no se encuentran variaciones significativas ni en cuanto a la edad ni en cuanto al tratamiento.

Mediante una comparación múltiple, hemos encontrado sólo algunas diferencias significativas para un mismo tratamiento en función de la edad. Comparando la edad de 12 frente a la de 18 meses, los animales control y los tratados con fraxetina experimentan un descenso en la biomasa transportada ($p < 0.05$), mientras que los tratados con esculetina y BHT experimentan un aumento en la misma ($p < 0.05$) a la edad mayor. Sin embargo, entre los 12 y 21 meses, no hay variaciones significativas para un mismo tratamiento.

Por tanto, la efectividad de estos compuestos en el test de la cuerda se hace notable a una edad madura, sin llegar a la senescencia.

Test no paramétrico de Mann-Whitney

En este estudio estadístico del comportamiento en el test de la cuerda hemos obtenido los siguientes resultados, considerando primero cada edad independientemente:

Edad 12 meses

- Existen diferencias significativas de cada uno de los tratamientos respecto del control, especialmente en el caso del BHT.
- Los animales tratados con fraxetina experimentan un pequeño aumento, no significativo, en la biomasa transportada respecto del lote control (Mann-Whitney U (13, 12) = 12, $p = 0.500$).
- Los tratamientos con esculetina (Mann-Whitney U (10, 15) = 10, $p = 0.345$) y BHT (Mann-Whitney U (4, 21) = 4, $p = 0.048$) hacen descender los valores de biomasa transportada respecto del control, pero de forma significativa sólo en el segundo caso.

ad 18 meses

Existen diferencias significativas de cada uno de los tratamientos respecto del control, stacando esculetina.

Los animales tratados con fraxetina no experimentan variación significativa en la biomasa nsportada respecto del lote control (Mann-Whitney U (7, 18) = 7, p = 0.155).

Los tratamientos con esculetina (Mann-Whitney U (25, 0) = 0, p = 0.004) y BHT (Mann-Whitney U (16, 9) = 9, p = 0.274) producen un incremento los valores de biomasa nsportada respecto del control, significativo sólo en el primer caso.

lad 21 meses

Existen diferencias significativas de cada uno de los tratamientos respecto del control, queñas para fraxetina y esculetina, e importantes en el caso de BHT.

Los tratamientos con fraxetina (Mann-Whitney U (12, 13) = 12, p = 0.500) y esculetina (Mann-Whitney U (12, 13) = 12, p = 0.500) no hacen variar la biomasa transportada respecto del lote control. Solamente BHT (Mann-Whitney U (0, 25) = 0, p = 0.004) provoca a disminución significativa.

En el estudio comparativo de las tres edades, siguiendo a Mann-Whitney, se obtienen los siguientes resultados, considerando cada compuesto independientemente:

ontrol

Los animales control experimentan un descenso a la edad de 18 meses respecto de la de 12 (Mann-Whitney U (10, 15) = 10, p = 0.345), pero no es significativo.

A la edades de 12 y 21 meses, los resultados obtenidos en la biomasa transportada son prácticamente iguales, ya que no existen diferencias significativas entre ellos (Mann-Whitney U (12, 13) = 12, p = 0.500).

- A la edad de 21 meses se produce un incremento respecto de la edad de 18 meses (Mann-Whitney $U(15, 10) = 10$, $p = 0.345$), pero no es significativo.

Fraxetina

- Los resultados obtenidos en la biomasa transportada sufren un descenso a las edades de 18 y 21 meses respecto de la de 12 (Mann-Whitney $U(4, 21) = 4$, $p = 0.048$) (Mann-Whitney $U(12, 13) = 12$, $p = 0.500$), significativo sólo en el primer caso.

- Sin embargo, se produce un aumento a los 21 meses respecto a la edad de 18 meses (Mann-Whitney $U(17, 8) = 8$, $p = 0.210$), pero no significativo.

Esculetina

- Se han encontrado diferencias significativas comparando las edades de 12 y 18 meses, 12 y 21 meses, y 18 y 21 meses; siendo mayores entre 12 y 18 meses.

- En el tratamiento con esculetina se aprecia un aumento en la biomasa transportada a los 18 meses respecto de los 12 (Mann-Whitney $U(25, 0) = 0$, $p = 0.004$).

- La edad de 21 meses experimenta un descenso en la biomasa transportada, respecto de la de 12 (Mann-Whitney $U(12, 13) = 12$, $p = 0.500$) y de la de 18 meses (Mann-Whitney $U(5, 20) = 5$, $p = 0.075$). Este descenso es significativo en el segundo caso.

BHT

- Se han encontrado diferencias significativas comparando las edades de 12 y 18 meses, 12 y 21 meses, y 18 y 21 meses; siendo mayores entre 18 y 21 meses.

- En el tratamiento con BHT se aprecia un aumento significativo en la biomasa transportada a los 18 meses respecto de los 12 (Mann-Whitney $U(21, 4) = 4$, $p = 0.048$).

- La edad de 21 meses experimenta un descenso en la biomasa transportada, respecto de la de 12 (Mann-Whitney $U(9, 16) = 9$, $p = 0.274$) y de la de 18 meses (Mann-Whitney $U(3, 22)$

= 3, $p = 0.028$).

Los tratamientos con esculetina y BHT producen un incremento en los valores de la biomasa transportada a los 18 meses respecto de la edad de 12, a diferencia de los animales control, que experimentan un descenso de la misma. Los animales tratados con fraxetina experimentan un aumento a los 21 meses respecto de los de 18 meses, al igual que el control.

Las diferencias de biomasa transportada entre grupos de edad, son mayores entre los 12 y 18 meses.

Los resultados globales obtenidos en el test de la cuerda podrían resumirse como se indica a continuación:

1. Los animales que no reciben tratamiento experimentan con la edad un descenso en la biomasa transportada, aunque no de forma significativa.
2. Fraxetina hace descender con la edad los resultados de biomasa transportada, sobre todo a los 18 meses.
3. Los animales tratados con esculetina experimentan un incremento importante en la biomasa transportada a los 18 meses. También se comporta así el BHT.

B./ Test del cilindro rotatorio (rota-rod)

Esta prueba se ha realizado una vez por semana, durante los 35 días de tratamiento.

La estimación de la **coordinación motora** de los distintos grupos de edad y tratamiento se expresa como el **tiempo (segundos) de permanencia** del animal sobre el cilindro rotatorio. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas siguientes. A partir de ellas podemos conocer las variaciones en la coordinación motora:

- Las tablas 1-3 permiten conocer las variaciones en la coordinación motora dependientes del tratamiento y de la semana en que se realiza el test, para un mismo grupo de edad.
- Las tablas 4-8 expresan las variaciones en función de la edad y del tratamiento.

Tabla 1. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 12 meses.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - EDAD DE 12 MESES | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
| | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA |
| CONTROL | 16.5±4.3 | 17.6±5.3 | 13.2±3.1 | 15.9±5.2 | 5.3±1.0 |
| FRAXETINA | 16.7±4.5 | 42.9±8.6 | 8.3±0.7 | 10.3±1.7 | 9.5±1.4 |
| ESCULETINA | 6.56±2.0 | 11.5±2.8 | 6.10±1.0 | 6.2±1.5 | 10±3.5 |
| BHT | 15.5±8.2 | 8.0±1.16 | 12.7±3.5 | 11.2±1.9 | 5.2±0.7 |

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para $n = 12$ animales.

Para ANOVA de dos vías, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) dependientes del tiempo (de la semana) pero no del tratamiento.

Tabla 2. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 18 meses.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - EDAD DE 18 MESES | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
| | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA |
| CONTROL | 17.7±3.2 | 8.6±2.3 | 4.6±1.2 | 6.6±1.9 | 3.4± 2.1 |
| FRAXETINA | 23.3±5.9 | 32.8±9.5 | 7.1±2.1 | 18±4.9 | 10.8±3.3 |
| ESCULETINA | 6.0±2.1 | 13.2±2.4 | 16.6±3.7 | 24.2±4.7 | 4.8±1.3 |
| BHT | 4.5±2.1 | 7.6±3.4 | 10.3±4.1 | 7.1±2.9 | 3.8±1.1 |

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para $n = 12$ animales.

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) dependientes del tiempo (de la semana) y del tratamiento.

Tabla 3. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 21 meses.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - EDAD DE 21 MESES | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
| | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA | SEMANA |
| CONTROL | 12.0±4.2 | 12.3±5.4 | 13.6±3.8 | 3.6±2.4 | 5.1±4.2 |
| FRAXETINA | 3.9±3.9 | 5.4±4.5 | 6.8±3.1 | 4.3±2.0 | 3.1±2.3 |
| ESCULETINA | 5.5±2.6 | 4.6±1.8 | 8.7±4.3 | 3.6±2.1 | 2.5±2.2 |
| BHT | 16.6±4.0 | 17.2±5.6 | 13.1±4.7 | 7.6±4.2 | 5.0±3.4 |

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para $n = 12$ animales.

Para ANOVA de dos vías, existen diferencias significativas ($p < 0.01$) dependientes del tiempo (de la semana) y del tratamiento.

El tiempo de permanencia bajo el tratamiento con BHT aumenta significativamente respecto del control en la primera, segunda y cuarta semana del test.

Fraxetina no varía significativamente su efecto a lo largo de las cinco semanas. Es menor significativamente respecto del control en las tres primeras semanas.

Esculetina se comporta similarmente a fraxetina, aunque presenta un pico significativo respecto de esta en la tercera semana.

Tabla 4. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 1ª semana.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - PRIMERA SEMANA DEL TEST | | | |
|--|------------|------------|-------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 16.5 ± 4.3 | 17.7 ± 3.2 | 12.0 ± 4.2 |
| FRAXETINA | 16.7 ± 4.5 | 23.2 ± 5.9 | 3.9 ± 3.9 |
| ESCULETINA | 6.56 ± 2.0 | 6.0 ± 2.1 | 5.5 ± 2.6 |
| BHT | 15.5 ± 8.2 | 4.5 ± 2.1 | 16.16 ± 4.0 |

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para n = 12 animales.

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas dependientes de la edad y del tratamiento.

Tabla 5. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 2ª semana.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - SEGUNDA SEMANA DEL TEST | | | |
|--|------------|------------|------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 17.6 ± 5.3 | 8.6 ± 2.3 | 12.3 ± 5.4 |
| FRAXETINA | 42.9 ± 8.6 | 32.8 ± 9.5 | 5.4 ± 4.5 |
| ESCULETINA | 11.5 ± 2.8 | 13.2 ± 2.4 | 4.6 ± 1.8 |
| BHT | 8.0 ± 1.16 | 7.6 ± 3.4 | 17.2 ± 5.6 |

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para n = 12 animales.

Para ANOVA de dos vías, existen diferencias significativas dependientes de la edad (p < 0.05) y del tratamiento (p < 0.05).

Tabla 6. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 3ª semana.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - TERCERA SEMANA DEL TEST | | | |
|--|------------|------------|------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 13.2 ± 3.1 | 4.6 ± 1.2 | 13.6 ± 3.8 |
| FRAXETINA | 8.3 ± 0.7 | 7.1 ± 2.1 | 6.8 ± 3.1 |
| ESCULETINA | 6.10 ± 1.0 | 16.6 ± 3.7 | 8.7 ± 4.3 |
| BHT | 12.7 ± 3.5 | 10.3 ± 4.1 | 13.1 ± 4.7 |

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para $n = 12$ animales.

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas dependientes de la edad y del tratamiento.

Tabla 7. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 4ª semana.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - CUARTA SEMANA DEL TEST | | | |
|---|------------|------------|-----------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 15.9 ± 5.2 | 6.6 ± 1.9 | 3.6 ± 2.4 |
| FRAXETINA | 10.3 ± 1.7 | 18.0 ± 4.9 | 4.3 ± 2.0 |
| ESCULETINA | 6.2 ± 1.5 | 24.2 ± 4.7 | 3.6 ± 2.1 |
| BHT | 11.2 ± 1.9 | 7.1 ± 2.9 | 7.6 ± 4.2 |

Los resultados se expresan como la media aritmética ± el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para $n = 12$ animales.

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas dependientes de la edad y del tratamiento.

Tabla 8. Tiempo de permanencia (s).- Ratonos C57BL/6J 5ª semana.

| TIEMPO DE PERMANENCIA (segundos) - QUINTA SEMANA DEL TEST | | | |
|---|------------|------------|-----------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 5.3 ± 1.0 | 3.4 ± 2.1 | 5.1 ± 4.2 |
| FRAXETINA | 9.5 ± 1.4 | 10.8 ± 3.3 | 3.1 ± 2.3 |
| ESCULETINA | 10.0 ± 3.5 | 4.8 ± 1.3 | 2.5 ± 2.2 |
| BHT | 5.2 ± 0.7 | 3.8 ± 1.1 | 5.0 ± 3.4 |

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error estándar medio de los tiempos de permanencia en el disco rotatorio para $n = 12$ animales.

Para ANOVA de dos vías, no existen diferencias significativas dependientes de la edad y del tratamiento.

Podemos concluir de la ANOVA, a partir de estos resultados que nos ha proporcionado el test del cilindro rotatorio, que tanto fraxetina como esculetina no exhiben modificaciones significativas en la coordinación motora de ratones a las tres edades consideradas.

Las diferencias más sobresalientes dependen de la semana en que se realiza el test, pero no de la edad ni del tratamiento.

A continuación, y con el fin de obtener la mayor información posible a partir de nuestros resultados, hemos realizado el estudio estadístico comportamental mediante la U de Mann-Whitney.

En el estudio independiente de cada grupo de edad, se ha evaluado cada uno de los tratamientos en relación a su control para cada semana del test rota-rod:

12 meses

Sólo en la quinta semana del test se observa un incremento significativo en el tiempo de permanencia de los animales tratados con fraxetina respecto de su control (Mann-Whitney U (84, 21) = 24, $p < 0.050$).

18 meses

Se observan aumentos en el tiempo de permanencia producidos por esculetina, en la primera, tercera, y cuarta semana del test en relación al control respectivo: (Mann-Whitney U (32, 18) = 19, $p < 0.020$), (Mann-Whitney U (39, 11) = 11, $p = 0.100$) y (Mann-Whitney U (43.5, 6.5) = 8, $p < 0.050$). Sin embargo, en la segunda semana del test, sólo fraxetina hace aumentar el tiempo de permanencia respecto del control (Mann-Whitney U (68, 22) = 24, $p < 0.100$).

21 meses

El tiempo de permanencia debido a los distintos tratamientos experimenta descensos respecto del control, que son significativos en la primera semana para fraxetina (Mann-Whitney U (20, 60) = 20, $p = 0.100$), en la segunda para esculetina (Mann-Whitney U (22, 78) = 23, $p < 0.050$), y en la tercera y quinta para fraxetina (Mann-Whitney U (14, 86) = 19, $p < 0.020$ y U (15.5, 84.5) = 19, $p < 0.020$) y esculetina (Mann-Whitney U (26.5, 73.5) = 27, $p < 0.100$ y U (6.5, 83.5) = 8, $P < 0.002$). Exclusivamente, BHT hace incrementar el tiempo de permanencia en relación a su control en la cuarta semana del test (Mann-Whitney U (84.5, 15.5) = 19, $p < 0.020$).

Aplicando también el test estadístico de la U de Mann-Whitney a cada grupo de edad, hemos obtenido la siguiente información, considerando cada tratamiento independientemente según la semana del test rota-rod:

12 meses

- **Control.** Se observan descensos significativos en el tiempo de permanencia de los animales control, en la quinta semana del test respecto de la primera (Mann-Whitney U (12.5, 43.5) = 13, $p < 0.047$), de la segunda (Mann-Whitney U (10, 46) = 10, $p = 0.020$), de la tercera (Mann-Whitney U (7.5, 48.5) = 8, $p < 0.010$), y de la cuarta (Mann-Whitney U (15.5, 40.5) = 16, $p < 0.095$).

- **Fraxetina.** El tratamiento con fraxetina hace experimentar un incremento en el tiempo de permanencia de los animales en la segunda semana del test respecto de la primera (Mann-

Whitney U (173, 52) = 56, $p < 0.020$). Cuando se comparan la primera con la tercera, cuarta y quinta semanas, no se aprecian variaciones significativas en el tiempo de permanencia. Si se han encontrado descensos significativos entre la segunda y tercera semana (Mann-Whitney U (7.5, 217.5) = 40, $p < 0.002$), entre la segunda y la cuarta (Mann-Whitney U (20.5, 204.5) = 40, $p < 0.002$), y entre la segunda y la quinta (Mann-Whitney U (19, 206) = 40, $p < 0.002$).

- **Esculetina.** Sólo se han encontrado diferencias significativas en la segunda semana respecto de la primera (Mann-Whitney U (60.5, 20.5) = 21, $p < 0.100$) en que se aprecia un incremento en el tiempo de permanencia. Haciendo todas las posibles combinaciones entre semanas, no se han visto diferencias significativas en dichas comparaciones.

- **BHT.** Este tratamiento no produce variación en el tiempo de permanencia en la segunda semana respecto de la primera. Se aprecian descensos en la quinta semana respecto de la segunda (Mann-Whitney U (24, 76) = 27, $p < 0.100$), de la tercera (Mann-Whitney U (17, 83) = 19, $p < 0.020$), y de la cuarta (Mann-Whitney U (23.5, 76.5) = 27, $p < 0.100$).

18 meses

- **Control.** Se encuentran descensos significativos en la quinta semana respecto de la primera (Mann-Whitney U (4, 21) = 4, $p = 0.048$), de la segunda (Mann-Whitney U (6.5, 18.5) = 7, $p < 0.100$), y de la cuarta (Mann-Whitney U (6.5, 18.5) = 7, $p < 0.100$).

- **Fraxetina.** No hay variaciones significativas entre las distintas semanas del test.

- **Esculetina.** Se producen incrementos significativos en la tercera semana respecto de la primera (Mann-Whitney U (84.5, 15.5) = 19, $p < 0.020$) y de la segunda (Mann-Whitney U (76, 24) = 27, $p < 0.100$), y en la cuarta respecto de la primera (Mann-Whitney U (83, 17) = 19, $p < 0.020$) y de la segunda (Mann-Whitney U (74, 26) = 27, $p < 0.100$). Sin embargo, en la quinta semana se producen descensos significativos respecto de la tercera (Mann-Whitney U (8, 92) = 10, $p < 0.002$) y de la cuarta (Mann-Whitney U (9.5, 90.5) = 10, $p < 0.002$).

- **BHT.** Se observan aumentos significativos en la tercera semana respecto de la primera (Mann-Whitney U (89, 11) = 19, $p < 0.020$), y de la segunda (Mann-Whitney U (74.5, 25.5) = 27, $p < 0.100$). También desde la primera a la cuarta semana (Mann-Whitney U (74,

26) = 27, $p < 0.100$). Sin embargo, al igual que en el caso de esculatina, tiene lugar un descenso significativo en la quinta semana respecto de la tercera (Mann-Whitney U (5.5, 84.5) = 8, $p < 0.002$), y de la cuarta (Mann-Whitney U (16.5, 73.5) = 20, $p < 0.050$).

21 meses

- **Control.** Descensos significativos en la cuarta semana en relación a la primera (Mann-Whitney U (18, 62) = 20, $p < 0.100$), a la segunda (Mann-Whitney U (14, 86) = 19, $p < 0.002$), y a la tercera (Mann-Whitney U (2, 98) = 10, $p < 0.002$). También se producen descensos significativos en la quinta semana en relación a la segunda (Mann-Whitney U (27, 73) = 27, $p = 0.100$), y a la tercera (Mann-Whitney U (5.5, 94.5) = 10, $p < 0.002$).

- **Fraxetina.** Aumento significativo en la tercera semana respecto de la primera (Mann-Whitney U (76.5, 23.5) = 27, $p < 0.100$). Descenso en la quinta semana respecto de la tercera (Mann-Whitney U (10, 90) = 10, $p = 0.002$).

- **Esculetina.** En la comparación cronológica entre semanas de menor a mayor, se aprecian descensos en el tiempo de permanencia: primera y cuarta (U (23, 77) = 23, $p = 0.050$); primera y quinta (U (12.5, 77.5) = 16, $p < 0.020$); segunda y cuarta (U (22, 78) = 23, $p < 0.050$); segunda y quinta (U (12.5, 77.5) = 16, $p < 0.020$); tercera y cuarta (U (15.5, 84.5) = 19, $p < 0.020$), tercera y quinta (U (7, 83) = 8, $p < 0.002$).

- **BHT.** Descensos significativos en la quinta semana en relación a la primera (U (22.5, 77.5) = 23, $p < 0.050$), a la segunda (U (23.5, 76.5) = 27, $p < 0.100$), a la tercera (U (20, 80) = 23, $p < 0.050$), y a la cuarta (U (26.5, 73.5) = 27, $p < 0.100$).

Se puede concluir de este estudio:

- A los 12 meses, **fraxetina** y **esculetina** hacen experimentar un incremento en el tiempo de permanencia de los animales en la segunda semana del test respecto de la primera.
- A los 18 meses, con **esculetina** y **BHT** se producen incrementos significativos en la tercera semana respecto de la primera y de la segunda.
- A los 21 meses, con **fraxetina** se observa un aumento significativo en la tercera semana respecto de la primera.

C./ Test de evitación pasiva

Esta prueba se ha realizado al final del tratamiento, en los días siguientes 36, 37 y 41.

Los tiempos de latencia para entrar en la cámara oscura, tanto del día de aprendizaje como a las 24 y 120 horas del mismo, respectivamente, se indican en las siguientes tablas para cada grupo de edad y tratamiento.

Tabla 1. Tiempo de latencia en el test de evitación pasiva a la edad de 12 meses.

| | TIEMPO DE LATENCIA (segundos) - 12 MESES | | |
|------------|--|------------------|------------------|
| | DÍA 1º | 24 HORAS | 120 HORAS |
| CONTROL | 12.750 ± 2.390 | 239.917 ± 25.347 | 218.083 ± 29.049 |
| FRAXETINA | 11.800 ± 3.560 | 245.800 ± 23.625 | 165.800 ± 29.171 |
| ESCULETINA | 9.222 ± 4.186 | 142.778 ± 33.164 | 89.000 ± 26.218 |
| BHT | 10.300 ± 2.688 | 290.300 ± 9.700 | 247.100 ± 26.818 |

Los resultados expresan la media aritmética del tiempo de latencia \pm el error estándar medio para $n = 12$ ratones, obtenidos en el día de aprendizaje, a las 24 y 120 horas, respectivamente.

El estudio estadístico de comparación múltiple indica diferencias significativas en los tiempos de latencia ($p < 0.01$) entre el día de aprendizaje y a las 24 horas, y entre el día 1º y a las 120 horas después, para todos los tratamientos. No ocurre así cuando se comparan los valores de latencia a las 24 y 120 horas en todos los tratamientos.

El día de aprendizaje no se aprecian diferencias entre los tratamientos.

A las 24 horas, las variaciones aparecen entre esculetina y BHT ($p < 0.05$), con el mayor tiempo de latencia para el segundo. Estas diferencias son superiores a las 120 horas ($p < 0.01$), y además esculetina experimenta un descenso significativo respecto del control ($p < 0.05$).

En el análisis de la varianza de una vía, para la edad de 12 meses, no hay diferencias entre las medias a $p < 0.05$ en el día de aprendizaje. Sí existen a las 24 y 120 horas del test ($p < 0.01$) (Fig. 1).

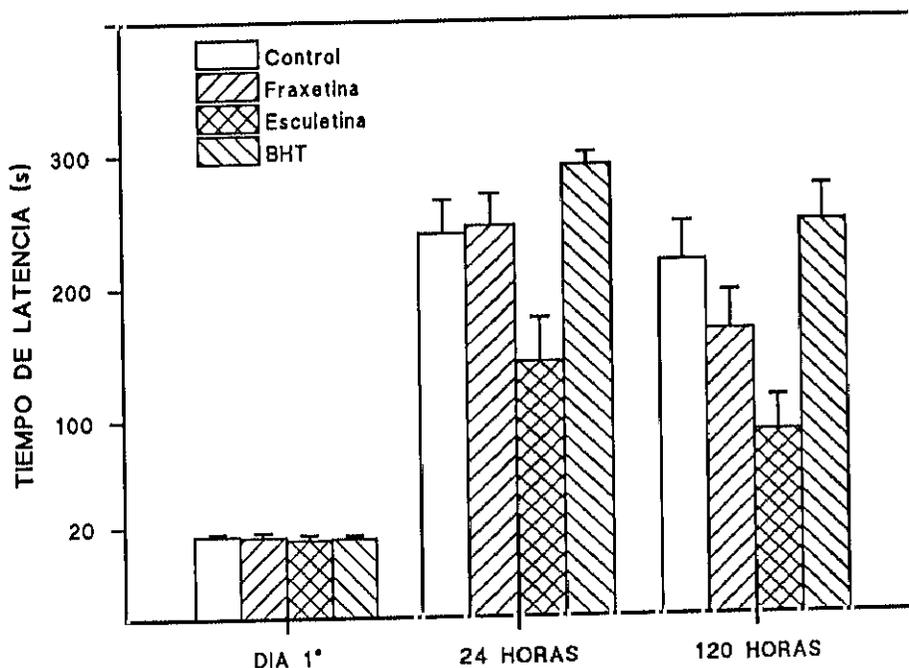


Fig. 1. Tiempo de latencia en el test de evitación pasiva a la edad de 12 meses.

Tabla 2. Tiempo de latencia en el test de evitación pasiva a la edad de 18 meses.

| TIEMPO DE LATENCIA (segundos) - 18 MESES | | | |
|--|-----------------|------------------|------------------|
| | DÍA 1° | 24 HORAS | 120 HORAS |
| CONTROL | 33.083 ± 13.061 | 257.000 ± 29.085 | 210.500 ± 34.204 |
| FRAXETINA | 11.778 ± 2.165 | 192.445 ± 44.422 | 201.889 ± 28.333 |
| ESCULETINA | 8.167 ± 2.149 | 277.917 ± 22.083 | 256.750 ± 20.561 |
| BHT | 13.500 ± 3.756 | 283.333 ± 16.667 | 298.556 ± 1.444 |

Los resultados expresan la media aritmética del tiempo de latencia ± el error estándar medio para $n = 12$ ratones, obtenidos en el día de aprendizaje, a las 24 y 120 horas,

respectivamente.

El estudio estadístico de comparación múltiple indica diferencias significativas en los tiempos de latencia ($p < 0.01$) entre el día de aprendizaje y a las 24 horas, y entre el día 1º y a las 120 horas después, para todos los tratamientos. No ocurre así cuando se comparan los valores de latencia a las 24 y 120 horas en todos los tratamientos.

El día de aprendizaje no se aprecian diferencias entre los tratamientos.

A las 24 horas, las variaciones aparecen para esculetina, BHT y control respecto de fraxetina ($p < 0.05$), con el mayor tiempo de latencia para BHT y esculetina. A las 120 horas se produce un incremento importante de BHT respecto del control y de fraxetina ($p < 0.01$).

En el análisis de la varianza de una vía, para la edad de 12 meses, no hay diferencias entre las medias a $p < 0.05$ en el día de aprendizaje, y a las 24 horas. Sí existen a las 24 y 120 horas del test ($p < 0.01$) (Fig. 2).

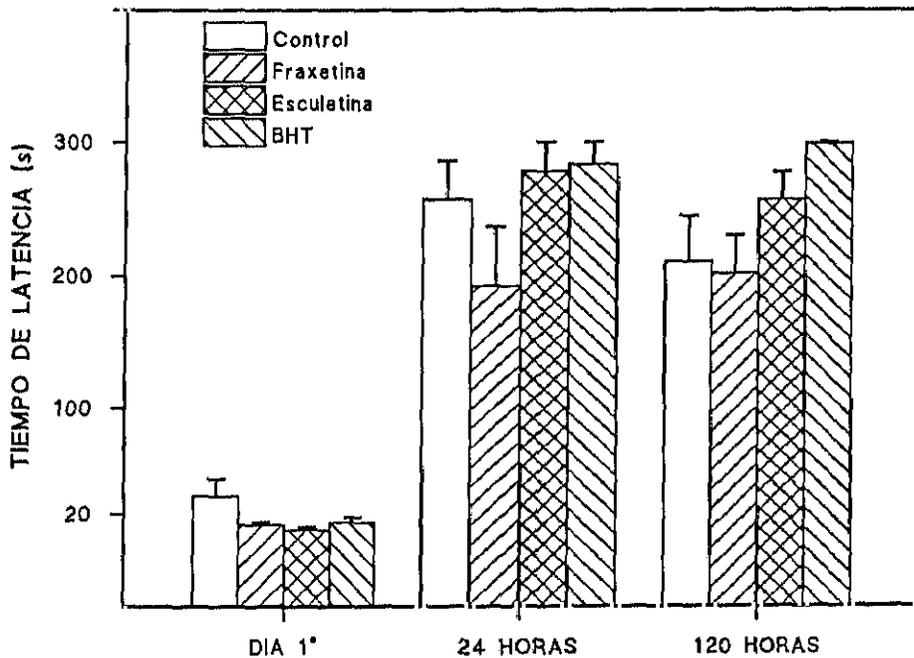


Fig. 2. Tiempo de latencia en el test de evitación pasiva a la edad de 18 meses.

Tabla 3. Tiempo de latencia en el test de evitación pasiva a la edad de 21 meses.

| TIEMPO DE LATENCIA (segundos) - 21 MESES | | | |
|--|----------------|------------------|------------------|
| | DÍA 1° | 24 HORAS | 120 HORAS |
| CONTROL | 12.667 ± 2.911 | 216.300 ± 42.659 | 138.900 ± 41.254 |
| FRAXETINA | 8.200 ± 1.800 | 270.600 ± 29.400 | 214.000 ± 22.601 |
| ESCULETINA | 16.333 ± 2.000 | 300.000 ± 0.000 | 293.333 ± 6.667 |
| BHT | 11.222 ± 2.338 | 283.600 ± 16.400 | 266.300 ± 20.993 |

Los resultados expresan la media aritmética del tiempo de latencia \pm el error estándar medio para $n = 12$ ratones, obtenidos en el día de aprendizaje, a las 24 y 120 horas, respectivamente.

El estudio estadístico de comparación múltiple indica diferencias significativas en los tiempos de latencia ($p < 0.01$) entre el día de aprendizaje y a las 24 horas, y entre el día 1° y a las 120 horas después, para todos los tratamientos. Para un mismo tratamiento no existen diferencias significativas entre las 24 y 120 horas después del test. Esculetina y BHT aumentan los tiempos de latencia de forma importante respecto del control a las 120 horas del test ($p < 0.01$). En el análisis de la varianza de una vía, para la edad de 12 meses, no hay diferencias entre las medias a $p < 0.05$ en el día de aprendizaje, y a las 24 horas. Sí existen a las 24 y 120 horas del test ($p < 0.01$) (Fig. 3).

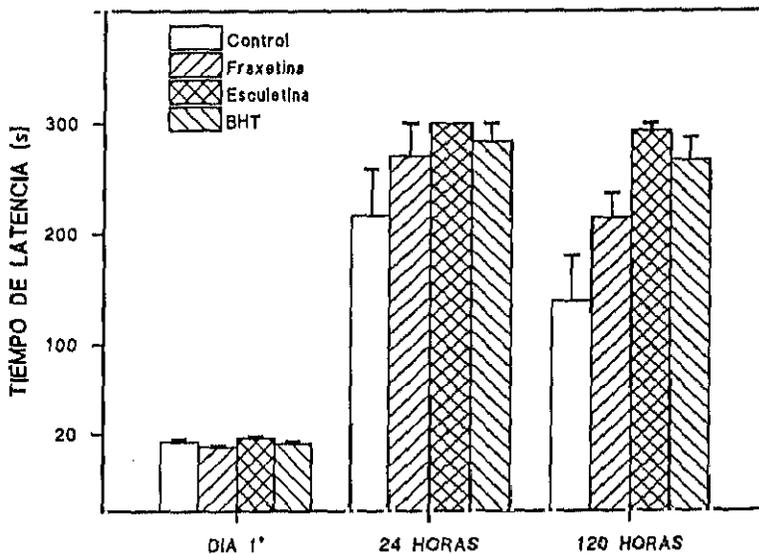


Fig. 3. Tiempo de latencia en el test de evitación pasiva a la edad de 21 meses.

En el estudio estadístico del comportamiento en el test de evitación pasiva, realizado mediante la U de Mann-Whitney, hemos obtenido los siguientes resultados, considerando primero cada edad independientemente:

Edad 12 meses

- Para un mismo día no hay diferencias significativas entre los tratamientos, excepto a las 24 horas en que esculetina desciende respecto del control (Mann-Whitney U (27, 81) = 30, $p < 0.100$).

- Para un mismo tratamiento hay diferencias significativas entre el día de aprendizaje y a las 24 horas, entre el día 1º y a las 120 horas siguientes, pero no entre las 24 y 120 horas.

Edad 18 meses

- No hay diferencias entre los tratamientos considerados en un mismo día, excepto el día de aprendizaje con descensos del tiempo de latencia respecto del control en el caso de fraxetina (Mann-Whitney U (30.5, 86.5) = 33, $p < 0.100$), y de esculetina (Mann-Whitney U (13, 131) = 13, $p < 0.002$).

- Para un mismo tratamiento, hay diferencias significativas entre el día de aprendizaje y las 24 horas, y entre el día 1º y las 120 horas. No ocurre así cuando se comparan las 24 con las 120 horas después del test.

Edad 21 meses

- El día de aprendizaje, únicamente fraxetina experimenta descensos significativos respecto del control (Mann-Whitney U (24, 65) = 24, $p = 0.100$).

- A las 24 horas del test, el tiempo de latencia respecto del control se incrementa en el caso de esculetina (Mann-Whitney U (58.5, 24) = 24, $p = 0.100$).

- A las 120 horas del test, hay aumentos significativos en la respuesta de evitación pasiva respecto de los animales no tratados, para fraxetina (Mann-Whitney U (67.5, 27) = 27, $p =$

0.100), esculetina (Mann-Whitney U (75, 15) = 16, $p < 0.050$), y BHT (Mann-Whitney U (76.5, 23) = 23, $p = 0.050$).

- Hay diferencias significativas para un mismo tratamiento entre el día de aprendizaje y las 24 horas, entre el día 1º y las 120 horas después del test, pero no cuando se comparan las 24 y 120 horas, excepto para fraxetina que experimenta un descenso significativo (Mann-Whitney U (23, 76.5) = 23, $p = 0.050$).

En el estudio comparativo de las tres edades, siguiendo a Mann-Whitney, se obtienen los siguientes resultados, considerando cada compuesto independientemente:

Control

- El día de aprendizaje, se encuentran diferencias entre los 12 y 18 meses (Mann-Whitney U (102, 42) = 42, $p = 0.100$), y entre los 18 y 21 meses (Mann-Whitney U (28.5, 79.5) = 30, $p < 0.100$).

- A las 24 horas del test, no aparecen diferencias con la edad.

- A las 120 horas del test es notable el descenso en el tiempo de latencia de la edad de 21 meses respecto de la de 12 (Mann-Whitney U (34, 79.5) = 34, $p = 0.100$).

Fraxetina

- No existen diferencias significativas entre las distintas edades el día de aprendizaje.

- A las 24 horas, el grupo de 21 meses experimenta un incremento respecto del de 12 meses (Mann-Whitney U (99, 44) = 44, $p = 0.100$) y respecto del de 18 meses (Mann-Whitney U (58.5, 24) = 24, $p = 0.100$).

- A las 120 horas no hay diferencias con la edad en la respuesta, con el tratamiento con fraxetina.

Esculetina

- El día de aprendizaje esculetina experimenta un aumento en la latencia a los 21 meses en comparación con la edad de 12 meses (Mann-Whitney U (68.5, 12.5) = 14, $p < 0.020$), y con la de 18 meses (Mann-Whitney U (96, 12) = 12, $p = 0.002$).
- A las 24 horas del test, esculetina aumenta el tiempo de latencia con la edad, hay diferencias significativas entre los 12 y 18 meses (Mann-Whitney U (88, 20) = 21, $p < 0.020$), y entre los 12 y los 21 meses (Mann-Whitney U (72, 9) = 14, $p < 0.020$).
- A las 120 horas, también esculetina incrementa la respuesta favorable con la edad. Hay variaciones entre los 12 y 18 meses (Mann-Whitney U (103, 5) = 12, $p < 0.002$), y entre los 12 y 21 meses (Mann-Whitney U (81, 0) = 7, $p < 0.002$).

BHT

- El día primero no hay diferencias en la respuesta asociadas a la edad.
- A las 24 horas del aprendizaje tampoco la edad influye significativamente en el tiempo de latencia para entrar en la cámara oscura.
- Lo mismo hay que decir a las 120 horas posteriores al test.

Los resultados globales obtenidos en la prueba de evitación pasiva podrían resumirse como se indica a continuación:

1. Los animales que no reciben tratamiento experimentan con la edad un descenso en la latencia que es significativo a las 120 horas del test, entre los 12 y 21 meses.
2. Fraxetina produce aumentos en el tiempo de latencia variables con la edad, a las 24 horas después del aprendizaje, entre los 12 y 21, y entre los 18 y 21 meses.
3. Los incrementos en los tiempos de latencia bajo el tratamiento con esculetina son más notables con el aumento de la edad, sobre todo a las 120 horas después del aprendizaje.
4. El efecto de BHT en el test de evitación pasiva no parece estar determinado por la edad. Aumenta los tiempos de latencia respecto de su control a todas las edades, a las 24 y 120 horas para los 12 y 18 meses, y sólo a las 120 horas para los 21 meses.

RESULTADOS DE MEDIDA DE ANTIOXIDANTES Y DAÑO TISULAR

HÍGADO

Actividad enzimática

Se ha medido la actividad enzimática específica de las cinco principales enzimas oxidantes, y de la citocromo c oxidasa (COX), en los diferentes grupos de animales para uno de los tratamientos estudiados (Tablas 1, 2, 3, 4, 5, y 6).

Los resultados que aparecen en las tablas expresan la media aritmética \pm error dar para $n = 12$ animales de cada grupo de edad y tratamiento.

Dichos resultados equivalen a unidades de medida / min. mg de proteína: SOD (U), ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$), GPx total y GPx-Se (nmol NADPH), GR (nmol NADPH) y COX (μmol citocromo c oxidado).

Tabla 1. Actividad enzimática específica de Superóxido dismutasa (SOD) en hígado.

| SUPERÓXIDO DISMUTASA - HÍGADO | | | |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| (U / mg proteína) | | | |
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 16.840 ± 2.656 | 12.461 ± 1.646 | 13.833 ± 1.828 |
| FRAXETINA | 13.260 ± 2.433 | 10.068 ± 1.190 | 12.305 ± 2.014 |
| ESCULETINA | 11.254 ± 1.810 | 10.087 ± 1.633 | 13.799 ± 1.035 |
| BHT | 8.309 ± 2.328 | 9.934 ± 1.396 | 8.841 ± 0.876* |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * p < 0.05.

La SOD no varía con el aumento de la edad cuando los animales no reciben tratamiento y cuando son tratados con fraxetina y esculetina. Sin embargo, con BHT se produce un descenso respecto del control a las tres edades, que es significativo a la edad de 21 meses (Fig. 1).

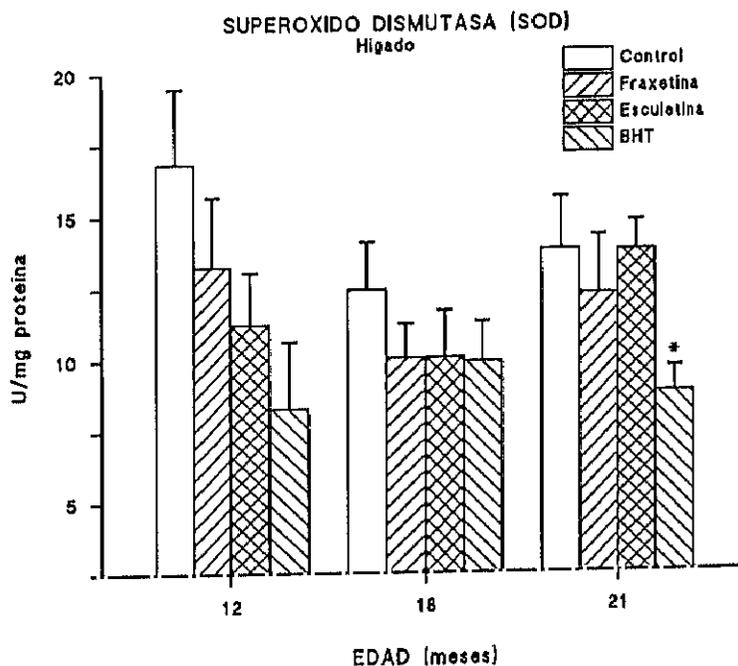


Fig. 1. Actividad SOD en hígado, (* p < 0.05).

Tabla 2. Actividad enzimática específica de Catalasa (CAT) en hígado.

| TRATAMIENTO | CATALASA - HÍGADO ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 / \text{min} \cdot \text{mg protefna}$) | | |
|-------------|--|---------------------|----------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 78.678 \pm 12.374 | 59.812 \pm 7.319 | 62.641 \pm 9.029 |
| FRAXETINA | 71.109 \pm 15.061 | 53.989 \pm 6.992 | 31.591 \pm 3.082** |
| ESCULETINA | 88.650 \pm 31.360 | 58.454 \pm 10.277 | 31.569 \pm 3.038** |
| BHT | 36.993 \pm 12.976 | 50.001 \pm 4.797* | 46.680 \pm 2.775** |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como: * $p < 0.05$, y ** $p < 0.01$.

La actividad de la CAT hepática desciende de forma importante con la edad cuando los animales son tratados con fraxetina y esculetina. En los animales control no se producen cambios significativos con la edad. En el tratamiento con BHT, los valores descienden para un mismo grupo de edad respecto del control, pero no de forma significativa a la edad de 12 meses (Fig. 2).

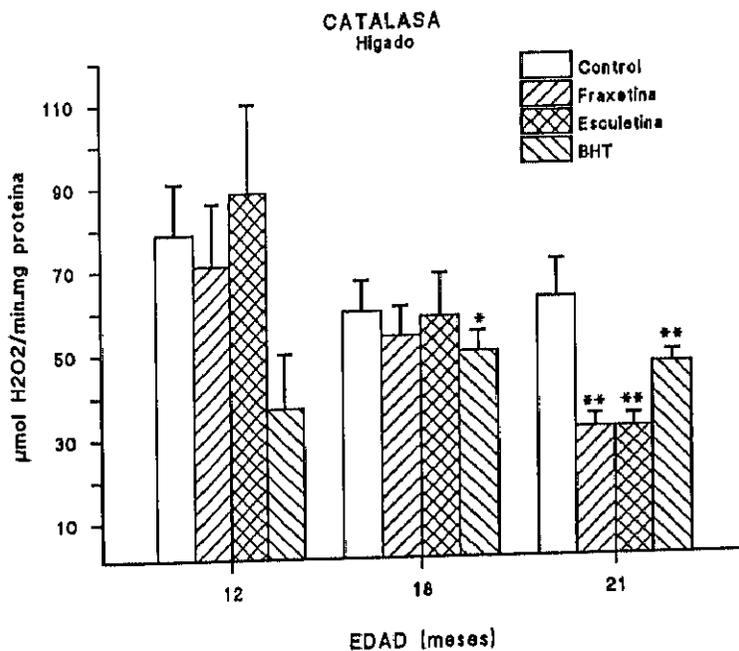


Fig. 2. Actividad CAT en hígado, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Tabla 3. Actividad enzimática específica de Glutation peroxidasa total (GPx) en hígado.

| GLUTATION PEROXIDASA TOTAL - HÍGADO (nmoles NADPH / min . mg proteína) | | | |
|---|------------------|------------------|-------------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 594.302 ± 46.201 | 416.490 ± 38.522 | 352.436 ± 42.236 |
| FRAXETINA | 517.610 ± 55.123 | 324.480 ± 37.214 | 244.139 ± 31.988 |
| ESCULETINA | 549.370 ± 59.004 | 381.416 ± 46.977 | 409.805 ± 50.329 |
| BHT | 242.778 ± 22.551 | 396.533 ± 42.136 | 390.312 ± 28.979* |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.05$.

A la edad de 21 meses, la GPx total hepática disminuyó con respecto a los animales de 12 meses, excepto cuando fueron tratados con BHT, que aumentó significativamente. Para los demás tratamientos, las variaciones dentro de su grupo de edad no fueron significativas (Fig. 3).

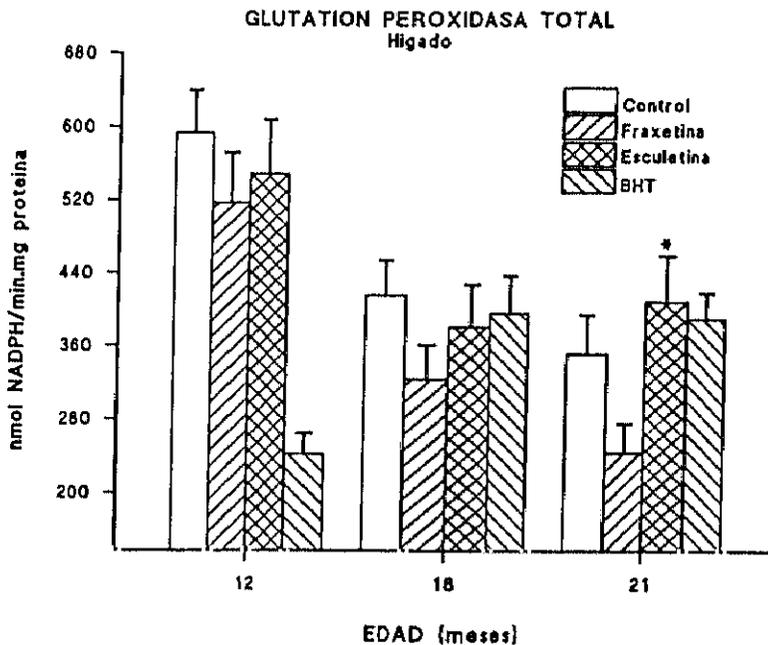


Fig. 3. Actividad GPx total en hígado, (* $p < 0.05$).

Tabla 4. Actividad enzimática específica de Glutation peroxidasa (GPx-Se) en hígado.

| GLUTATION PEROXIDASA (GPx-Se) - HÍGADO (μ moles H ₂ O ₂ / min . mg proteína) | | | |
|--|----------------------|----------------------|-----------------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 530.729 \pm 45.126 | 321.326 \pm 29.016 | 294.498 \pm 39.270 |
| FRAXETINA | 383.460 \pm 46.875 | 218.160 \pm 27.394 | 215.017 \pm 24.720 |
| ESCULETINA | 386.440 \pm 42.255 | 240.090 \pm 29.116 | 347.373 \pm 24.917* |
| BHT | 166.522 \pm 14.347 | 360.441 \pm 41.206 | 374.143 \pm 42.994 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.05$.

La actividad de la GPx-Se dependiente disminuye desde la edad de 12 a la de 21 meses, excepto en el tratamiento con BHT, que aumenta. Para la edad de 12 meses, los niveles de GPx-Se experimentan un descenso notable respecto del control, pero no a los 18 y 21 meses (Fig. 4). Esta disminución quizás sea en favor de la GPx no Se dependiente.

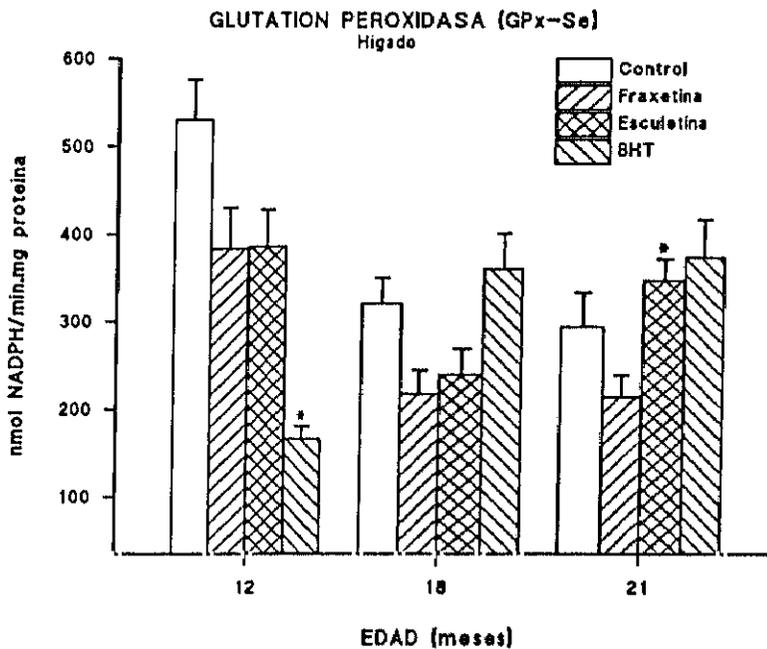


Fig. 4. Actividad GPx-Se en hígado, (* $p < 0.05$).

Tabla 5. Actividad enzimática específica de Glutation reductasa (GR) en hígado.

| GLUTATION REDUCTASA - HÍGADO (nmoles NADPH / min . mg proteína) | | | |
|--|-----------------|-----------------|----------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 23.129 ± 2.125 | 17.188 ± 1.668 | 17.014 ± 2.553 |
| FRAXETINA | 25.344 ± 2.190* | 19.511 ± 2.215 | 15.805 ± 2.096 |
| ESCULETINA | 24.193 ± 2.276* | 16.217 ± 2.013 | 16.179 ± 3.011 |
| BHT | 27.051 ± 2.397* | 19.324 ± 1.836* | 19.906 ± 3.217 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.05$.

La actividad GR disminuye con la edad. En el grupo de 12 meses, BHT, fraxetina y esculetina, incrementan su actividad significativamente respecto del control. También se comporta así BHT a los 18 meses, aunque el incremento es menor. A la edad de 21 meses no se producen variaciones significativas entre los distintos tratamientos (Fig. 5).

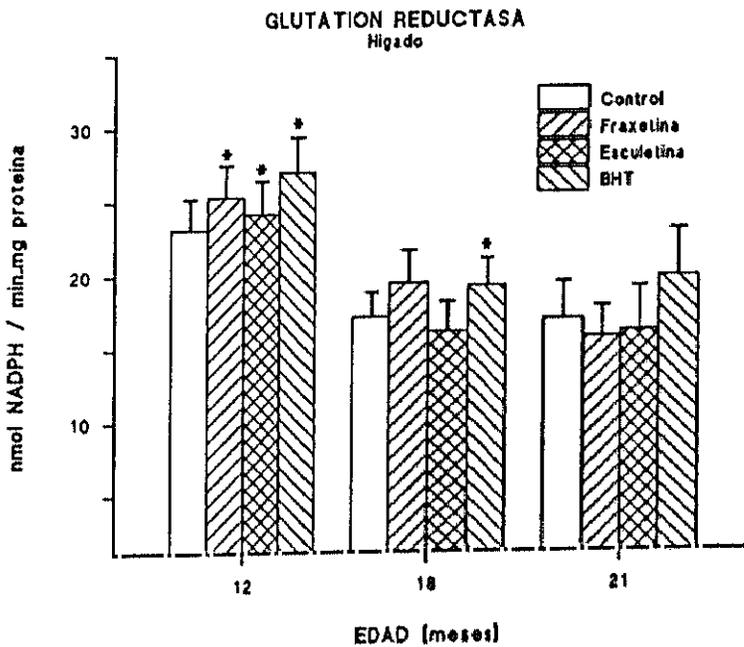


Fig. 5. Actividad GR en hígado, (* $p < 0.05$).

Tabla 6. Actividad enzimática específica de Citocromo c oxidasa (COX) en hígado.

| TRATAMIENTO | CITOCROMO C OXIDASA - HÍGADO (μ moles CIT C ox. / mg protefna) | | |
|-------------|--|---------------------|----------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 0.0812 \pm 0.0112 | 0.0631 \pm 0.0081 | 0.0563 \pm 0.0061 |
| FRAXETINA | 0.0799 \pm 0.0124 | 0.0608 \pm 0.0074 | 0.0313 \pm 0.0022* |
| ESCULETINA | 0.0983 \pm 0.0217 | 0.0593 \pm 0.0072 | 0.0396 \pm 0.0041 |
| BHT | 0.0714 \pm 0.0121 | 0.0515 \pm 0.0059 | 0.0471 \pm 0.0034* |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.01$.

La actividad COX hepática disminuye con la edad. Sólo en el grupo de edad de 21 meses se han detectado descensos significativos en la actividad con el tratamiento con fraxetina y BHT, respecto del control (Fig. 6).

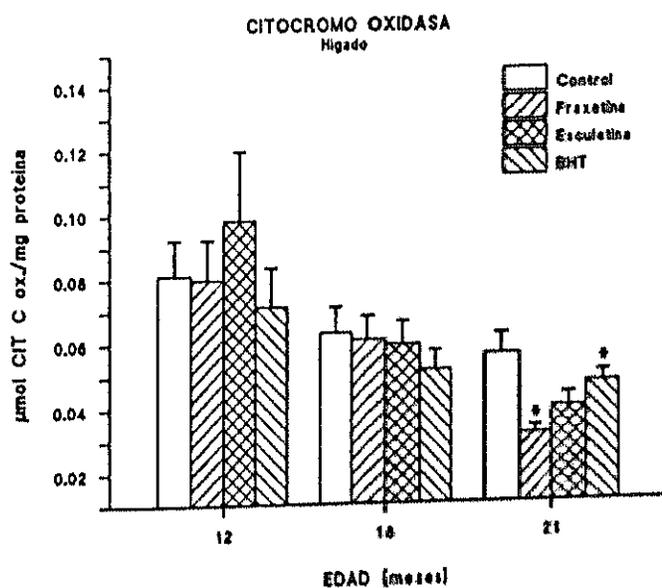


Fig. 6. Actividad COX en hígado, (* $p < 0.01$).

A.2./ Sistema del glutation

Los niveles de glutation reducido y oxidado, respectivamente, se indican en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Concentración de glutation reducido en hígado.

| TRATAMIENTO | GSH ($\mu\text{mol/g}$ tejido) - HÍGADO | | |
|-------------|--|-------------------|--------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 3.555 \pm 0.309 | 3.612 \pm 0.418 | 4.211 \pm 0.491 |
| FRAXETINA | 4.383 \pm 0.425* | 3.259 \pm 0.393 | 2.827 \pm 0.259* |
| ESCULETINA | 5.220 \pm 0.497* | 3.645 \pm 0.426 | 3.121 \pm 0.247* |
| BHT | 2.609 \pm 0.249* | 3.367 \pm 0.374 | 4.787 \pm 0.523 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.01$.

Tabla 8. Concentración de glutation oxidado en hígado.

| TRATAMIENTO | GSSG ($\mu\text{mol/g}$ tejido) - HÍGADO | | |
|-------------|---|--------------------|---------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 0.097 \pm 0.009 | 0.115 \pm 0.010 | 0.208 \pm 0.019 |
| FRAXETINA | 0.087 \pm 0.012 | 0.098 \pm 0.009* | 0.112 \pm 0.027* |
| ESCULETINA | 0.127 \pm 0.012* | 0.121 \pm 0.023 | 0.134 \pm 0.011 * |
| BHT | 0.047 \pm 0.010 | 0.090 \pm 0.008* | 0.236 \pm 0.034 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.01$.

La concentración de glutatión reducido a la edad de 12 meses ha aumentado en los tratamientos con fraxetina y esculetina respecto del control, sin embargo, ha disminuido con BHT.

A los 18 meses, los niveles de glutatión reducido no varían con los distintos tratamientos. En los animales más viejos, se produce el efecto contrario al que tiene lugar en los de 12 meses, los niveles de glutatión reducido disminuyen con fraxetina y esculetina, y aumentan con BHT, aunque no significativamente (Fig. 7).

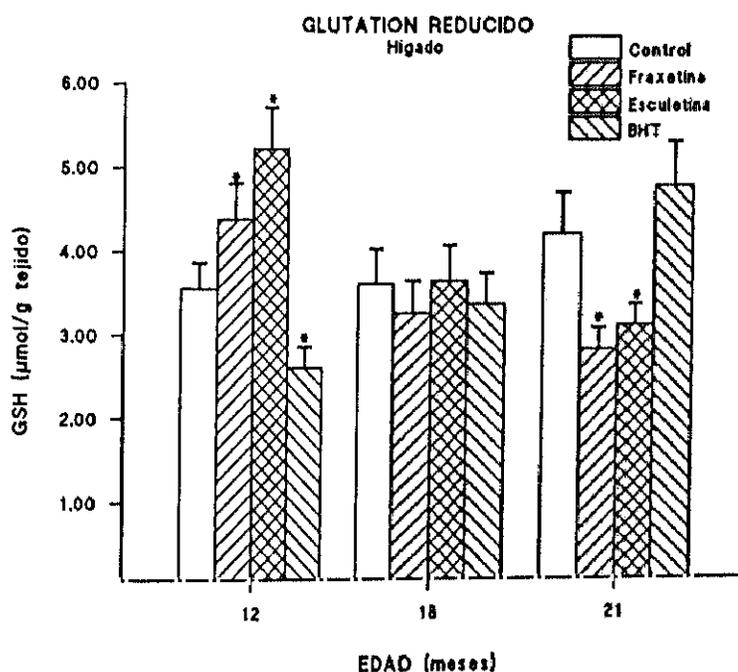


Fig. 7. Concentración de GSH en hígado, (* $p < 0.01$).

Los niveles de glutatión oxidado aumentan con la edad. A los 12 y 18 meses, los valores obtenidos con los tratamientos de fraxetina y BHT son menores respecto del control. No así para esculetina, cuyo valor es mayor significativamente respecto del control a los 12 meses.

Los tratamientos con fraxetina y esculetina a la edad de 21 meses hacen descender los valores de glutatión oxidado significativamente respecto del control.

El glutatión oxidado no experimenta cambios con la edad, cuando los animales son tratados con esculetina (Fig. 8).

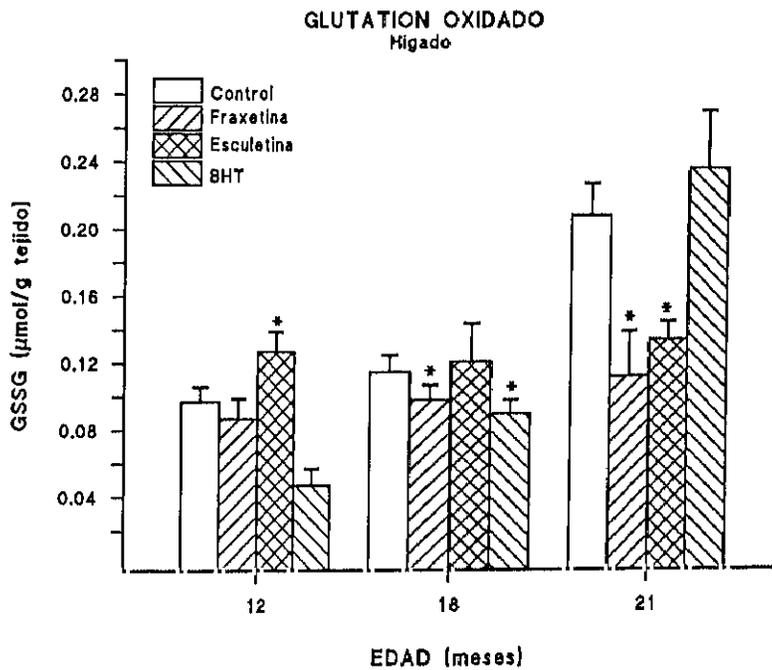


Fig. 8. Concentración de GSSG en hígado, (* p < 0.01).

A.3./ Estrés oxidativo tisular

El daño tisular se puede expresar como el índice de estrés oxidativo que resulta del cociente GSSG / GSH (Tabla 9), o como la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) (Tabla 10).

Tabla 9. Tasa de glutatión oxidado / glutatión reducido en hígado.

| TRATAMIENTO | ESTRÉS OXIDATIVO - HÍGADO (GSSG / GSH) | | |
|-------------|---|------------------|------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 0.0273 ± 0.0025 | 0.0319 ± 0.0031 | 0.0494 ± 0.0044 |
| FRAXETINA | 0.0198 ± 0.0019* | 0.0301 ± 0.0039 | 0.0396 ± 0.0037* |
| ESCULETINA | 0.0244 ± 0.0020* | 0.0332 ± 0.0045 | 0.0429 ± 0.0035* |
| BHT | 0.0180 ± 0.0011* | 0.0267 ± 0.0022* | 0.0496 ± 0.0056 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.01$.

El índice de estrés oxidativo expresado por el cociente GSSG/GSH se ve incrementado con la edad.

A la edad de 12 meses, este índice desciende de forma importante para los tratamientos con BHT, fraxetina y esculetina.

A los 18 meses, dicho índice no varía bajo el tratamiento con estas cumarinas, excepto BHT que experimenta un descenso dos veces menor que a los 12 meses.

En el grupo de edad de 21 meses, fraxetina y esculetina hacen descender de forma importante los valores del índice de estrés oxidativo respecto del control. BHT pierde su efectividad a esta edad para asemejarse al control (Fig. 9).

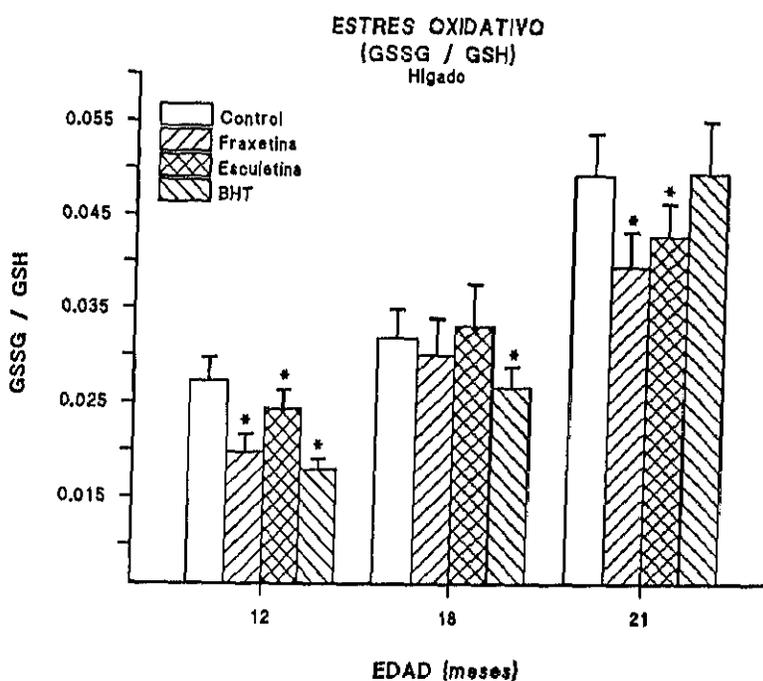


Fig. 9. Tasa GSSG/GSH en hígado, (* $p < 0.01$).

Tabla 10. Concentración de TBARS *in vivo* (t incubación = 0 min) e *in vitro* (t incubación = 30 min), en hígado.

| TRTTO | ESTRÉS OXIDATIVO (nM MDA /g tejido) - HÍGADO | | | | | |
|-------|--|---------|----------|----------|----------|----------|
| | 12 MESES | | 18 MESES | | 21 MESES | |
| | 0 min | 30 min | 0 min | 30 min | 0 min | 30 min |
| C | 256±71 | 789±130 | 357±93 | 956±230 | 210±65 | 947±300 |
| F | 208±75 | 733±106 | 384±86 | 961±219 | 222±81 | 1015±255 |
| E | 202±83 | 743±156 | 342±108 | 1002±250 | 235±90 | 950±206 |
| BHT | 216±69 | 726±100 | 298±62 | 906±195 | 307±73 | 1116±297 |

TRTTO = tratamiento, C = control, F = fraxetina, E = esculetina

No existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad.

Los niveles endógenos de sustancias TBA positivas *in vivo* no han sufrido diferencias significativas (ANOVA) en función de la edad y del tratamiento (Fig. 10). Asimismo, la concentración de estas sustancias producto de la peroxidación (TBA *in vitro*), no experimentó modificaciones entre los distintos grupos de edad, y en los distintos tratamientos respecto al control (Fig. 11).

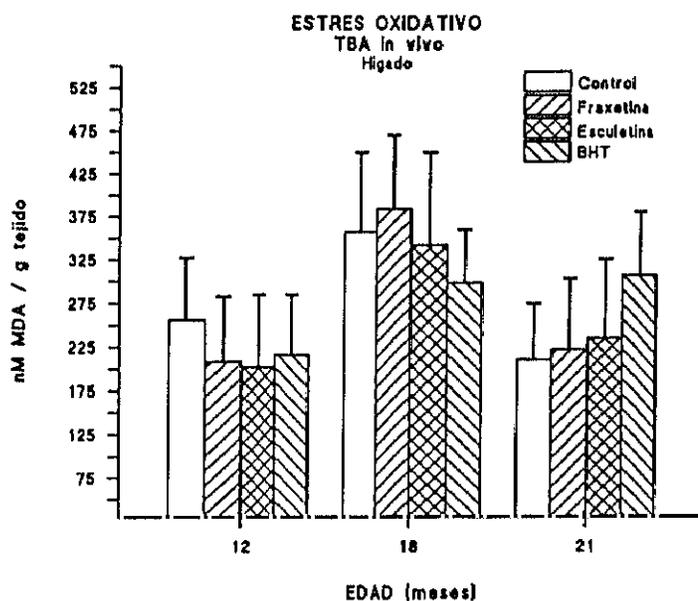


Fig. 10. Concentración de TBAs *in vivo* en hígado.

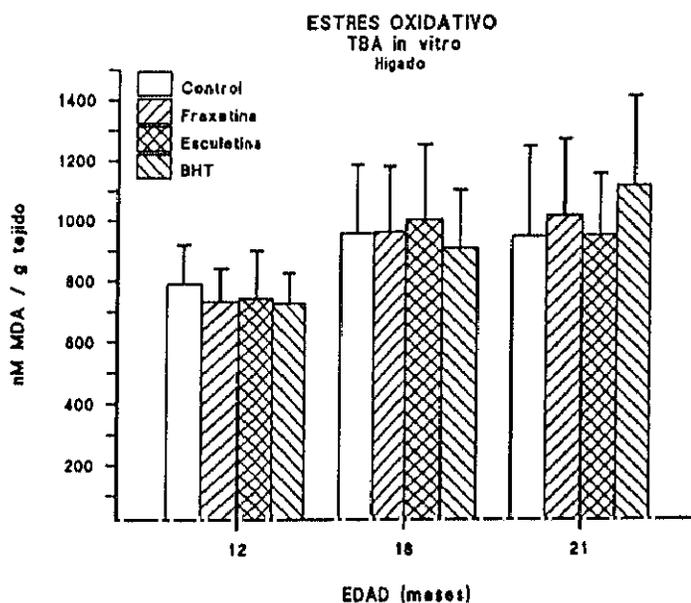


Fig. 11. Concentración de TBAs *in vitro* en hígado.

B./ CORTEZA CEREBRAL

B.1./ Actividad enzimática

Se ha medido la actividad enzimática específica de las cinco principales enzimas antioxidantes, y de la citocromo c oxidasa (COX), en los diferentes grupos de animales para cada uno de los tratamientos estudiados (Tablas 11, 12, 13, 14, 15, y 16).

Los resultados que aparecen en las tablas expresan la media aritmética \pm error estándar para $n = 12$ animales de cada grupo de edad y tratamiento.

Dichos resultados equivalen a unidades de medida / min. mg de proteína: SOD (U), CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$), GPx total y GPx-Se (nmol NADPH), GR (nmol NADPH) y COX (μmol citocromo c oxidado).

Tabla 11. Actividad enzimática específica de Superóxido dismutasa (SOD) en corteza cerebral.

| SUPERÓXIDO DISMUTASA - CEREBRO (U / mg proteína) | | | |
|---|-----------------|----------------|-----------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 3.357 ± 0.342 | 3.706 ± 0.294 | 3.557 ± 0.121 |
| FRAJETINA | 4.242 ± 0.126* | 3.719 ± 0.417 | 3.926 ± 0.409 |
| ESCULETINA | 5.655 ± 0.595** | 4.905 ± 0.442* | 4.582 ± 0.205** |
| BHT | 6.512 ± 0.540** | 4.511 ± 0.497 | 2.282 ± 0.374* |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como: * p < 0.05, y ** p < 0.01.

La actividad SOD permanece constante desde los 12 hasta los 21 meses, cuando los animales no reciben tratamiento. Sin embargo, desciende moderadamente cuando son tratados con fraxetina y esculetina, y de forma más marcada con BHT. En el grupo de 12 meses se aprecia un incremento de la actividad respecto del control con los tres tratamientos, en el orden BHT, esculetina y fraxetina. Sin embargo, a los 18 meses sólo esculetina permanece superior al control. En el grupo de 21 meses, BHT y esculetina experimentan cambios importantes respecto al control, el primero descendiendo y el segundo aumentando (Fig. 12).

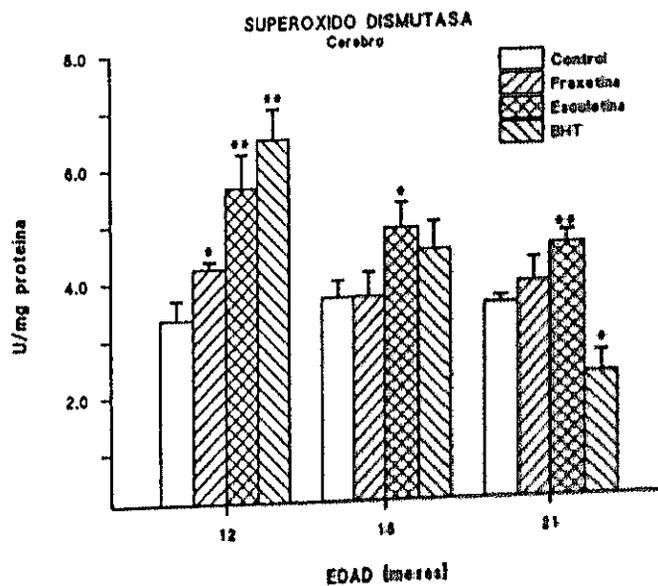


Fig. 12. Actividad SOD en cerebro (* p < 0.05, ** p < 0.01).

Tabla 12. Actividad enzimática específica de Catalasa (CAT) en corteza cerebral.

| CATALASA - CEREBRO ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 / \text{min} \cdot \text{mg protefna}$) | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 3.491 \pm 0.192 | 2.317 \pm 0.258 | 3.217 \pm 0.349 |
| FRAXETINA | 2.514 \pm 0.262 | 3.782 \pm 0.291 | 2.934 \pm 0.326 |
| ESCULETINA | 2.962 \pm 0.217 | 3.566 \pm 0.318 | 3.814 \pm 0.406 |
| BHT | 3.281 \pm 0.272 | 2.510 \pm 0.291 | 2.796 \pm 0.359 |

No existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad a $p < 0.05$.

No se aprecian variaciones significativas en la actividad de la catalasa de corteza cerebral, ni dependientes de la edad ni del tratamiento (Fig. 13).

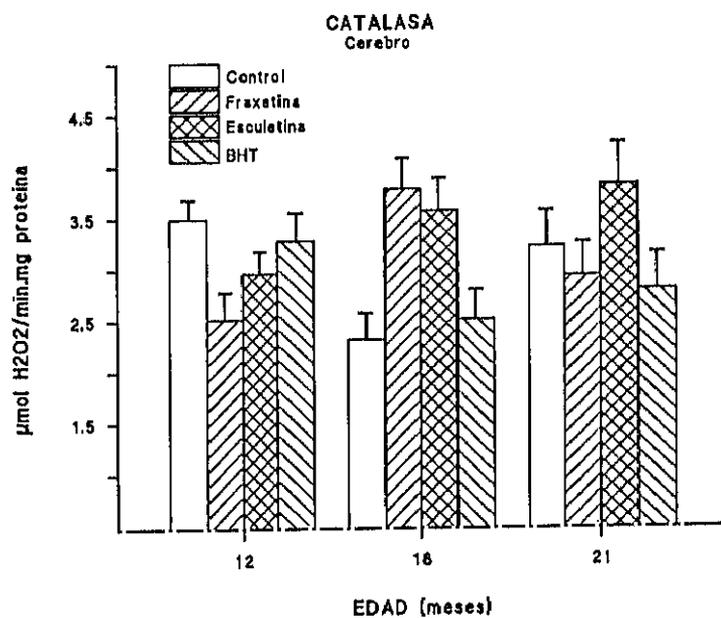


Fig. 13. Actividad CAT en cerebro.

Tabla 13. Actividad enzimática específica de Glutacion peroxidasa total (GPx) en cerebro.

| GLUTATION PEROXIDASA TOTAL - CEREBRO (nmoles NADPH / min . mg proteína) | | | |
|--|-----------------|----------------|----------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 23.598 ± 2.464 | 18.377 ± 2.006 | 19.626 ± 1.529 |
| FRAXETINA | 31.219 ± 1.794* | 23.416 ± 2.509 | 20.346 ± 2.512 |
| ESCULETINA | 28.258 ± 1.083* | 20.111 ± 2.007 | 21.995 ± 2.503 |
| BHT | 30.052 ± 2.737* | 25.952 ± 3.092 | 21.058 ± 2.937 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.05$.

Fraxetina, BHT y esculetina produjeron aumentos considerables en la actividad GPx total a la edad de 12 meses. En los otros grupos de edad no existen variaciones significativas dependientes del tratamiento y dependientes de la edad. Cuando los animales no reciben tratamiento, la actividad GPx total no experimenta modificaciones con la edad (Fig. 14).

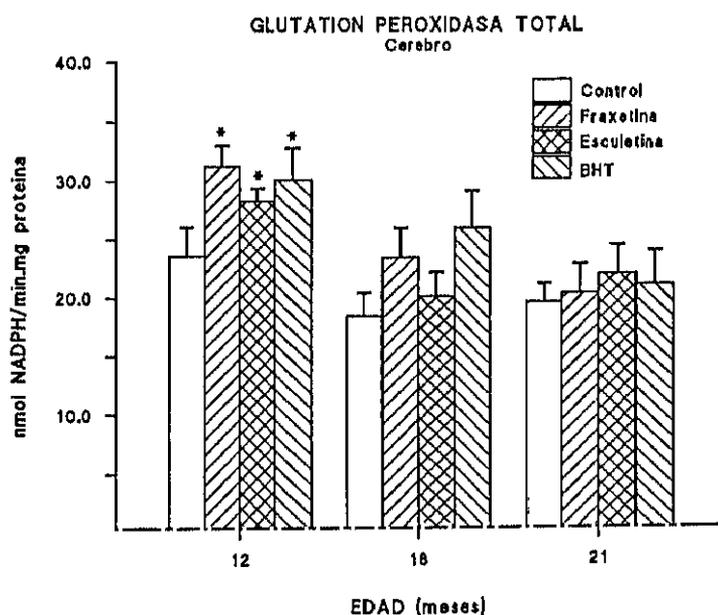
Fig. 14. Actividad GPx total en cerebro (* $p < 0.05$).

Tabla 14. Actividad enzimática específica de Glutacion peroxidasa Se dependiente (GPx-Se) en corteza cerebral.

| GLUTATION PEROXIDASA (GPx-Se) - CEREBRO (nmoles NADPH / min . mg proteína) | | | |
|---|-----------------|----------------|----------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 19.949 ± 1.950 | 17.952 ± 2.103 | 18.537 ± 2.805 |
| FRAXETINA | 25.014 ± 1.949* | 20.344 ± 2.055 | 17.304 ± 2.131 |
| ESCULETINA | 21.385 ± 1.770* | 18.867 ± 1.954 | 18.876 ± 2.791 |
| BHT | 20.664 ± 1.907* | 20.036 ± 2.991 | 15.783 ± 1.887 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.05$.

La actividad de este enzima no varía significativamente con la edad. Tampoco con el tratamiento, excepto a los 12 meses, con el mayor incremento debido a fraxetina. Esculetina y BHT sólo experimentan un aumento moderado respecto al control (Fig. 15).

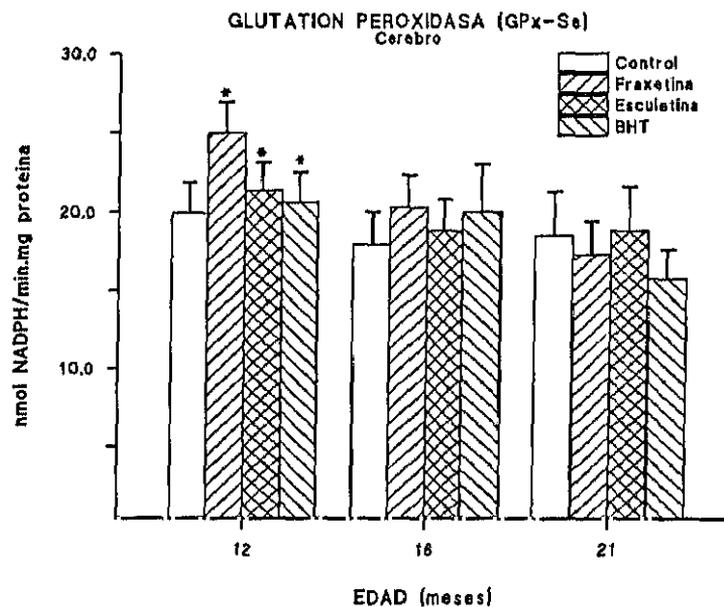


Fig. 15. Actividad GPx-Se en cerebro (* $p < 0.05$).

Tabla 15. Actividad enzimática específica de Glutacion reductasa (GR) en corteza cerebral.

| GLUTATION REDUCTASA - CEREBRO (nmoles NADPH / min . mg proteína) | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 6.255 ± 1.712 | 5.082 ± 1.962 | 6.922 ± 1.620 |
| FRAXETINA | 7.391 ± 1.554 | 6.661 ± 1.703 | 7.012 ± 2.827 |
| ESCULETINA | 6.008 ± 1.699 | 7.942 ± 2.023 | 8.815 ± 2.707 |
| BHT | 7.119 ± 1.002 | 7.532 ± 1.997 | 6.824 ± 1.108 |

No existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad a $p < 0.05$.

La actividad GR de cerebro permaneció invariable con la edad y el tratamiento (Fig. 16).

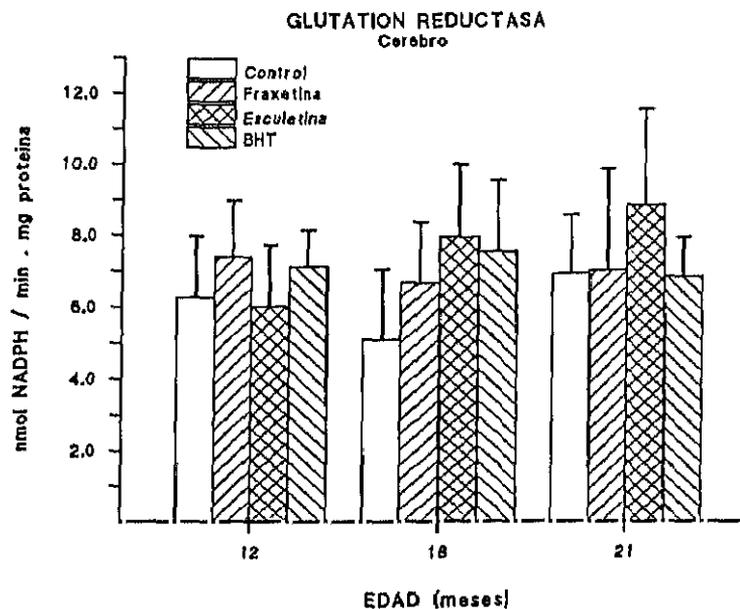


Fig. 16. Actividad GR en cerebro.

Tabla 16. Actividad enzimática específica de Citocromo c oxidasa (COX) en corteza cerebral.

| CITOCROMO C OXIDASA - CEREBRO (μ moles CIT C ox. / mg proteína) | | | |
|---|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| TRATAMIENTO | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 0.0235 \pm 0.0019 | 0.0221 \pm 0.0017 | 0.0255 \pm 0.0005 |
| FRAXETINA | 0.0243 \pm 0.0014 | 0.0357 \pm 0.0029* | 0.0430 \pm 0.0055* |
| ESCULETINA | 0.0357 \pm 0.0037* | 0.0449 \pm 0.0031* | 0.0467 \pm 0.0025** |
| BHT | 0.0451 \pm 0.0022** | 0.0201 \pm 0.0011 | 0.0214 \pm 0.0011** |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como: * $p < 0.05$, y ** $p < 0.01$.

La actividad COX no experimenta variaciones con la edad cuando los animales no reciben tratamiento. A la edad de 12 meses se vio incrementada su actividad con BHT y esculetina. A los 18 y 21 meses, la actividad experimenta un descenso moderado con BHT. Fraxetina y esculetina incrementan los niveles de COX con el aumento de la edad (Fig. 17).

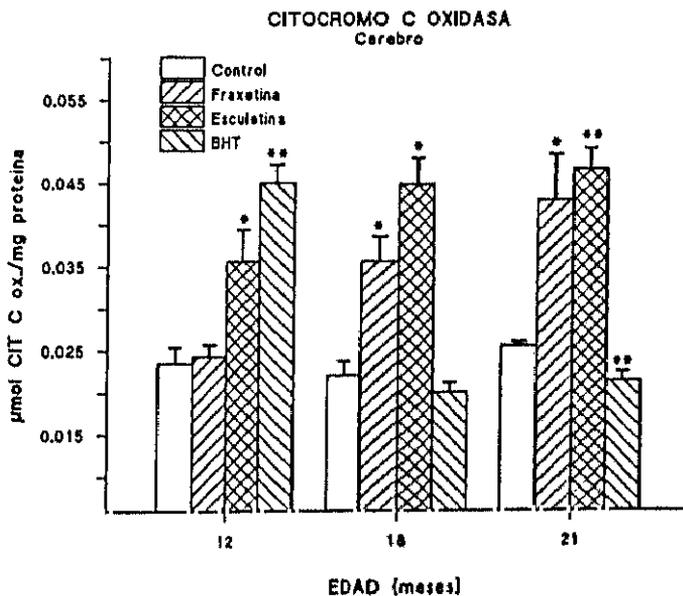


Fig. 17. Actividad COX en cerebro (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

B.2. / Sistema del glutatión

Los niveles de glutatión reducido y oxidado, respectivamente, se indican en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Concentración de glutatión reducido en cerebro.

| TRATAMIENTO | GSH ($\mu\text{mol/g}$ tejido) - CEREBRO | | |
|-------------|---|-------------------|-------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 0.242 \pm 0.025 | 0.205 \pm 0.067 | 0.199 \pm 0.072 |
| FRAXETINA | 0.257 \pm 0.022* | 0.227 \pm 0.072 | 0.202 \pm 0.059 |
| ESCULETINA | 0.283 \pm 0.028* | 0.239 \pm 0.085 | 0.229 \pm 0.078 |
| BHT | 0.201 \pm 0.019* | 0.195 \pm 0.069 | 0.211 \pm 0.065 |

Tabla 18. Concentración de glutatión oxidado en cerebro.

| TRATAMIENTO | GSSG ($\mu\text{mol/g}$ tejido) - CEREBRO | | |
|-------------|--|---------------------|---------------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 0.0361 \pm 0.0029 | 0.0617 \pm 0.0065 | 0.0787 \pm 0.0079 |
| FRAXETINA | 0.0221 \pm 0.0018* | 0.0715 \pm 0.0081 | 0.0778 \pm 0.0080 |
| ESCULETINA | 0.0254 \pm 0.0023* | 0.0712 \pm 0.0058 | 0.0802 \pm 0.0069 |
| BHT | 0.0216 \pm 0.0019* | 0.0575 \pm 0.0052 | 0.0849 \pm 0.0074 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * $p < 0.05$.

La concentración de glutatión reducido ha disminuido moderadamente de los 12 a los 18 meses. Sin embargo, no ha variado significativamente de los 18 a los 21 meses. Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre los distintos tratamientos para cada grupo de edad (Fig. 18).

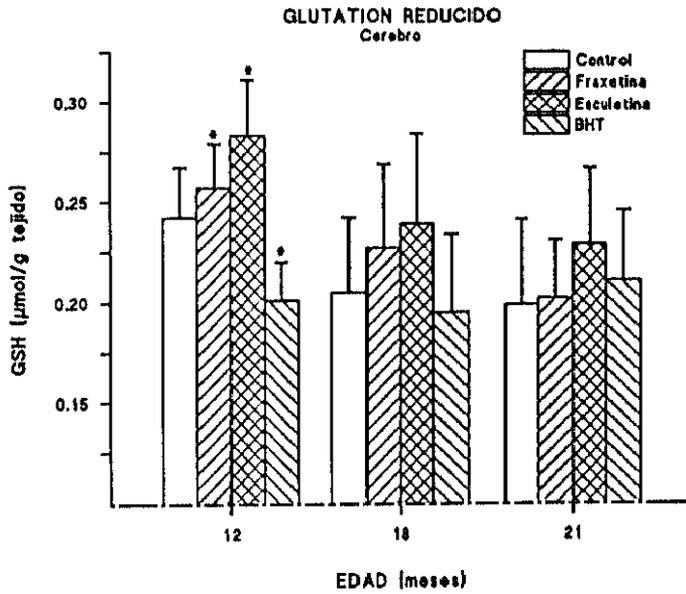


Fig. 18. Concentración GSH en cerebro (* p < 0.05).

Por otro lado, los niveles de glutatión oxidado han experimentado incrementos importantes ($p < 0.05$) con la edad. Solamente en el grupo de edad de 12 meses se han observado descensos significativos de todos los tratamientos respecto del control (no tratado), y también en el caso de BHT a los 18 meses (Fig. 19).

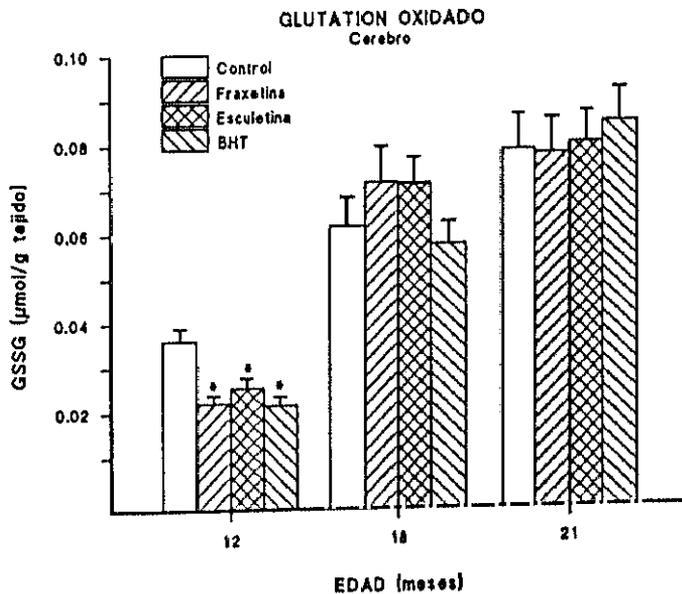


Fig. 19. Concentración de GSSG en cerebro (* p < 0.05)

B.3./ Estrés oxidativo tisular

El daño tisular se puede expresar como el índice de estrés oxidativo que resulta del cociente GSSG / GSH (Tabla 19), o como la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) (Tabla 20).

Tabla 19. Tasa de glutation oxidado / glutation reducido en corteza cerebral.

| TRATAMIENTO | ESTRÉS OXIDATIVO - CEREBRO (GSSG /GSH) | | |
|-------------|---|---------------|---------------|
| | 12 MESES | 18 MESES | 21 MESES |
| CONTROL | 0.149 ± 0.013 | 0.301 ± 0.039 | 0.395 ± 0.045 |
| FRAXETINA | 0.086 ± 0.008* | 0.315 ± 0.033 | 0.386 ± 0.041 |
| ESCULETINA | 0.090 ± 0.009* | 0.298 ± 0.035 | 0.350 ± 0.052 |
| BHT | 0.107 ± 0.009* | 0.295 ± 0.040 | 0.402 ± 0.049 |

Las diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad se indican como * p < 0.05.

El índice de estrés oxidativo expresado por el cociente GSSG/GSH, ha aumentado significativamente con la edad, de los 12 a los 18 meses. En el grupo de 12 meses, los distintos tratamientos descenden el índice de estrés de forma importante respecto del control (no tratado), con los menores valores para fraxetina y esculetina en comparación con BHT (Fig. 20).

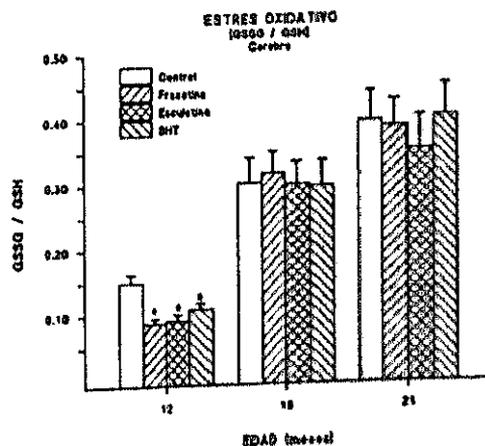


Fig. 20. Tasa de GSSG/GSH en cerebro (* p < 0.05).

Tabla 20. Concentración de TBAs *in vivo* (t incubación = 0 min) e *in vitro* (t incubación = 30 min), en corteza cerebral.

| ESTRÉS OXIDATIVO (nM MDA /g tejido) - CEREBRO | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| TTMO | 12 MESES | | 18 MESES | | 21 MESES | |
| | 0 min | 30 min | 0 min | 30 min | 0 min | 30 min |
| C | 370±85 | 1430±191 | 411±79 | 1806±357 | 274±64 | 1643±278 |
| F | 317±91 | 1379±170 | 379±90 | 1693±401 | 424±80 | 1790±341 |
| E | 321±80 | 1358±186 | 432±97 | 1789±308 | 376±99 | 1719±491 |
| BHT | 326± 98 | 1384±215 | 397±89 | 1701±433 | 310±79 | 1661±301 |

TTMO = tratamiento, C = control, F = fraxetina, E = esculetina

No existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto del grupo control (no tratado), para un mismo grupo de edad a $p < 0.05$.

La concentración endógena de sustancias reactivas al TBA *in vivo* (Fig. 21) no sufrió cambios significativos con la edad y el tipo de tratamiento, al igual que el TBA *in vitro* (Fig. 22).

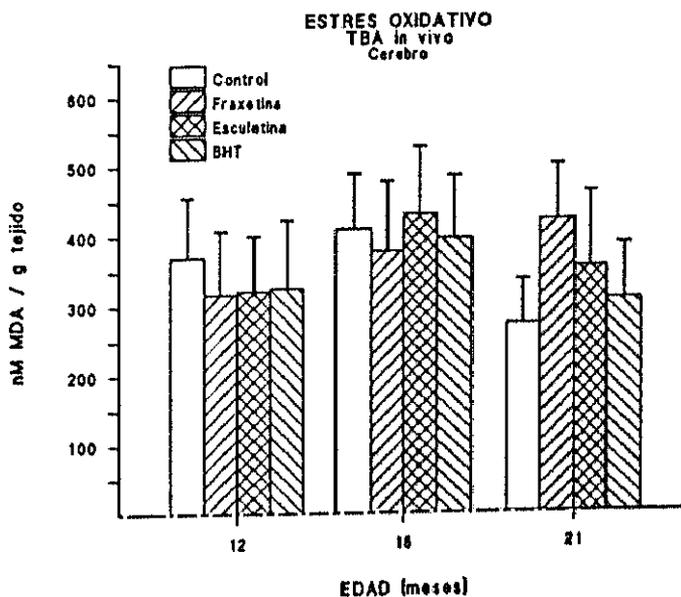


Fig. 21. Concentración de TBAs *in vivo* en cerebro.

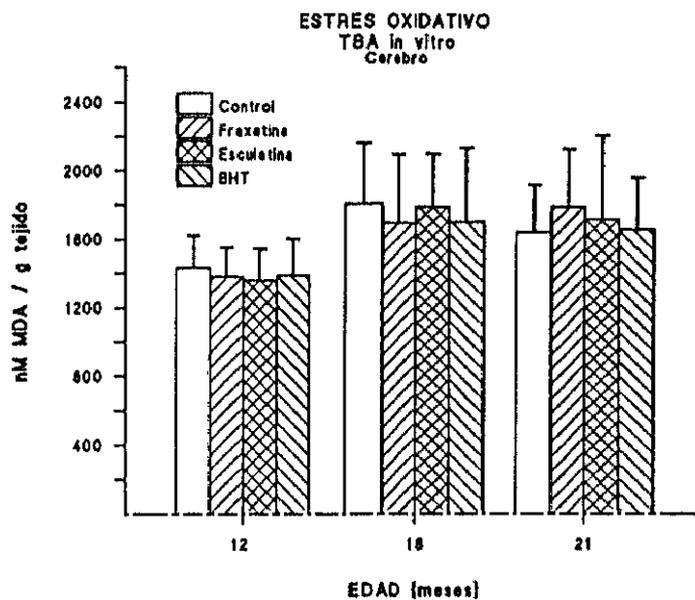


Fig. 22. Concentración de TBAs *in vitro* en cerebro.

No se han encontrado diferencias significativas comparando las dos muestras biológicas, hígado y cerebro, en la tasa de sustancias TBA positivas *in vivo*. Sin embargo, la estimulación de la peroxidación tisular provoca niveles más elevados de sustancias reactivas al TBA en el cerebro.

En síntesis, los resultados globales obtenidos en las determinaciones bioquímicas, se indican a continuación:

Hígado

- SOD, CAT, GSH y TBARS (*in vivo* e *in vitro*) no varían con la edad cuando los animales no reciben tratamiento. Sin embargo, mientras GPx total, GPx-Se, GR y COX disminuyen con la edad, GSSG y GSSG/GSH aumentan.
- El tratamiento de los animales con **BHT** produce deplección de la SOD a la edad de **12 y 18 meses**, pero sólo significativamente a los **21 meses**, respecto del control. Con fraxetina y esculetina, se producen también descensos en la SOD a las tres edades, pero no de forma significativa.
- La actividad **CAT** experimenta descensos significativos con **fraxetina, esculetina y BHT** a los **21 meses**, respecto de su control. También desciende con **BHT** a los **18 meses**.
- **GPx total** experimenta incrementos con el tratamiento de **BHT** a los **21 meses**, respecto del control. Con fraxetina y esculetina, dicha actividad disminuye con la edad pero no significativamente.
- **GPx-Se** desciende bajo el tratamiento con **fraxetina, esculetina y BHT** a los **12 meses**, respecto del control. Sin embargo, aumenta con la edad en el tratamiento con **BHT**.
- **GR** aumenta cuando los animales son tratados con **fraxetina, esculetina y BHT** a los **12 meses**, respecto del control.
- **COX** desciende a los **21 meses** con la administración de **fraxetina, esculetina** (no significativamente) y **BHT**, respecto del control.
- **GSH** aumenta a los **12 meses** con la administración de **fraxetina y esculetina**, y disminuye con la de **BHT**, respecto del control. A los **21 meses** disminuye con **fraxetina y esculetina**, y aumenta con **BHT** (no significativamente), respecto del control.

- GSSG disminuye a los 12 y 18 meses con el tratamiento con fraxetina y BHT, y a los 21 meses con fraxetina y esculetina, respecto del control.
- GSSG/GSH desciende a los 12 meses con la administración de fraxetina, esculetina y BHT, a los 18 meses con BHT, y a los 21 meses con fraxetina y esculetina.
- TBARS *in vivo* e *in vitro* no han sufrido diferencias significativas en función de la edad y del tratamiento.

Cerebro

- SOD, CAT, GPx total, GPx-Se, GR, COX, GSH y TBARS (*in vivo* e *in vitro*) no varían con la edad cuando los animales no reciben tratamiento. Por el contrario, GSSG y GSSG/GSH se ven incrementados con la edad.
- La SOD aumenta a los 12 meses cuando los animales son tratados con fraxetina, esculetina y BHT, también a los 18 y 21 meses con esculetina. Sin embargo, a los 21 meses desciende con el tratamiento de BHT.
- CAT no varía ni con la edad ni con el tratamiento.
- GPx total aumenta a los 12 meses con la administración a los animales de fraxetina, esculetina y BHT, respecto del control.
- GPx-Se experimenta incrementos a los 12 meses cuando los animales reciben fraxetina, esculetina y BHT.
- GR no varía ni con la edad ni con el tratamiento.
- COX se incrementa a los 12 meses con la administración a los animales de BHT y esculetina. Sin embargo, desciende con BHT a los 18 y 21 meses.
- GSH no varía ni con la edad ni con el tratamiento. GSH aumenta a los 12 meses con la administración de fraxetina y esculetina, y disminuye con BHT, respecto del control.

- GSSG disminuye a los 12 meses con fraxetina, esculetina y BHT, y a los 18 meses disminuye con BHT, respecto del control.
- GSSG/GSH disminuye a los 12 meses con fraxetina, esculetina, y sobre todo, con BHT, respecto del control.
- TBARS *in vivo* e *in vitro* no han sufrido diferencias significativas en función de la edad y del tratamiento.

A la vista de esta síntesis, los marcadores hepáticos de estrés oxidativo parecen más susceptibles de variación que los de corteza cerebral, mediante la administración de antioxidantes exógenos.

En el reajuste que sufren los antioxidantes endógenos, se produce un efecto compensatorio entre los mismos que finalmente da lugar a una disminución en el índice de estrés oxidativo GSSG/GSH. En hígado, la manipulación farmacológica es más sobresaliente a las edades más extremas. En corteza cerebral, el *status* oxidante/antioxidante sufre las mayores variaciones significativas a la edad de 12 meses.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS *IN VIVO*

4.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE COMPORTAMIENTO

Los **tests de comportamiento** especialmente designados para la investigación con roedores, pueden ser de gran valor para gerontólogos experimentales que emplean nutrientes o fármacos intentando retardar la senescencia. En este sentido, los compuestos que nosotros hemos estudiado pueden considerarse ambas cosas: son fármacos, que por las dosis administradas, tienen calidad de nutrientes.

Sin embargo, aunque ciertas funciones comportamentales específicas son deterioradas con la edad, otros comportamientos no se ven afectados. Por ello, es necesario primero caracterizar los déficits en el comportamiento más sobresalientes que se producen con el aumento de la edad, para elegir los tests más adecuados.

Esta utilidad de los tests de comportamiento ha sido reconocida por Tappel (1973) y por Miquel (1979a) en sus trabajos sobre los efectos de varios antioxidantes en la vitalidad y vida media del ratón.

La determinación de la **vitalidad y decline neuromuscular** dependiente de la edad y del tratamiento con fraxetina, esculetina y BHT, se ha llevado a cabo mediante el **test de la cuerda** diseñado por Miquel J. y Blasco M. (1978a).

Dado que la senescencia se ve acompañada por un descenso en el peso corporal de la mayoría de los ratones de una población, y que los de peso medio o ligero son mejores atletas que los de peso mayor de la misma edad, hemos visto apropiado hacer un análisis de la distribución del peso corporal. Por tanto, la simple valoración del test como porcentaje de ratones capaces de trasladarse hacia un polo en el tiempo establecido, sin referencia a su peso corporal, no expresa una estimación completa e íntegra de la extensión real del grado de deterioro muscular sufrido por los animales de distinta edad y tratamiento. Por esta razón, hemos expresado los resultados como **biomasa transportada**, minimizando así la influencia favorable del peso corporal ligero.

Por otro lado, se ha mostrado que la utilización de oxígeno total de los ratones macho C57BL/6J comienza a disminuir aproximadamente a partir de los 12 meses (Harrison, 1982). Esto puede estar relacionado con la dificultad en la ejecución del test. Es posible, siguiendo esta consideración, que la efectividad de la esculetina y del BHT se haga notar con el comienzo del declinar neuromuscular, como lo expresan nuestros resultados en el test a los 18 meses.

Es posible que el influjo positivo de estos compuestos y su seguimiento continuado en

la evaluación del vigor y coordinación muscular, pudiera conocerse mejor comenzando con el tratamiento de los animales desde los 12 meses hasta el final de la vida. Sin embargo, nuestros resultados nos proporcionan una información aproximada sobre el período de vida del ratón en el que estos compuestos hacen notar sus efectos. Y además hay que decir, que nuestro propósito en el planteamiento de este trabajo, no era conocer los efectos de estos compuestos en el seguimiento del comportamiento del ratón con el avance de la edad, sino la influencia de los mismos en grupos puntuales de edad (12, 18 y 21 meses) con un tiempo relativamente corto de tratamiento.

En este sentido, por seguimiento del descenso de peso corporal del ratón puede ser evaluado el decline fisiológico en una población de animales viejos, cuando prácticamente toda la cohorte está aún viva. En favor de la utilidad del test de la cuerda, Miquel (1978a) ha comprobado que en ratones control y tratados con antioxidantes, la supervivencia media es un dato que se obtiene varios meses después del descenso en el 50 % de animales que responden con éxito a la prueba. Esto es muy favorable, pues reduce el tiempo necesario para completar un experimento de comportamiento con modificación de la tasa de envejecimiento. Además, la determinación predictiva del envejecimiento por esta técnica puede proporcionar datos más concluyentes sobre los efectos beneficiosos o perjudiciales de un tratamiento farmacológico o nutricional que un análisis de cinéticas de mortalidad.

Entre los tests de comportamiento más adecuados para nuestro estudio, el presente test de la cuerda fue seleccionado como prioritario a la vista de la bibliografía (Miquel, 1978a; Dean, 1981). Y aunque se deberían apreciar descensos más notables en la ejecución por parte del ratón senescente, nosotros no hemos encontrado diferencias significativas de éxito en los animales control entre las diferentes edades.

La prioridad de este test, en contraste con las técnicas convencionales (ejecución en disco rotatorio, actividad exploratoria y aprendizaje) (Wax, 1975; Elías, 1975; Eleftheriou, 1975), se fundamenta en el hecho de que el estrés que sufre el animal por estar asentado sobre una cuerda, puede movilizar sus reservas vitales, que se ven incrementadas bajo circunstancias adversas. Esto puede estar en concordancia con el concepto de que las diferencias entre individuos jóvenes y viejos, tratados y no tratados, lleguen a ser más evidentes cuando tienen que ejecutar una prueba por encima de sus reservas fisiológicas.

Desórdenes en la función motora se han atribuido a las EAO, responsables de la degeneración selectiva de las neuronas motoras. Por ello, es de gran interés evaluar el comportamiento animal mediante una técnica sencilla, como el test del *rota-rod*, que valore dicha función.

En la evaluación de la **coordinación motora** de los animales, mediante la prueba en el **cilindro rotatorio** (*rota-rod*), no hemos encontrado diferencias importantes en los tiempos de permanencia para los distintos grupos de edad y tratamiento. Únicamente se ha observado incrementos significativos en la segunda semana con el tratamiento de fraxetina y esculetina, a la edad de 12 meses; en la tercera semana con esculetina y BHT, a los 18 meses; y también en la tercera semana con fraxetina, a los 21 meses. Sin embargo, los animales control de cada grupo de edad, o bien experimentan descensos en el tiempo de permanencia, a medida que se repite el test, o bien no se observan variaciones significativas entre las distintas semanas. De cualquier forma, los resultados obtenidos a partir de los tratamientos con los productos en estudio, no expresan un modo de comportamiento definido que los caracterice. Quizás, para este estudio, dicho test no posee la suficiente sensibilidad para estimar las modificaciones que se producen en la coordinación motora dependientes de esta manipulación farmacológica, y asimismo, del deterioro asociado a la edad. Su utilidad estará, más bien, enfocada a evaluar la acción de fármacos, depresivos o antidepressivos (Hassert, 1961), cuyo efecto en los animales de experimentación es muy sobresaliente y evidente. Por tanto, el test del *rota-rod* no nos parece una técnica especialmente sensible en estudios gerontológicos.

Al igual que la mayoría de los sistemas del organismo, el sistema nervioso central (SNC) sufre degeneración significativa con la edad produciendo deterioro funcional. Y entre una de sus manifestaciones destaca una cierta incapacidad de los animales en el aprendizaje y en la memoria para evitar un estímulo nocivo mediante inhibición de una respuesta que normalmente tiene lugar con una elevada probabilidad. La evaluación de la alteración de esta conducta es la que fundamenta el **test de evitación pasiva**, utilizado en Farmacología y Neurobiología para el estudio de fármacos que modifican la función de la memoria, o que producen mejora marginal y/o selectiva en ciertos pacientes geriátricos. Además, en favor de la utilidad de este test para nuestro trabajo, hay que decir que, en estudios comportamentales dependientes de la edad con ratones C57BL/6J (Dean, 1981), el déficit más preciso y sobresaliente se observó en el test de evitación pasiva, en el que los ratones viejos mostraron tiempos de latencia significativamente más cortos que los jóvenes para pasar al interior de la cámara oscura de *shock*.

Los resultados de nuestras experiencias con los animales control, en la respuesta de evitación pasiva, se aproximan al estudio citado anteriormente, es decir, experimentan con la edad un descenso en el tiempo de latencia, que es significativo a las 120 horas del test. El tratamiento con fraxetina, sin embargo, produce aumentos en el tiempo de latencia variables con la edad a las 24 horas después del aprendizaje, entre los 12 y 21, y entre los 18 y 21 meses. Los incrementos en los tiempos de latencia bajo el tratamiento con esculetina son más

notables con el aumento de la edad, sobre todo a las 120 horas después del aprendizaje. El efecto de BHT, por el contrario, no parece estar determinado por la edad, sin embargo aumenta los tiempos de latencia respecto de su control a todas las edades, a las 24 y 120 horas para los 12 y 18 meses, y sólo a las 120 horas para los 21 meses.

En la comparación de estos tres compuestos, y a la vista de los valores obtenidos en el tiempo de latencia, podríamos decir que, fraxetina produce una facilitación en el aprendizaje de la prueba (incrementa significativamente el tiempo de retención a las 24 horas después del test); esculetina no sólo mejora la adquisición de la prueba (24 horas) sino que facilita su recuerdo (120 horas) al igual que BHT. Mientras las cumarinas parecen ejercer sus efectos más favorables con el avance de la senescencia, BHT se muestra eficaz a las tres edades consideradas.

Por otro lado, los cambios en la fisiología cerebral (y por tanto comportamental) dependientes de la edad pueden estar asociados con el daño oxidativo, es decir, con la oxidación de sus proteínas, por ejemplo, y puede ser un determinante crítico de la función cerebral (Ames, 1993; Harman, 1993). Y así, se ha comprobado que el tratamiento crónico de animales viejos con compuestos *scavenger* causa un descenso en los niveles de proteína oxidada y un aumento en la glutamina sintetasa (GS) (se encuentra disminuida en animales viejos). Sin embargo, cuando cede el tratamiento, la concentración de proteína oxidada y de GS vuelven al nivel anterior al tratamiento. En los animales jóvenes, por el contrario, no se observa modificación significativa (Carney, 1991). A la vista de estas experiencias, y con la estimación de resultados que hemos hecho en el test de evitación, cabría la posibilidad de atribuir a fraxetina y esculetina los mencionados efectos *scavenger* en la prevención del daño oxidativo proteico, teniendo en cuenta que ciertas regiones del cerebro tienen grandes concentraciones de hierro (metal catalíticamente implicado en la producción de especies radicalarias de oxígeno) (Ames, 1993; Yu, 1994) y que estos compuestos tienen capacidad quelante del mismo. Por tanto, el incremento asociado a la edad en la vulnerabilidad del tejido cerebral a la oxidación, puede ser disminuido por compuestos antioxidantes, como son los que ocupan nuestra investigación.

La facilitación en el aprendizaje podría también atribuirse al efecto tónico ejercido por estas cumarinas en la actividad cortical que se ve disminuida en la senescencia (Petkov, 1987). En este sentido, se ha comprobado que el BHT disminuye los efectos de una deficiencia de colina en los sistemas hepático, renal y cardiovascular, particularmente por la disminución de las lesiones en estos tejidos (protección frente al daño oxidativo), y por el descenso que produce en la colinesterasa (Branen, 1975). Estos efectos son correlativos con los resultados que hemos obtenido en la metodología comportamental (evitación pasiva), pues los déficits de colina (Bartus, 1980; Nishizawa, 1991) se manifiestan en un deterioro en comportamientos que precisan memoria y retención de eventos. La facilitación en la retención y, por tanto, el

aumento del tiempo de latencia en la evitación pasiva, en los animales tratados con fraxetina y esculetina, podría transcurrir por un mecanismo similar al BHT. Esta acción, si cabe, de nuestros compuestos fenólicos, podría llevarse a cabo por una protección de receptores colinérgicos (Ma, 1993) frente a la oxidación proteica (Ames, 1993).

Aunque más adelante hablemos de las modificaciones en los niveles de antioxidantes enzimáticos, viene al caso mencionar la relación que se puede establecer entre el comportamiento animal y la concentración de antioxidantes endógenos por manipulación farmacológica. Y así, se ha puesto de manifiesto una mejora en la memoria de monos viejos, estadísticamente significativa, por el tratamiento con el antioxidante centrofenoxina (Dean, 1981), el cual produce un incremento en la actividad de la glutatión reductasa de cerebro de rata (Khanna, 1992).

Parece razonable, por tanto, establecer una asociación entre los efectos de las cumarinas estudiadas en los tests de comportamiento y las determinaciones bioquímicas obtenidas.

4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA MEDIDA DE ANTIOXIDANTES Y DEL DAÑO TISULAR

El objetivo de este trabajo *in vitro*, a partir de muestras biológicas, hígado y corteza cerebral, pretende contribuir al conocimiento sobre las EAO y peroxidación tisular como factores implicados en el envejecimiento, y el papel controvertido de los antioxidantes en dicho proceso. Con esta pauta, se ha llevado a cabo la determinación de las principales defensas antioxidantes endógenas y de la peroxidación lipídica, como indicadores del grado de estrés oxidativo asociado al envejecimiento, en ratones macho C57BL/6J de 12, 18 y 21 meses, tratados con fraxetina, esculetina, y BHT.

En estudios *in vivo* (roedores, *Drosophila*) realizados con antioxidantes de origen natural y sintético, se ha comprobado un incremento en la expectativa de vida media, pero no de la vida máxima, es decir, un retraso en el proceso de envejecimiento sin modificación del mismo (Harman, 1961; 1968; 1969; 1978; 1981; Comfort, 1971). Sin embargo, estos trabajos se destinaron exclusivamente a medir la expectativa de vida, y no se reforzaron con el examen de parámetros fisiológicos y del *status* oxidativo de los animales tratados con antioxidantes, como una función de la edad (Yu, 1994).

Por otro lado, algunas investigaciones (Ross, 1969; Harman, 1993) han intentado establecer una relación entre la expectativa de vida del animal de experimentación, y los niveles de actividad enzimática de diversos órganos, por modificación de alguno de los ingredientes de la dieta, o por reducción calórica. Con estas referencias y las mencionadas anteriormente acerca del incremento en la longevidad por medio de dietas antioxidantes (Harman, 1961; 1968; 1969; 1978; 1981; Comfort, 1971), hemos estudiado los cambios experimentados en los principales antioxidantes endógenos (asociados con la edad) y el grado de daño tisular, en hígado y corteza cerebral, de ratones C57BL/6J de diferentes edades, por administración crónica de fraxetina y esculetina. Como patrón de referencia se ha utilizado el butil-hidroxitolueno (BHT) (Sgaragli, 1993; Kaneko, 1994), cuyos efectos tóxicos son virtualmente ausentes tanto en roedores como en primates tratados crónicamente con una dosis de 50 mg/Kg o menor (Brannen, 1975). Este compuesto, así como el butil-hidroxianisol (BHA), previene la oxidación de lípidos por donación de un hidrógeno a las EAO. En la selección del patrón cabía la posibilidad de emplear BHA, antioxidante también ampliamente utilizado como aditivo alimentario, pero debido a su mayor velocidad de excreción del organismo animal (Cha, 1982), nos inclinamos por el primero. También nos parecía razonable el uso de BHT porque la ingestión crónica del mismo tiene efectos beneficiosos cuando la vitamina E está

disminuida o es escasa, y porque modifica la toxicidad aguda de muchos metabolitos mutágenos y carcinógenos mediante un incremento en las enzimas que metabolizan fármacos (Cha, 1982). El BHT actúa similarmente a la vitamina E en la dieta preventiva de reticulocitosis y encefalomalacia en pollos (Marco, 1961; Machlin, 1960); en la prevención de la oxidación de la grasa hepática de mono; en la prevención de hígado graso, etc.

Es muy probable, como ocurre con el BHT, que la administración exógena de cumarinas produzca un reajuste en los niveles lipídicos, y en los antioxidantes endógenos (Branen, 1975; LeBlanc, 1993).

Los cambios que nosotros hemos observado en las defensas antioxidantes y en el grado de daño tisular, son moderados respecto al grupo control no tratado, ya que las dosis de cumarina administrada son relativamente bajas, y equivalen a las recomendadas en una dieta diaria con BHT (Branen, 1975). La elección de esta dosis y los cambios observados son congruentes con los estudios de Ross (1969), en los que observó que la expectativa de vida era menor y la incidencia de tumores y otras enfermedades era mayor en las ratas, cuando en sus dietas se incluían ingredientes que provocaban un cambio muy notable en la actividad de diversas enzimas. Es más, se ha comprobado que los niveles muy incrementados de SOD en ratones transgénicos tienen un efecto deletéreo (Harman, 1993; Meléndez, 1993).

Por otro lado, estas cumarinas no se incluyen en el pienso ni en la bebida de los animales, cuya ingesta es *ad libitum*, sino que son administradas vía oral mediante sonda gástrica. Esto supone una dosificación bastante segura durante el tiempo de tratamiento. Los estudios realizados hasta el momento con otros antioxidantes (BHT, BHA, 2-mercaptoetilamina, etoxiquina, etc.) incluyen dichos compuestos en la comida o bebida del animal, y por ello, la dosis que ingiere cada individuo sólo puede calcularse con aproximación. Con estas dietas semisintéticas se ha hecho evidente una pérdida de peso y de grasa corporal en el animal (Comfort, 1971), atribuible a dos posibles factores principalmente, bien a la dieta antioxidante *per sé*, o bien a un descenso progresivo en la ingesta que resulta desagradable al animal con el nuevo componente porque modifica las características organolépticas de la dieta. La causa podría ser más fácilmente conocida con nuestra metodología. Y así, las variaciones de peso y de antioxidantes endógenos serían atribuibles directamente al mecanismo por el que actúan estos compuestos fenólicos. Podría tener relación con el proceso que tiene lugar mediante la restricción calórica, ya que con ella se han obtenido en ratas viejas, niveles de actividad enzimática similares a los de ratas jóvenes, incluso incrementos en la expectativa de vida media y máxima, aproximadamente del 50% (Ames, 1993; Harman, 1993). La restricción calórica que disminuye la tasa metabólica y, por tanto el consumo de oxígeno, es responsable en definitiva de un menor nivel de producción de peróxido de hidrógeno

mitocondrial (Ames, 1993). Además, las EAO constituyen una clase importante de agentes que estimulan la división celular, por eso, la disminución de la tasa metabólica hace más eficiente la reparación del DNA, y por tanto, es un factor de protección frente al daño oxidativo del mismo. El paralelismo entre la restricción calórica y la administración de antioxidantes se podría establecer por el hecho de que éstos con su acción *scavenger* de EAO disminuyen la mitosis celular (Ames, 1993).

Si la tasa metabólica es directamente proporcional a la producción de radicales libres de oxígeno e hidroperóxidos y al estrés oxidativo consecuente, parece lógico que las defensas antioxidantes estén asociadas con el potencial metabólico (oxígeno total consumido durante la vida; variable con la edad y la especie animal) (Sohal, 1993b), y también con un aporte exógeno de antioxidantes (Harman, 1993). Y así, la disminución de algunos antioxidantes endógenos y el incremento de otros, con la administración de cumarinas y BHT (Rahimtula, 1982), podría explicarse por un mecanismo de supercompensación y reajuste, que se expresa, finalmente, en una capacidad antioxidante global mayor (Harman, 1993). Este fenómeno compensatorio en los niveles de antioxidantes, lo hemos sugerido porque, en roedores y *Musca domestica* se ha encontrado una correlación positiva entre la vida media y la inducción de SOD, GSH y GR cuando se produce deplección farmacológica de CAT (López-Torres, 1993b).

Los cambios que nosotros hemos encontrado en los niveles endógenos de antioxidantes y de productos de reacción de radicales libres de oxígeno, relacionados con la edad (Vertechy, 1993) y el tratamiento, parecen selectivos y variables en ambos tejidos, describiéndose también diferencias entre especies (Pérez-Campo, 1993; López-Torres, 1993a). Hay que tener en cuenta la gran variabilidad interindividual que hemos observado en un tejido determinado procedente de un mismo grupo de edad y tratamiento, pese al hecho de haber utilizado una raza de ratón consanguínea. Esta variabilidad se aprecia a la vista de los resultados, cuyo error estándar es bastante importante y no permite encontrar, en muchos casos, diferencias significativas entre poblaciones distintas, cuando se realiza el análisis de la varianza. degmuchos casos, diferencias significativas entre poblaciones distintas, cuando se realiza el análisis de la varianza.

Las deficiencias cerebrales que se producen con la madurez y la senescencia, están más relacionadas con el fracaso de las funciones metabólicas para adaptarse al envejecimiento, que con una insuficiencia en el flujo sanguíneo (Benzi, 1979). Investigaciones sobre el efecto de fármacos en el metabolismo cerebral utilizan modelos de hipoxia (hipoxia hipóxica, anémica

o isquémica) y evalúan a nivel cerebral las modificaciones experimentadas por sustratos, intermediarios de la glucólisis, intermediarios del ciclo del ácido carboxílico, mediadores energéticos, etc. Pero estos estudios se han de completar con el desarrollo de modelos crónicos, como el presente, que estudien los cambios naturales dependientes de la madurez y senescencia del metabolismo cerebral mediante la evaluación de actividades enzimáticas y otros parámetros bioquímicos como una expresión de la regulación farmacológica.

Previamente a la discusión de los resultados obtenidos en las medidas de antioxidantes y daño tisular en cerebro, es preciso tener en cuenta una serie de cuestiones. Algunas áreas importantes del cerebro pueden sufrir distinto ajuste bioquímico como consecuencia del tratamiento farmacológico debido a la heterogeneidad funcional y anatómica de este órgano. Y aunque hayamos sido extremadamente cuidadosos en el aislamiento de la corteza cerebral del tejido restante, hay que contar con el error de manipulación en la estimación de los parámetros bioquímicos.

La naturaleza de las moléculas de antioxidantes endógenos no cambia con la edad, pero sí sus propiedades de inducción (Benzi, 1979). Los cambios dependientes de la edad que sufren éstos, condicionan las respuestas al estímulo farmacológico. La elección de un tratamiento de cinco semanas la hemos hecho en función de la respuesta farmacológica, ya que se ha observado con diferentes fármacos, que ésta es muy notoria tras las primeras cuatro semanas. Y así, después de 12 semanas de tratamiento, ésta es menos evidente (Benzi, 1979). La respuesta enzimática a un tratamiento crónico puede ser cualitativamente similar a la de un tratamiento agudo, combinando adecuadamente los factores dosis-tiempo (Benzi, 1979). Dosis elevadas producen un efecto en la actividad enzimática inmediato, sin embargo dosis discretas en un tratamiento diario durante un largo tiempo exhiben efecto similar pero con un tiempo mayor de latencia (Benzi, 1979). Esta aproximación puede ser de gran validez para predecir las acciones de fraxetina y esculetina sobre los parámetros bioquímicos considerados, durante distintos períodos de tiempo más o menos prolongados, y salvar así, las limitaciones del estudio que hemos llevado a cabo.

La relación GSSG/GSH, ampliamente reconocida como un indicador del estado redox de los tejidos, se ve modificada por fraxetina y esculetina en ambos tejidos a las distintas edades, respecto del control, también en el tratamiento con BHT. El cociente de GSSG/GSH experimentado por BHT en corteza cerebral, significativamente menor que en el control, ha sido aún más pequeño con fraxetina y esculetina. Se podría encontrar explicación en el aumento de la actividad de la glutatión reductasa (GR), sin embargo, sólo hemos apreciado incrementos significativos de dicho enzima en hígado, mayores con las cumarinas que con

BHT (Sharma, 1993). Esta inducción del enzima GR, también se ha comprobado con otros antioxidantes como BHA, propil galato, alfa-tocoferol, centofenoxina (Khanna, 1992), y lobenzarit disódico (4-cloro-2,2-iminodibenzoato disódico) (Armesto, 1993). Esta actividad incrementada puede representar un mecanismo de protección celular que mantiene el poder reductor requerido para defender al organismo del daño oxidativo. Y en definitiva puedan comportarse como agentes que inhiban o reviertan la deplección del glutatión asociada a estados de estrés o degenerativos (Joyeux, 1990; Payá, 1993b; Armesto, 1993). Es probable que estos compuestos, también las cumarinas, induzcan modificación en la conformación enzimática sin ningún cambio covalente (Khanna, 1992). Siguiendo esta idea, el descenso experimentado por ciertas enzimas en nuestro estudio, podría ser debido a una inhibición no competitiva ejercida por estos compuestos fenólicos. Algunos enzimas que precisan de iones metálicos para su actividad, son inhibidos no competitivamente por agentes capaces de unirse al metal esencial (Lehninger, 1984). Así ocurre, por ej., con el quelante EDTA que se une reversiblemente al Mg^{2+} y a otros cationes divalentes, inhibiendo de un modo no competitivo a las enzimas que precisan de tales iones para su actividad (Lehninger, 1984). Estas cumarinas, *in vivo*, podrían actuar como quelantes del hierro (GPx y catalasa requieren hierro), que es un factor primordial en la peroxidación lipídica. Esta inhibición no competitiva del enzima, si es que este es el mecanismo, es reversible, es decir, los niveles de actividad enzimática retornan a los valores normales cuando cede el tratamiento y el compuesto va siendo eliminado. En este sentido, se ha comprobado que las modificaciones enzimáticas producidas en roedores por el tratamiento crónico con BHT, ceden cuando se suspende su administración (Branen, 1975). Por ello, sería preciso que el aporte exógeno de antioxidantes se realizara de forma crónica.

La ausencia de cambios en la actividad de la GPx total hepática, en función de la edad y del tratamiento con las respectivas cumarinas, unido al descenso que provocan en la GPx-Se dependiente, sugiere que la actividad que realmente aumenta corresponde a la GPx no selenio dependiente. La actividad GPx no selenio dependiente es debida realmente a la presencia de algunos tipos de glutatión transferasas (Paglia, 1967; Lawrence, 1976). Como indican nuestros resultados, BHT ha incrementado ambas actividades, dependiente y no dependiente de selenio. En concordancia con estos resultados, la bibliografía describe una actividad incrementada de glutatión S-transferasa en rata y ratón tratados con BHT y BHA (Cha, 1982). El mecanismo por el cual inducen esta actividad aún no se conoce, pero es posible que se produzcan cantidades elevadas de radicales libres estables de BHA y BHT como consecuencia de la donación de hidrógeno, cuya concentración elevada estimule la formación de glutatión y de dicho enzima. Esta hipótesis se apoya en el hallazgo de metabolitos radicalarios libres estables. En esta línea, fraxetina y esculetina poseen una estructura química con grupos fenólicos

capaces de formar especies activas estables, al igual que BHT y BHA. Por tanto, esta acción que supone un aumento en la concentración de los sistemas enzimáticos detoxificadores inherentes en las células vivas, confiere una protección tisular frente a agentes tóxicos y carcinógenos.

La actividad COX es un índice de la capacidad aeróbica máxima de los animales. La actividad en hígado disminuye con la edad en los animales control, que no reciben tratamiento, sin embargo, en cerebro no varía significativamente. Estos resultados confirman los estudios realizados con insectos y mamíferos, en los que se ha hecho evidente un decline en la actividad COX con el aumento de la edad (Sohal, 1993a). Estos hallazgos sugieren que la capacidad máxima de consumo de oxígeno (no la basal) y de generación de radicales libres pudiera disminuir en los animales con el avance de la edad. Sin embargo, se ha hecho evidente que la inhibición parcial de la COX puede incrementar la producción de peróxido de hidrógeno mitocondrial (Sohal, 1993a). Este bloqueo parcial del flujo de electrones altera los potenciales reductores de algunos transportadores electrónicos y favorece su autoxidación y consecuente generación de anión superóxido (Sohal, 1993a). Por tanto, parece que las consecuencias que se derivan del descenso en la COX son controvertidas. Por tanto, el descenso en esta actividad enzimática con el aumento de la edad, puede transcurrir por un mecanismo distinto al que se produce con la inhibición parcial de dicho enzima.

En hígado, sólo en el grupo de 21 meses, hemos detectado descensos significativos en la actividad con el tratamiento de fraxetina y BHT, respecto del control. Sin embargo, en cerebro, fraxetina y esculetina producen incrementos importantes a las tres edades consideradas. Quizás, estos resultados de actividad incrementada en corteza cerebral, expliquen la acción favorecedora de estas cumarinas en el flujo electrónico de la cadena mitocondrial en un tejido donde la producción de EAO es mayor que en hígado.

Los resultados de las medidas de antioxidantes endógenos en hígado pueden discutirse del siguiente modo:

- La deplección significativa de SOD y CAT a los 21 meses, en los animales tratados con BHT podría ser contrarrestada por un aumento en la concentración de GSH y en la actividad GPx total, y por un descenso en la COX.

- Los descensos en la CAT a los 21 meses producidos por fraxetina y esculetina, pueden ser compensados con un descenso en el índice de estrés oxidativo GSSG/GSH, y en la COX.

- El descenso en la GPx-Se a los 12 meses bajo el tratamiento con fraxetina, esculetina y BHT, podría estar relacionado con el incremento producido en la actividad GR, y como consecuencia, con la disminución en el índice GSSG/GSH.

Del mismo modo, los resultados de las medidas de antioxidantes en corteza cerebral, podrían explicarse como sigue:

- El incremento en la COX a los 12 meses bajo el tratamiento con fraxetina, esculetina y BHT, respecto del control, puede ser concordante con un aumento en la SOD, GPx total, GPx-Se, y como consecuencia, una disminución en la tasa GSSG/GSH.

- La deplección de SOD a los 21 meses bajo el tratamiento con BHT, respecto de su control, podría reajustarse con el decline observado en la COX.

- El descenso en la concentración de GSSG a los 18 meses en los animales tratados con BHT, respecto de su control, es paralelo a un descenso en la actividad COX.

En nuestro estudio, la concentración endógena de sustancias reactivas al TBA *in vivo* para hígado y cerebro, no cambió en función de la edad y del tratamiento, indicativo de que no se ha producido una acumulación de productos de peroxidación en los animales de 18 y 21 meses respecto de los de 12, ni en los control (no tratados) respecto de los tratados. En trabajos realizados con rata y *Rana perezi* (Barja de Quiroga, 1990), tampoco se obtuvieron variaciones en el TBA *in vivo*, con la edad.

Conviene tener presente, que a pesar de la gran sensibilidad del test del TBA, su especificidad es muy baja, es decir, alrededor de un 90% de los valores del TBA *in vivo* no corresponden a MDA (malondialdehído) sino a otros compuestos relacionados (por ej., hidroperóxidos) o no (por ej., glucosa) con la peroxidación lipídica (Sohal, 1990).

Por el contrario, cuando la peroxidación es inducida *in vitro*, se genera una tasa elevada de malondialdehído e hidroperóxidos. Y de este modo, en los resultados que se obtienen del test, la contribución de otras sustancias relacionadas con la peroxidación lipídica es menor. Los ensayos del TBA pueden estimar con precisión la concentración de productos peroxidativos en muestras biológicas sólo después de su estimulación *in vitro*, mientras que los valores *in vivo* serían algo controvertidos como indicadores del grado de peroxidación en los distintos grupos de edad y tratamiento. Sin embargo, a pesar de la especificidad del TBA *in vitro*, éste no determina el daño oxidativo presente *in vivo*, sino la sensibilidad adicional

inducida *in vitro*.

Comparando ambos órganos, el cerebro mostró niveles de peroxidación tisular mucho más elevados que el hígado. Este alto nivel de peroxidación del cerebro se puede atribuir a la composición de sus células, a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y en hierro (Carney, 1991; Nisticò, 1992), y a su continua generación de radicales libres por la actividad oxidativa mitocondrial y de metabolitos oxidativos derivados de varias funciones como las metabólicas específicas (catabolismo de catecolaminas).

Hay que señalar que el valor del TBA *in vitro* depende mucho de la presencia de antioxidantes lipídicos (vitamina E) y de la grasa insaturada de la dieta (López-Torres, 1993a; 1993b). Nuestros compuestos fenólicos junto con el patrón, no hacen descender la tasa de productos TBA positivos *in vitro*, quizá por sus características farmacocinéticas, que no les proporcionan la liposolubilidad adecuada para su acceso y acumulación en el órgano.

El glutatión, uno de los tres principales antioxidantes endógenos, presenta niveles superiores en hígado que en cerebro. En todos los casos se han obtenido valores inferiores de glutatión oxidado (GSSG) en relación a la forma reducida.

Los resultados obtenidos en nuestras determinaciones, tanto del glutatión reducido como del oxidado, han sido inferiores a los revisados en la bibliografía (Cha, 1979; 1982). Esto no es sorprendente si se tiene en cuenta que muchos de esos estudios se han llevado a cabo con algunas diferencias en la metodología, y en las condiciones de mantenimiento de los animales en el laboratorio, entre otras razones. Sin embargo, los valores del índice de estrés oxidativo que expresa el cociente GSSG/GSH sí pueden ser comparables a otros estudios (Cha, 1979; 1982). Lo fundamental no es tanto conocer con exactitud las tasas de glutatión oxidado y reducido, sino la relación entre ambas, que es lo que realmente expresa el grado de *turnover* o reciclaje que experimenta el glutatión así como el estado redox celular.

Por otra lado, destacando la importancia de este antioxidante no enzimático, se ha visto que la susceptibilidad a la deplección del glutatión aumenta en los animales con la edad (Vogt, 1993), como índice del estrés oxidativo. Por tanto, las diferencias en la homeostasis del glutatión están asociadas a la edad, y ello contribuye a las patologías y cambios observados en el envejecimiento (Viña, 1989; Sastre, 1992; Vogt, 1993).

En las presentes experiencias, BHT, fraxetina y esculetina reducen el estrés oxidativo en hígado y cerebro a los 12 meses, mientras que a la edad de 21 meses sólo parecen efectivas las cumarinas señaladas. Estos valores se pueden atribuir a una estimulación en la reducción del glutatión oxidado o, a una estimulación en la síntesis de glutatión a partir de precursores de la dieta o de aminoácidos producto de la degradación de proteínas, que producen niveles de glutatión reducido mayores que el control.

A la edad de 21 meses, en hígado, estas cumarinas hacen más patente su posible efecto

hepatoprotector, quizá porque a esta edad la deplección de glutatión es más acusada. Es sorprendente, en consonancia con los resultados de estas experiencias, cómo estos compuestos en modelos *in vitro* de intoxicación hepática por xenobióticos (Joyeux, 1990; Payá, 1993b), tienen efecto hepatoprotector. Quizás por ello, su acción parece más evidente en el hígado de animal viejo, cuya degeneración se asemeja más, aunque relativamente, a una intoxicación aguda. Sin embargo, la efectividad de estos compuestos en animales de edad avanzada no retorna el índice de estrés al equivalente de un animal joven (12 meses). Esto puede indicar que dichos compuestos actúan protegiendo y previniendo el daño por peroxidación mediante el mantenimiento del estado redox celular cuando se ve disminuido (Payá, 1993b; Viña, 1989).

Mientras el test del TBA expresa la susceptibilidad de un tejido al daño por peroxidación tisular, el cociente GSSG/GSH indica el grado de protección celular. Quizá el segundo es más apropiado en el estudio farmacológico, como es nuestro caso, y el primero es más útil para el estudio de la fisiología de un tejido. De cualquier forma, los diferentes modos de determinar el estrés oxidativo pueden ser útiles para tener una comprensión más amplia de la peroxidación de un tejido determinado.

Finalmente, los resultados de nuestras experiencias nos llevan a interpretar que el envejecimiento *per se* no hace descender de forma general los antioxidantes endógenos, y no incrementa la peroxidación lipídica (Rodríguez-Martínez, 1992). Además, la disminución que hemos observado en los niveles de un antioxidante endógeno por la administración de cumarinas y BHT, no indica un aumento en la vulnerabilidad del tejido, sino un reajuste compensatorio respecto a los demás sistemas antioxidantes cuyo efecto global ha sido asegurar el estado redox celular mediante un descenso en la tasa GSSG/GSH. Sin embargo, se ha comprobado que el incremento global en la capacidad antioxidante por la administración exógena de fármacos, favorece la resistencia a factores que causan la muerte, aumentando la vida media pero no la expectativa de vida máxima (López-Torres, 1993b), queriendo decir que el carácter progresivo del daño tendría que explicarse por otros mecanismos distintos a los que propone la teoría de radicales libres.

Son necesarias ulteriores investigaciones con fraxetina y esculetina, *in vitro* (cultivos celulares, etc.) e *in vivo* (ensayo de diversas dosis, conocer acciones más específicas, conocer la influencia del ejercicio exhaustivo en los niveles de glutatión, etc.) que constituya un soporte importante para su aplicación en procesos degenerativos asociados a la edad. Estos compuestos, por tanto, se presentan prometedores a la Farmacología experimental, y posteriormente, clínica.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1. En el estudio *in vitro* sobre la capacidad de 19 cumarinas (de origen natural y sintético) en la "captación" de EAO, se han seleccionado fraxetina y esculetina como efectivos antioxidantes, para su posterior ensayo *in vivo*.
2. La efectividad de esculetina *en el test de la cuerda* se hace notable a una edad madura, con el comienzo del declinar neuromuscular, sin llegar a la senescencia, como lo indican los valores de la *biomasa transportada*, que aumentan a los 18 meses.
3. En la prueba del *cilindro rotatorio*, no se han encontrado diferencias importantes en los tiempos de permanencia para los distintos grupos de edad y tratamiento. Este test no es lo suficientemente sensible para estimar las modificaciones que se producen en la coordinación motora dependientes de estos tratamientos farmacológicos, y asimismo, del deterioro asociado a la edad.
4. A partir de los efectos observados con los distintos tratamientos en la respuesta de *evitación pasiva*, concluimos que, las dos cumarinas podrían favorecer el aprendizaje de la prueba y, esculetina, además, facilitar su recuerdo.
5. Nuestras experiencias en ratón macho C57BL/6J nos permiten interpretar que el deterioro dependiente de la edad, *per sé*, no hace descender de forma general las enzimas antioxidantes, pero sí incrementa el índice de estrés oxidativo, tanto en hígado como en cerebro, como lo expresa el aumento de la tasa GSSG/GSH.
6. Con la administración de fraxetina y esculetina, la disminución de algunas enzimas antioxidantes endógenas, como la SOD, y el incremento de otras, como la GR, podría explicarse por un mecanismo de supercompensación y reajuste, que se expresa, finalmente, en una capacidad antioxidante global mayor mediante un descenso en la tasa GSSG/GSH.
7. La actividad antioxidante *in vitro* de fraxetina y esculetina, los efectos beneficiosos observados en el comportamiento animal, sobre todo con esculetina, y los descensos importantes en el índice de estrés oxidativo GSSG/GSH, nos permiten calificar a estos compuestos como agentes potenciales en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ABRAHAM, E. C.; TAYLOR, J. F.; CANS, C. A..- Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism. *Biochem. J.*, 174(3):819-825 (1978).
- ACKER, S.; KOYMANS, L.; BAST, A..- Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.*, 15:311-328 (1993).
- AKERBOOM, T.; SIES, H..- Assay of Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology*, Vol. 77, 373-383. Edited by William B. Jakoby. Academic Press. New York (1981).
- ALCARAZ, M. J.; VILLAR, A..- Anti-inflammatory Effects of Natural Phenolic Compounds. En: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. Vol. II, 77-85. Eds: J. Miquel, A. T. Quintanilha and H. Weber. CRC Press. Boca Raton. Florida (1989).
- ALVIRA, R.; VILLALBA, M.; AMIGUET, J.; LISO, P.; BUENO, J..- Radicales libres y especies activadas de oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica. Sistemas defensivos ante los radicales libres. Sistemas antioxidantes enzimáticos (II parte). *An. Med. Intern.*, 5(2):95-99 (1988a).
- ALVIRA, R.; VILLALBA, M.; AMIGUET, J.; LISO, P.; BUENO, J..- Radicales libres y especies activadas de oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica. Sistemas defensivos ante los radicales libres. Sistemas antioxidantes no enzimáticos. (III parte). *An. Med. Intern.*, 5(3):146-151 (1988b).
- AMES, B. N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, P..- Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(11):6858-6862 (1981).
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M..- Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7915-7922 (1993).
- ANAND, K. K. SINGH, B.; CHAND, D.; CHANDAN, B. K..- An Evaluation of *Lawsonia alba* Extract as Hepatoprotective Agent. *Planta Med.*, 58:22-25 (1992).

- ARMESTO, J.; FRUTOS, N.; GONZÁLEZ, R.; PASCUAL, C.- *In vitro* activation of hepatic glutathione reductase from mice by lobenzarit disodium. *Agents Actions*, 39:69-71 (1993).
- BABION, B. M.- The enzymatic basis by human neutrophils. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60:1353-1358 (1982).
- BARJA DE QUIROGA, G.; PEREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M.- Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem. J.*, 272:247-250 (1990).
- BARTUS, R.; DEAN, R.; GOAS, J.; LIPPA, A.- Age-Related Changes in Passive Avoidance Retention: Modulation with Dietary Choline. *Science*, 209:301-303 (1980).
- BASAGA, H. S.- Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.*, 68(7-8):989-998 (1990).
- BENZI, G.; ARRIGONI, E.; DAGANI, F.; MARZATICO, F.; CURTI, D.; MANZINI, A.; VILLA, R. F.- Effect of chronic treatment with some drugs on the enzymatic activities of the rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 28:2703-2708 (1979).
- BODNER, L.; DAYAN, D.; CHIMOVITZ, N.; HAMMEL, I.- Lipid pigment (lipofuscin) accumulation in rat tongue muscle with aging. *Exp. Gerontol.*, 26:89-95 (1991).
- BOLTON, T.; CASLEY-SMITH, J. R.- An *in vitro* demonstration of proteolysis by macrophages and its increase with coumarin. *Experientia*, 31:271-273 (1975).
- BRANEN, A. L.- Toxicology and Biochemistry of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 52:59-63 (1975).
- BRUNETON, J.- *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. 142-148. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (1991).
- BURNET, M.- *Intrinsic Mutagenesis: A Genetic Approach for Aging*. New York, Wiley, 1974. En: Cristofalo, V.J.- Biological mechanisms of aging: an overview. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*, 3-14 (1990).

- CARNEY, J. M.; STARKE-REED, P. E.; OLIVIER, C. N.; LANDUM, R. W.; CHENG, M. S.; WU, J. F.; FLOYD, R. A.- Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound *N-tert-butyl-alfa-phenylnitrone*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3633-3636 (1991).
- CHA, Y.-N.; BUEDING, E.- Effect of 2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole administration on the activities of several hepatic microsomal and cytoplasmic enzymes in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 28:1917-1921 (1979).
- CHA, Y.-N.; HEINE, H. S.- Comparative Effects of Dietary Administration of 2(3)-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisole and 3,5-di-*tert*-Butyl-4-hydroxytoluene on Several Hepatic Enzyme Activities in Mice and Rats. *Cancer Res.*, 42:2609-2615 (1982).
- CHEN, H.; PELLETT, L.; ANDERSEN, H.; TAPPEL, A. L.- Protection by vitamin E, selenium, and β -carotene against oxidative damage in rat liver slices and homogenate. *Free Rad. Biol. Med.*, 14:473-482 (1993).
- CHOLBI, M. R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M. J.- Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia*, 47:195-199 (1991).
- CHUNG, M. H.; KASAI, H.; NISHIMURA, S.; YU, B. P.- Protection of DNA by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.*, 12:523-525 (1992).
- COHEN, A. J.- Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Food Cosmet. Toxicol.*, 17:277-289 (1979).
- COMFORT, A. I.- Position of aging studies. *Mech. Ageing Dev.*, 3(1):1-31 (1974).
- COMFORT, A.I.; YOUHOTSKY-GORE, I.; PATHMANATHAN, K.- Effect of Ethoxyquin on the Longevity of C3H Mice. *Nature*, 229:254-255 (1971).
- COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; HÉNICHART, J. P.; CATTEAU, J. P.; GAYDOU, E.; WALLET, J. C.- Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Rad. Biol. Med.*, 13:211-219 (1992).

-
- COTELLE, N.; MOREAU, S.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; HÉNICHART, J. P..- Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Rad. Biol. Med.*, 11:63-68 (1991).
- CRAVEN, P. A.; PFANSTIEL, J.; DE RUBERTIS, F. R..- Role of Reactive Oxygen in Bile Salt Stimulation of Colonic Epithelial Proliferation. *J. Clin. Invest.*, 77:850-859 (1986).
- CRISTOFALO, V.J..- Biological mechanisms of aging: an overview. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*, 3-14 (1990).
- CUTLER, R. G..- Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants determining longevity of mammalian species. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 3:321-348 (1984).
- DEAN, R. T.; HUNT, J. V.; GRANT, A. J.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E..- Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Rad. Biol. Med.*, 11:161-168 (1991).
- DEAN, R.; SCOZZAFAVA, J.; GOAS, J. A.; REGAN, B.; BEER, B.; BARTUS, R. T..- Age-related differences in Behavior Across the Life Span of The C57BL/6J Mouse. *Exp. Aging Res.*, 7:427-451 (1981).
- DENCKLA, W. D..- Role of the pituitary and thyroid glands in the decline of minimal molecular oxygen consumption with age. *J. Clin. Invest.*, 53:572-581 (1974).
- DIPLOCK, A. T..- Vitamin E, Selenium and Free Radicals. *Med. Biology*, 62:78-80 (1984).
- DORMANDY, T. L..- Biological Rancidification. *Lancet*, II, 684-688 (1969).
- EGAN, D.; O'KENNEDY, R.; MORAN, E.; COX, D.; PROSSER, E.; THORNES, R. D..- The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metabol. Rev.*, 22(5):503-529 (1990).
- ELEFTHERIOU, B. E..- Regional brain catechol-o-methyl transferase: Age related differences in the mouse. *Exp. Aging Res.*, 1(1):99-105 (1975).
- ELÍAS, P. K.; REDGATE, E..- Effects of immobilization stress on open field behavior and plasma corticosterone levels of aging C57BL/6J mice. *Exp. Aging Res.*, 1(1):127-135 (1975).

-
- ESPLUGUES, J.- *Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. Hormonas.* Vol.III, 1-69, 2ª ed. Valencia (1978).
- EVERITT, A. V.; SEEDSMAN, N. J.; JONES, F..- The effects of hypophysectomy and continuous food restriction, begun at ages 70 and 400 days, on collagen aging, proteinuria, incidence of pathology and longevity in the male rat. *Mech. Ageing Dev.*, 12(2):161-172 (1980).
- FEIERMAN, D.; CEDERBAUM, A..- The effect of EDTA and iron on the oxidation of hydroxyl radical scavenging agents and ethanol by rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 116(2):765-770 (1983).
- FENTEM, J. H.; FRY, J. R..- Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104 C(1):1-8 (1993).
- FENTEM, J. H.; FRY, J. R.; WHITING, D. A..- O-hydroxyphenylacetaldehyde: a major novel metabolite of coumarin formed by rat, gerbil and human liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, 179(1):197-203 (1991).
- FLEMING, J. E.; MIQUEL, J.; COTTRELL, S. F.; YENGOYAN, L. S.; ECONOMOS, A. C..- Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitochondrial genome?. *Gerontology*, 28:44-53 (1982).
- FLETCHER, B. L.; DILLARD, C. J.; TAPPEL, A. L..- Measurement of Fluorescent Lipid Peroxidation Products in Biological Systems and Tissues. *Anal. Biochem.*, 52:1-9 (1973).
- GALLAGHER, C. H..- Protection by antioxidants against lethal doses of carbon tetrachloride. *Nature*, 192:881-882 (1961).
- GERSCHMAN, R.; GILBERT, D. L.; CACCAMISE, D..- Effect of Various Substances On Survival Times of Mice Exposed to Different High Oxygen Tensions. *Amer. J. Physiol.*, 192:563-571 (1958).
- GERSCHMAN, R.; GILBERT, D. L.; NYE, S. W.; FENN, W. O..- Role of anti-oxidants and of glutathione in oxygen poisoning. *Fed. Proc.*, 14:56 (1955).

-
- GOEGER, D. E.; ANDERSON, K. E.- Biochemical characterization of coumarin 7-hydroxylase activity in chick embryo liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 43(2):363-369 (1992).
- GRIFFITH, O. W.- Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106:207-212 (1980).
- GUTTERIDGE, J. M. C.; WESTERMARCK, T.; HALLIWELL, B.- Oxygen radical damage in biological systems. *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*, 99. Johnson, J. E., Jr., Walford, R., Harman, D., and Miquel, J., Eds.: Alan R. Liss, New York (1986).
- HALLIWELL, B.- Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action?. *Free Rad. Biol. Med.*, 7:645-651 (1989).
- HALLIWELL, B.- How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comms.*, 9(1):1-32 (1990).
- HALLIWELL, B.- Drug Antioxidant Effects. A Basis for Drug Selection?. *Drugs*, 42(4):569-605 (1991).
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.- Protection against oxidants in biological systems. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edition, Clarendon, Oxford, V. K. (1989).
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J; MABRY, H.- *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London (1980).
- HARMAN, D.- Aging: A theory based on free radical radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11:298-300 (1956).
- HARMAN, D.- Prolongation of the normal life-span and inhibition of spontaneous cancer by antioxidants. *J. Gerontol.*, 16:247-254 (1961).
- HARMAN, D.- Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF₁ mice. *J. Gerontol.*, 23(4):476-482 (1968).

-
- HARMAN, D.- Chemical protection against aging. *Agents Actions*, 1(1):3-8 (1969).
 - HARMAN, D.- Free radical theory of aging: nutritional implications. *Age*, 1:145-150 (1978).
 - HARMAN, D.- The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7124-7128 (1981).
 - HARMAN, D.- Free Radical Involvement in Aging. Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Drugs Aging*, 3(1):60-80 (1993).
 - HARRISON, D. E.- Experience with developing assays of physiological age. In: *Biological Markers of Aging*. Proceedings of Conference on Nonlethal Biological Markers of Physiological Aging 1981, 2-12. Eds: M. E. Reff and E. L. Schneider (1982).
 - HARRISON, D. E.; ARCHER, J. R.; SACHER, G. A.; BOYCE, F. M.- Tail collagen aging in mice of thirteen different genotypes and two species: relationship to biological age. *Exp. Gerontol.*, 13(1/2):63-73 (1978).
 - HASSERT, G. L., JR.; POUTSIAKA, J. W.; PAPANDRIANOS, D.; BURKE, J. C.; CRAVER, B. N.- Pharmacologic and Toxicologic Studies with 2-Amino-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole Hydrochloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3:726-741 (1961).
 - HAYFLICK, L.- Aging, longevity, and immortality in vitro. *Exp. Gerontol.*, 27:363-368 (1992).
 - HILDEBRANDT, A.G.; SPECK, M.; ROOTS, I.- Possible control of hydrogen peroxide production and degradation in microsomes during mixed function oxidation reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54:968-975 (1973).
 - HILDEBRANDT, A. G.; ROOTS, I.- Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH)-Dependent Formation and Breakdown of Hydrogen Peroxide during Mixed Function Oxidation Reactions in Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 171:385-397 (1975).
 - HILL, E. G.- Dietary Antioxidants in Young Swine. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 40:360-364 (1963).

- HOCHSCHILD, R..- Effect of dimethylaminoethyl p-chlorophenoxyacetate on the life span of male Swiss Webster albino mice. *Exp. Gerontol.*, 8(4):177-183 (1973).
- HONG, Y.-L.; PAN, H.-Z.; SCOTT, M. D.; MESHNICK, S. R..- Activated oxygen generation by a primaquine metabolite: inhibition by antioxidants derived from Chinese herbal remedies. *Free Rad. Biol. Med.*, 12:213-218 (1992).
- HUGUET, A. I.; MAÑEZ, S.; ALCARAZ, M. J..- Superoxide Scavenging Properties of Flavonoids in a Non-Enzymic System. *Z. Naturforsch.*, 45c:19-24 (1990).
- IVY, G.; KANAI, S.; OHTA, M.; SATO, Y.; OTSUBO, K.; KITANI, K..- Leupeptin causes an accumulation of lipofuscin-like substances in liver cells of young rats. *Mech. Ageing Dev.*, 57:213-231 (1991).
- JI, L. L..- Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 25(2):225-231 (1993).
- JOYEUX, M.; ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; MORTIER, F.; DORFMAN, P..- Tert-butyl Hydroperoxide-Induced Injury in Isolated Rat Hepatocytes: A Model for studying Anti-Hepatotoxic Crude Drugs. *Planta Med.*, 56(2):171 (1990).
- JUICHI, M.; TAKEMURA, Y.; AZUMA, M.; TANAKA, K.; OKANO, M.; FUKAMIYA, N.; ITO, C.; FURUKAWA, H..- New Coumarins from *Citrus-Hassaku*. 10. Of Constituents of Domestic *Citrus* Plants. *Chem. Pharm. Bull.*, 39(9):2252 (1991).
- KANEKO, T.; KAJI, K.; MATSUO, M..- Protection of linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity by phenolic antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, 16(3):405-409 (1994).
- KHANNA, S. C.; GARG, S. K.; SHARMA, S. P..- Antioxidant-Influenced Alterations in Glutathione Reductase Activity in Different Age Groups of Male Mice. *Gerontology*, 38:9-12 (1992).
- KIMURA, Y.; OKUDA, H.; ARICHI, S.; BABA, K.; KOZAWA, M..- Inhibition of the formation of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid from arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes by various coumarins. *Biochim. Biophys. Acta*, 834:224-229 (1985).

-
- KIRKWOOD, T.- Biological origins of ageing. En: *Oxford Textbook of Geriatric Medicine*, 35-40. Eds: Evans and Williams (1992).
- KLEIN, S.M.; COHEN, G.; CEDERBAUM, A.I.- Production of Formaldehyde during Metabolism of Dimethyl Sulfoxide by Hydroxyl Radical Generating Systems. *Biochemistry*, 20:6006-6012 (1981).
- KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I.- Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem. Int.*, 19(5):1117-1124 (1989).
- KRINSKY, N. I.- Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. Med.*, 7:617-635 (1989). En: - CHEN, H.; PELLETT, L.; ANDERSEN, H.; TAPPEL, A. L.- Protection by vitamin E, selenium, and β -carotene against oxidative damage in rat liver slices and homogenate. *Free Rad. Biol. Med.*, 14:473-482 (1993).
- KRUK, P.; ENESCO, H.- α -Tocopherol reduces fluorescent age pigment levels in heart and brain of young mice. *Experientia*, 37:1301-1302 (1981).
- KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N.- Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B(3):447-487 (1993).
- LARSON, R. A.- The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4):969-978 (1988).
- LAUGHTON, M. J.; HALLIWELL, B.; EVANS, P. J.; HOULT, J. R. S.- Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.*, 38(17):2859-2865 (1989).
- LAWRENCE, R.; BURK, R.- Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 7(4):952-958 (1976).
- LEBLANC, G. A.; GILLETTE, J. S.- Elevation of serum cholesterol levels in mice by the antioxidant butylated hydroxyanisole. *Biochem. Pharmacol.*, 45(2):513-515 (1993).
- LEHNINGER, A. L.- *Principios de Bioquímica*. 221-225, 268-273. Ed. Omega S.A. Barcelona (1984).

- LEHNINGER, A. L.; BECK, D. P.- The catalase requirement in the reversal of mitochondrial swelling caused by reduced glutathione and by trace metals. *J. Biol. Chem.*, 242(9):2098-2101 (1967).
- LIPPMAN, R. D.- Free radical-induced lipoperoxidation and aging. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol. I, 3-13. Eds.: J. Miquel, A. T. Quintanilha and H. Weber. CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).
- LÓPEZ-TORRES, M.; PÉREZ-CAMPO, R.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; BARJA, G.- A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B(3/4):757-763 (1993a).
- LÓPEZ-TORRES, M.; PÉREZ-CAMPO, R.; ROJAS, C.; CADENAS, S.; BARJA, G.- Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. *Free Rad. Biol. Med.*, 15:133-142 (1993b).
- MA, T. C.; YU, Q. H.- Effect of 20(S)-Ginsenoside-Rg₂ and Cyproheptadine on Two-way Active Avoidance Learning and Memory in Rats. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 43(II), 10:1049-1052 (1993).
- MACHLIN, L. J.- The Biological Consequences of Feeding Polyunsaturated Fatty Acids to Antioxidant-Deficient Animals. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 40:368-371 (1963).
- MACHLIN, L. J.; BENDICH, A.- Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1:441-445 (1987).
- MACHLIN, L. J.; GORDON, R. S.- Linoleic Acid as Causative Agent of Encephalomalacia in Chickens Fed Oxidized Fats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103:659-663 (1960).
- MARCO, G. J.; MACHLIN, L. J.; EMERY, E.; GORDON, R. S.- Dietary Effects of Fats upon Fatty Acid Composition of the Mitochondria. *Arch. Biochim. Biophys.*, 94:115-120 (1961).
- MARKLUND, S. L.- Clinical Aspects of Superoxide Dismutase. *Medical Biology*, 62:130-134 (1984).

-
- MARKLUND, S. L.- Pyrogallol autoxidation. En: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, 243-247 (1985).
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G.- Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47:469-474 (1974).
- MARTIN, G. M.- Biological mechanisms of ageing. En: *Oxford Textbook of Geriatric Medicine*, 41-48. Eds: Evans and Williams (1992).
- MATSUO, M.; GOMI, F.; DOOLEY, M.- Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech. Ageing Dev.*, 64:273-292 (1992).
- McCLURE, J. W.- Physiology and Functions of Flavonoids. *The Flavonoids*, 1011-1012. Edited by J. B. Harbone, T. J. Mabry and H. Mabry. Chapman and Hall. London (1975).
- McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I.- An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244(22):6049-6055 (1969).
- MEDAWAR, P. B.- *An Unsolved Problem of Biology*. London, HK Lewis, 1952. En: Cristofalo, V.J.- Biological mechanisms of aging: an overview. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*, 3-14 (1990).
- MELÉNDEZ, J. A.; BAGLIONI, C.- Differential induction and decay of manganese superoxide dismutase mRNAs. *Free Rad. Biol. Med.*, 14:601-608 (1993).
- MEYDANI, M.- Protective role of dietary vitamin E on oxidative stress in aging. *Age*, 15:89-93 (1992).
- MIQUEL, J.- Historical Introduction to Free Radical and Antioxidant Biomedical Research. En: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol.I, 3-13. Eds.: J. Miquel, A. T. Quintanilha and H. Weber. CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).
- MIQUEL, J.; BLASCO, M.- A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp. Gerontol.*, 13:389-396 (1978a).

- MIQUEL, J.; ECONOMOS, A. C..- Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp. Gerontol.*, 14(5):279-285 (1979a).
- MIQUEL, J.; ECONOMOS, A. C.; FLEMING, J.; JOHNSON, J. E., JR..- Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.*, 15:575-591 (1980).
- MIQUEL, J.; FLEMING, J. E..- A two-step hypothesis on the mechanisms of *in vitro* cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis. *Exp. Gerontol.*, 19(1):31-36 (1984).
- MIQUEL, J.; JOHNSON, J. E., Jr..- Senescent changes in the ribosomes of animal cells *in vivo* and *in vitro*. *Mech. Ageing Dev.*, 9(3-4):247-266 (1979b).
- MIQUEL, J.; LUNDGREN, P. R.; JOHNSON, J. E., JR..- Spectrofluorometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. *J. Gerontol.*, 33(1):5-19 (1978b).
- MIQUEL, J.; TAPPEL, A.; DILLARD, C.; HERMAN, M.; BENSCH, K..- Fluorescent products and lysosomal components in aging *Drosophila melanogaster*. *J. Gerontol.*, 29(6):622-637 (1974).
- MINOT, C. S..- *The problem of age, growth and death*. Popular Science Monthly, 71, 496 (1907). En: Miquel, J..- Teorías sobre el envejecimiento e investigaciones gerontológicas recientes. *Geriatría* (I):3615-3620 (1980).
- MONTESINOS, C.; UBEDA, A.; FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J..- Superoxide Scavenging Properties of Phenolic Acids. *Planta Med.*, 57(8):A54 (1991).
- MORA, A.; PAYÁ, M.; RÍOS, J. L.; ALCARAZ, M. J..- Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 40(4):793-797 (1990).
- MOREL, I.; CILLARD, J.; LESCOAT, G.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; OCAKTAN, A.; ABDALLAH, M.; BRISSOT, P.; CILLARD, P..- Antioxidant and free radical scavenging activities of the iron chelators pyoverdine and hydroxypyrid-4-ones in iron-loaded hepatocyte cultures: comparison of their mechanism of protection with that of

desferrioxamine. *Free Rad. Biol. Med.*, 13:449-508 (1992).

- MOREL, I.; LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; BRISSOT P.; CILLARD, P.; CILLARD, J.- Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.*, 45(1):13-19 (1993).

- MURRAY, R. D. H.; MENDEZ, J.; BROWN, R. A.- *The Natural Coumarins*. John Wiley and Sons. Chichester (1982).

- NAMBA, T.; MORITA, O.; HUANG, S.-L.; GOSHIMA, K.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.- Studies on Cardio-Active Crude Drugs; I. Effect of Coumarins on Cultured Myocardial Cells. *Planta Med.*, 54(4):277-282 (1988).

- NASH, T.- The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of Hantzsch Reaction. *Biochem. J.*, 55:416-421 (1953).

- NISHIZAWA, K.; SAITO, H.; NISHIYAMA, N.- Effects of Kamikihito, a Traditional Chinese Medicine, on Learning and Memory Performance in Mice. *Phytotherapy Res.*, 5:97-102 (1991).

- NISTICÒ, G.; CIRIOLO, M. R.; FISKIN, K.; IANNONE, M.; DE MARTINO, A.; ROTILIO, G.- NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. *Free Rad. Biol. Med.*, 12:177-181 (1992).

- NIWA, M.; SUGINO, H.; TAKASHIMA, S.; SAKAI, T.; WU, Y. C.; WU, T. S.; KUOH, C. S.- A New Coumarin Glucoside from *Daphne-Arisanensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 39(9):2422 (1991).

- OBERLEY, L. W.; OBERLEY, T. D.- Free radicals, cancer and aging. En: *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*, 325. Johnson, J. E., Jr., Walford, R., Harman, D., and Miquel, J., Eds.: Alan R. Liss, New York (1986).

- OKUYAMA, T.; TAKATA, M.; NISHINO, H.; NISHINO, A.; TAKAYASU, J.; IWASHIMA, A.- Studies on the Antitumor-Promoting Activity of Naturally Occurring Substances. II. Inhibition of Tumor-Promoter-Enhanced Phospholipid Metabolism by

Umbelliferous Materials. *Chem. Pharm. Bull.*, 38(4):1084-1086 (1990).

- OLDFIELD, J. E.; SINNHUBER, R. O.; RASHEED, A. A.- Nutritive Value of Marine Oils. II. Effects of *in Vivo* Antioxidants in Feeding Menhaden Oil to Swine. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 40:357-360 (1963).

- ORGEL, L. E.; The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 49:517-521 (1963).

- OZAKI, Y.; OHASHI, T.; NIWA, Y.- A comparative study on the effects of inhibitors of the lipoxygenase and leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 753:130-132 (1986).

- PACKER, L.- Vitamin E, physical exercise and tissue damage in animals. *Med. Biol.*, 62:105-109 (1984).

- PAGLIA, D.; VALENTINE, W.- Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70:158-169 (1967).

- PAYÁ, M.; FERRÁNDIZ, F.; MIRALLES, C.; MONTESINOS, C.; UBEDA, A.; ALCARAZ, M. J.- Effects of Coumarin Derivatives on Superoxide Anion Generation. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 43(1), 6:655-658 (1993a).

- PAYÁ, M.; FERRANDIZ, M. L.; SANZ, M. J.; ALCARAZ, M. J.- Effects of phenolic compounds on bromobenzene-mediated hepatotoxicity in mice. *Xenobiotica*, 23(3):327-333 (1993b).

- PAYÁ, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J.R.S.- Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.*, 44(2):205-214 (1992a).

- PAYÁ, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J.R.S.- Peroxyl radical scavenging by a series of coumarins. *Free Rad. Res. Comms.*, 17:293-298 (1992b).

- PAYÁ, M.; HOULT, J.R.S.- Superoxide scavenging ability in human polymorphonuclear leukocytes by a series of coumarins. *J. Pharm. Pharmacol.*, (1994a) (En prensa).

- PAYÁ, M.; LOBO, I. B.; HOULT, J. R. S.- Inhibitory activity of a series of coumarins on leukocyte eicosanoid generation and on two secretory phospholipases A₂. *Agents Actions*, (1994b) (En prensa).
- PEARL, R.- *The Rate of Living*. Londres, University of London Press, 1928. En: Miquel, J.- Teorías sobre el envejecimiento e investigaciones gerontológicas recientes. *Geriatría* (I):3615-3620 (1980).
- PÉREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M.; ROJAS, C.; CADENAS, S.; BARJA, G.- A comparative study of free radicals in vertebrates-I. Antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B(3/4):749-755 (1993).
- PETKOV, V. D.; MOSHARROF, A. H.- Age- and Individual-related Specificities in the Effects of Standardized Ginseng Extract on Learning and Memory (Experiments on Rats). *Phytotherapy Res.*, 1(2):80-84 (1987).
- PILLER, N. B.- An integration of the modes of action of coumarin. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 27:1135-1138 (1977).
- PORCELLATI, S.; COSTANTINI, V.; PROSDOCIMI, M.; STASI, M.; PISTOLESI, R.; NENCI, G. G.; GORACCI, G.- The coumarin derivative AD₆ inhibits the release of arachidonic acid by interfering with phospholipase A₂ activity in human platelets stimulated with thrombin. *Agents and Actions*, 29(3/4):364-373 (1990).
- RAHIMTULA, A. D.; JERNSTRÖM, B.; DOCK, L.; MOLDEUS, P.- Effects of dietary and *in vitro* 2(3)-t-butyl-4-hydroxy-anisole and other phenols on hepatic enzyme activities in mice. *Br. J. Cancer*, 45:935-942 (1982).
- RANKIN, S. M.; DE WHALLEY, C. V.; HOULT, J.R.S.; JESSUP, W.; WILKINS, G. M.; COLLARD, J.; LEAKE, D. S.- The modification of low density lipoprotein by the flavonoids myricetin and gossypetin. *Biochem. Pharmacol.*, 45(1):67-75 (1993).
- REKKA, E.; KOUROUNAKIS, L.; KOUROUNAKIS, P.- Antioxidant Activity of an Interleukin Production Affected by Honey Bee Venom. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* 40(II), 8:912-913 (1990).

-
- RICE-EVANS, C; DIPLOCK, A..- Current status of antioxidant therapy. *Free Rad. Biol. Med.*, 15:77-96 (1993).
- RICHIE, J. P., JR..- The role of glutathione in aging and cancer. *Exp. Gerontol.*, 27:615-626 (1992).
- RÍOS, J. L.; MAÑEZ, S.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M. J..- Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis Javalambrensis*. *Phytochemistry*, 31(6):1947-1950 (1992).
- RITSCHER, W. A.; VACHHARAJANI, N. N..- Disposition Characteristics of Coumarin as a Function of Age in the Beagle Dog Model. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 43(II), 9:963-965 (1993).
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J..- Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37(5):837-841 (1988).
- ROßKOPF, F.; KRAUS, J.; FRANZ, G..- Immunological and Antitumor Activities of Non-Anticoagulant Coumarin. *Planta Med.*, 56:671 (1990).
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A.; RUIZ-TORRES, A..- Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech. Ageing Dev.*, 66:213-222 (1992).
- ROSE, M. R..- A test of evolutionary theories of senescence. *Nature*, 287:141-142 (1980).
- ROSS, M. H..- Aging, Nutrition and Hepatic Enzyme Activity Patterns in the rat. *J. Nutr.*, 97:565-601 (1969).
- SACHER, G. A..- Molecular versus systemic theories on the genesis of aging. *Exp. Gerontol.*, 3:265-276 (1968).
- SANTAVUORI, P.; WESTERMARCK, T..- Antioxidant Therapy in Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis. *Med. Biology*, 62:152-153 (1984).
- SASAME, H.; BOYD, M..- Superoxide and Hydrogen Peroxide production and NADPH oxidation Stimulated by Nitrofurantoin in lung microsomes: Possible implications for toxicity. *Life Sci.*, 24:1091-1096 (1979).

-
- SASTRE, J.; ASENSI, M.; GASCÓ, E.; PALLARDÓ, F.; FERRERO, J.; FURUKAWA, T.; VIÑA, J..- Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am. J. Physiol.*, 236:R992-R995 (1992).
- SGARAGLI, G. P.; VALOTI, M.; GORELLI, B.; FUSI, F.; PALMI, M.; MANTOVANI, P..- Calcium antagonist and antiperoxidant properties of some hindered phenols. *Br. J. Pharmacol.*, 110:369-377 (1993).
- SHARMA, R.; AHMAD, H.; SINGHAL, S.; SAXENA, M.; SRIVASTAVA, S.; AWASTHI, J..- Comparative studies on the effect of butylated hydroxyanisole on glutathione and glutathione S-transferases in the tissues of male and female CD-1 mice. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105C(1):31-37 (1993).
- SICHEL, G.; CORSARO, C.; SCALIA, M.; DI BILIO, A. J.; BONOMO, R. P..- In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O_2 . *Free Rad. Biol. Med.*, 11:1-8 (1991).
- SLATER, T. F..- Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.*, 222:1-15 (1984).
- SLATER, T.F.; EAKINS, M.N..- Interactions of (+)-Cyanidanol-3 with Free Radical Generating Systems. *New Trends in the Therapy of Liver Diseases*. Karger, Basel (1975).
- SMITH, L. Spectrophotometric Assay of Cytochrome c Oxidase. In: Glick, D. M., ed. *Methods of biochemical analysis*. Vol. II, 427-434. New York: Wiley-Interscience (1955).
- SOHAL, R. S..- Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. *Mech. Ageing Dev.*, 60:189-198 (1991a).
- SOHAL, R..- Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.*, 14:583-588 (1993a).
- SOHAL, R. S.; ARNOLD, L.; ORR, W. C..- Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.*, 56:223-235 (1990).

-
- SOHAL, R. S.; KU, H.-H.; AGARWAL, S.- Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 196(1):7-11 (1993b).
 - SOHAL, R. S.; SOHAL, B. H.- Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech. Ageing Dev.*, 57:187-202 (1991b).
 - SOLANA, R.; VILLANUEVA, J. L.; PEÑA, J.; DE LA FUENTE, M.- Cell mediated immunity in ageing. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99A(1/2):1-4 (1991).
 - SORIANI, M.; MAZZUCA, S; QUARESIMA, V; MINETTI, M.- Oxidation of desferrioxamine to nitroxide free radical by activated human neutrophils. *Free Rad. Biol. Med.*, 14:589-599 (1993).
 - SOUTHORN, P.; POWIS, G.- Free Radicals in Medicine.I. Involvement in Human Disease. *Mayo Clin. Proc.*, 63:381-389 (1988a).
 - SOUTHORN, P.; POWIS, G.- Free Radicals in Medicine.II. Involvement in Human Disease. *Mayo Clin. Proc.*, 63:390-408 (1988b).
 - TALLARIDA, R. J.; MURRAY, R. B.- *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*. 2nd ed. New York (1987).
 - TAPPEL, A. L.; ZALKIN, H.- Inhibition of Lipide Peroxidation in Mitochondria by Vitamin E. *Arch. Biochim. Biophys.*, 80:333-336 (1959).
 - TAPPEL, A. L.; FLETCHER, B.; DEAMER, D.- Effects of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *J. Gerontol.*, 28(4):415-424 (1973).
 - TAYLOR, D. W.- Effects of tocopherols, methylene blue and glutathione on the manifestations of oxygen poisoning in vitamin E-deficient rats. *J. Physiol.*, 140:37-47 (1958).
 - THOMAS, C. E.; AUST, S. D.- Role of metals in oxygen radical reactions and oxidative stress. En: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol.I, 41-45. Eds.: J. Miquel, A. T. Quintanilha and H. Weber. CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).

- TOLMASOFF, J. M.; ONO, T.; CUTLER, R. G..- Superoxide dismutase: Correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(5):2777-2781 (1980).
- UCHIYAMA, M.; MIHARA, M..- Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. *Anal. Biochem.*, 86:271-278 (1978).
- VERTECHY, M.; COOPER, M.; GHIRARDI, O.; RAMACCI, M. T..- The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain. *Exp. Gerontol.*, 28:77-85 (1993).
- VILLAR, A.; GASCÓ, M. A.; ALCARAZ, M. J..- Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *J. Pharm. Pharmacol.*, 36(12):820-823 (1984).
- VILLAR, A.; GASCÓ, M. A.; ALCARAZ, M. J..- Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39(7):502-507 (1987).
- VIÑA, J. R.; SAEZ, G. T.; VIÑA, J.- The physiological functions of glutathione. En: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol.II, 121-132. Eds.: J. Miquel, A. T. Quintanilha and H. Weber. CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).
- VLADIMIROV, Yu. A.; OLENOV, V. I.; SUSLOVA, T. B.; CHEREMISINA, Z. P..- Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. *Adv. Lipid Res.*, 17:173-249 (1980).
- VLADIMIROV, Yu.; PARFENOV, E.; EPANCHINTSEVA, O.; SMIRNOV, L. D..- Antiradical Activity of Coumarin Reductones. *Byull. Eksperimen. Biol. Med.*, 112(11):475-478 (1991).
- VOGT, B. L.; RICHIE, J. P., JR..- Fasting-induced depletion of glutathione in the aging mouse. *Biochem. Pharmacol.*, 46(2):257-263 (1993).
- VUORELA, H.; VUORELA, P.; TÖRNQUIST, K.; HADACEK, F.; HILTUNEN, R..- Quantitative Structure/Activity Relationship (QSAR) for some Coumarins and their Calcium-Antagonistic Activity. *Planta Med.*, 58:A663 (1992).

-
- WAGNER, H.; GEYER, B.; FIEBIG, M.; KISO, Y.; HIKINO, H..- Isobutrin and Butrin, the Antihepatotoxic Principles of *Butea monosperma* Flowers. *Planta Med.*, 2:77-79 (1986a).
- WAGNER, H.; GEYER, B.; KISO, Y.; HIKINO, H.; RAO, G..- Coumestans as the Main Active Principles of the Liver Drugs *Eclipta Alba* and *Wedelia calendulaceae*. *Planta Med.*, 5:370 (1986b).
- WALFORD, R..- *The Immunologic Theory of Aging*. Copenhagen, Munksgaard, 1969. En: Cristofalo, V.J..- Biological mechanisms of aging: an overview. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*, 3-14 (1990).
- WARTHIN, A. S..- *Old Age, The Major Revolution: The Philosophy and Pathology of the Aging Process*. New York, Hoeber, 1929. En: Cristofalo, V. J..- Biological mechanisms of aging: an overview. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*, 3-14 (1990).
- WAX, T. M.; GOODRICK, C. L..- Voluntary exposure to light by young and aged albino and pigmented inbred mice as a function of light intensity. *Dev. Psychobiol.*, 8(4):297-303 (1975).
- WEISSMANN, A..- *Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems*. Oxford University (Clarendon), Londres (1981).
- WILLIAMS, G. C..- Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution*, 11:398-411 (1957). En: Kirkwood, T. B. L..- Biological origins of ageing. *Oxford Textbook of Geriatric Medicine*, 35-48. Eds: Evans and Williams (1992).
- WUDL, L. R.; TAYLOR, B. A.; WOOD, A. W..- Metabolism of coumarin in C57BL/6J (B6) and B6.L-Coh^h (congenic) mice. *Fed. Proc.*, 39:523 (1980).
- YAMAHARA, J.; KOBAYASHI, G.; MATSUDA, H.; IWAMOTO, M.; FUJIMURA, H..- Vascular Dilatory Action of the Chinese Crude Drug. II. Effects of Scoparone on Calcium Mobilization. *Chem. Pharm. Bull.*, 37(2):485-489 (1989a).
- YAMAHARA, J.; KOBAYASHI, G.; MATSUDA, H.; KATAYAMA, T.; FUJIMURA, H..- The Effect of Scoparone, a Coumarin Derivative Isolated from the Chinese Crude Drug *Artemisiae Capillaris Flos*, on the Heart. *Chem. Pharm. Bull.*, 37(5):1297-1299 (1989b).

-
- YANG, X.-W.; GU, Z.-M.; WANG, B.-X.; HATTORI, M.; NAMBA, T.- Comparison of Anti-Lipid Peroxidative Effects of the Underground of *Notopterygium incisum* and *N. forbesii* in Mice. *Planta Med.*, 57(5):399 (1991).
- YU, B. P.- Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol. Rev.*, 74(1):139-162 (1994).
- ZERBA, E.; KOMOROWSKI, T. E.; FAULKNER, J. A.- Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. *Am. J. Physiol.*, 258:C429-C435 (1990).
- Zs.-NAGY, I.- Centrophenoquine as OH· free radical scavenger. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol.II, 87-94. Eds.: J. Miquel, A. T. Quintanilha and H. Weber. CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).