

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA



**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA Y LA
SUPLEMENTACIÓN CON COENZIMA Q₁₀ SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO CEREBRAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

**Beatriz Mataix Albert
Granada, 2005**

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA Y LA
SUPLEMENTACIÓN CON COENZIMA Q₁₀ SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO CEREBRAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

Memoria que presenta la Licenciada Dña. **Beatriz Mataix Albert** para aspirar al grado de Doctora en Medicina

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

Pof. Dr. D. José
Mataix Verdú

Prof. Dra. Dña.
Magdalena López Frías

Dr. D. Julio José
Ochoa Herrera

Lda. Dña. **Beatriz Mataix Albert**,
aspirante al grado de Doctora en Medicina
Granada, 2005

D. José Mataix Verdú, Catedrático de Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Dña. Magdalena López Frías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

D. Julio José Ochoa Herrera, Investigador del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

CERTIFICAN: Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA Y LA SUPLEMENTACIÓN CON COENZIMA Q₁₀ SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO CEREBRAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO”**, han sido realizadas bajo nuestra dirección por Dña. Beatriz Mataix Albert, en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Granada, y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctora por el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, con fecha trece de Enero de dos mil cinco.

Pof. Dr. D. José
Mataix Verdú

Prof. Dra. Dña.
Magdalena López Frías

Dr. D. Julio José
Ochoa Herrera

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA Y LA
SUPLEMENTACIÓN CON COENZIMA Q₁₀ SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO CEREBRAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

INDICE

CAPÍTULO I .- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.- ENVEJECIMIENTO

1.1.- Concepto

1.2.- Envejecimiento, periodo vital y genes

1.2.1.- Diferencia entre envejecimiento y periodo vital

1.2.2.- Expresión génica y envejecimiento

2.- RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS

2.1.- Concepto de radicales libres y especies reactivas

2.1.1.- Radical libre

2.1.2.- Especie reactiva

2.2.- Tipos de radicales y especies reactivas de oxígeno

2.3.- Radicales libres y especies reactivas de otros átomos y moléculas

2.4.- Fuentes de producción de radicales libres y especies reactivas

2.5.- Objetivos biológicos de los radicales libres y especies reactivas

2.5.1.- Biomoléculas orgánicas de bajo peso molecular

2.5.2.- Proteínas

2.5.3.- Ácidos nucleicos

2.5.4.- Ácidos grasos insaturados

3.- FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ENVEJECIMIENTO

3.1.- La pérdida de capacidad energética como causa del envejecimiento

3.2.- Mitocondria: estructura y función

3.2.1.- Visión general de la obtención de energía celular

3.2.2.- Estructura mitocondrial

3.2.3.- La cadena de transporte mitocondrial y la fosforilación oxidativa

3.3.- Teoría mitocondrial del envejecimiento

3.3.1.- Base conceptual

3.3.2.- La mitocondria como fuente de estrés oxidativo

3.3.3.- La mitocondria como blanco del estrés oxidativo

3.3.4.- Evidencias experimentales de la implicación de la mitocondria en el envejecimiento

4.- SISTEMAS ANTIOXIDANTES DEL ORGANISMO

4.1.- Tipos genéricos de defensas antioxidantes

4.2.- Sistemas antioxidantes destacables

4.2.1.- Enzimas

4.2.1.1.- *Superoxido dismutasa*

4.2.1.2.- *Catalasa*

4.2.1.3.- *Glutation peroxidasa*

4.2.1.4.- *Glutation reductasa*

4.2.2.- Componentes no enzimáticos

4.2.2.1.- *Vitamina E*

4.2.2.2.- *Coenzima Q*

- 4.2.2.3.- *Carotenoides*
- 4.2.2.4.- *Vitamina C*
- 4.2.2.5.- *Compuestos fenólicos*
- 4.2.2.6.- *Ácido úrico*
- 4.2.2.7.- *Otros antioxidantes*

4.2.3.- Mecanismos de reparación

4.2.4.- Mecanismos de adaptación

4.3.- El equilibrio oxidación-antioxidación en el proceso de envejecimiento

5.- NUTRICIÓN Y ENVEJECIMIENTO

5.1.- Restricción calórica, suplementación con antioxidantes y retraso en el proceso de envejecimiento

5.2.- Grasa dietética y estrés oxidativo mitocondrial. Un abordaje novedoso de la nutrición en el envejecimiento

CAPÍTULO III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

2.- APARATOS DE USO GENERAL

3.- ANIMALES

4.- DIETAS

5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

6.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE LOS ÓRGANOS

7.- DETERMINACIONES EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO

7.1.- Determinación cuantitativa de proteínas (para mitocondrias y citosol)

7.2.- Determinación de la concentración de hidroperóxidos

7.3.- Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

7.4.- Perfil lipídico en membranas mitocondriales

7.5.- Determinación de colesterol en membranas mitocondriales

7.6.- Determinación de fosfolípidos en membranas mitocondriales

7.7.- Determinación de fluidez de membrana mitocondrial mediante polarización de fluorescencia

7.8.- Extracción y determinación de coenzima Q₉, coenzima Q₁₀ y tocoferol por HPLC en mitocondrias de cerebro

8.- DETERMINACIONES EN CITOSOL DE CEREBRO

8.1.- Determinación de la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa

8.2.- Determinación de la actividad de la catalasa

8.3.- Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

9.- EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO REALIZADO

CAPÍTULO IV.- RESULTADOS

- 1.- PESO DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS**
- 2.- PESO DE LOS CEREBROS**
- 3.- NIVELES DE HIDROPERÓXIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO**
 - 3.1.- Niveles de hidroperóxidos basales (T0)**
 - 3.2.- Niveles de hidroperóxidos inducidos (T1)**
- 4.- CONTENIDO EN α -TOCOFEROL EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO**
- 5.- CONTENIDO EN COENZIMA Q EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO**
 - 5.1.- Contenido en coenzima Q₉**
 - 5.2.- Contenido en coenzima Q₁₀**
 - 5.3.- Contenido en coenzima Q (Q₉ + Q₁₀)**
- 6.- ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA EN CITOSOL**
- 7.- ACTIVIDAD DE LA CATALASA EN CITOSOL**
- 8.- ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA EN CITOSOL**
- 9.- NIVELES DE COLESTEROL Y FOSFOLÍPIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO**
 - 9.1.- Niveles de colesterol**
 - 9.2.- Niveles de fosfolípidos**
 - 9.3.- Relación colesterol/fosfolípidos**
- 10.- PRODUCCIÓN DE DICLOROFLUORESCEINA DIACETATO EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO**
- 11.- POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO**
- 12.- PERFIL LIPÍDICO EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO**
 - 12.1.- Ácidos grasos saturados**
 - 12.1.1.- Ácido Mirístico (C14:0)
 - 12.1.2.- Ácido palmítico (C16:0)
 - 12.1.3.- Ácido esteárico (C18:0)
 - 12.2.- Ácidos grasos monoinsaturados**
 - 12.2.1.- Ácido palmitoleico (C16:1 n-9)

12.2.2.- Ácido oleico (C18:1 n-9)

12.2.3.- Ácido nervónico (C24:1 n-9)

12.3.- Ácidos grasos poliinsaturados

12.4.- Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6

12.4.1.- Ácido linoleico (C18:2 n-6)

12.4.2.- Ácido eicosatrienoico (C20:3 n-6)

12.4.3.- Ácido araquidónico (C20:4 n-6)

12.5.- Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3

12.5.1.- Ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3)

12.6.- Relación ácido oleico/ácido linoleico

12.7.- Relación ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos poliinsaturados (AGM/AGP)

12.8.- Relación ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico (ARA/DHA)

12.9.- Índice de insaturación

12.10.- Índice de peroxidación

CAPÍTULO V.- DISCUSIÓN

1.- RESPECTO DE LOS PESOS DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS

2.- RESPECTO DEL PESO CEREBRAL

3.- RESPECTO DE LOS NIVELES DE HIDROPERÓXIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

3.1.- Niveles de hidroperóxidos basales

3.2.- Niveles de hidroperóxidos inducidos

4.- RESPECTO DE LA PRODUCCIÓN DE DICLOFLUORESCEINA OXIDADA

5.- RESPECTO DEL CONTENIDO DE α -TOCOFEROL EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

6.- RESPECTO AL CONTENIDO EN COENZIMA Q EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

6.1.- Adaptación a la suplementación con coenzima Q₁₀

6.2.-Contenido en coenzima Q₉, coenzima Q₁₀ y coenzima Q₉+Q₁₀

7.- RESPECTO DE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS ANTIOXIDANTES CITOSÓLICOS

- 8.- RESPECTO A LOS NIVELES DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO**
- 9.- RESPECTO A LA FLUIDEZ DE MEMBRANA (POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA)**
- 10.- RESPECTO AL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO**
 - 10.1.- Adaptación de las membranas mitocondriales de cerebro al perfil lipídico de la dieta.**
 - 10.2.- Respecto al perfil de ácidos grasos saturados en mitocondrias de cerebro**
 - 10.3.- Respecto al perfil de ácidos grasos monoinsaturados en mitocondrias de cerebro**
 - 10.4.- Respecto al total de ácidos grasos poliinsaturados en mitocondrias de cerebro**
 - 10.4.1.- Respecto al perfil de acidos grasos poliinsaturados n-6 en mitocondrias de cerebro
 - 10.4.2.- Respecto al perfil de acidos grasos poliinsaturados n-3 en mitocondrias de cerebro
 - 10.5.- Respecto a la relación ácidos grasos monoinsaturados / ácidos grasos poliinsaturados (AGM / AGP)**
 - 10.6.- Respecto a la relación ácido araquidónico / ácido docosahexaenoico (AA / DHA)**
 - 10.7.- Respecto al índice de insaturación e índice de peroxidación.**

CAPÍTULO VI.- CONCLUSIONES

CAPÍTULO VII.- BIBLIOGRAFÍA

CAPITULO I

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El envejecimiento es un proceso irreversible consecuencia de un deterioro funcional de las células, que de una manera gradual y constante, impide el correcto funcionamiento de los distintos órganos y sistemas, afectando globalmente el fisiologismo normal del individuo.

No se puede confundir envejecimiento con enfermedades asociadas al mismo, como son la enfermedad cardiovascular, la diabetes, etc., pues aunque la presencia de estas puede acelerar el envejecimiento, no forman parte del proceso intrínsecamente considerado. Esto es tan así, que si se eliminasen estas enfermedades, el periodo vital del individuo aumentaría, pero inevitablemente aparecería el envejecimiento y la muerte.

Han sido muchas las hipótesis propuestas para entender el proceso de senectud, teorías que se formulaban en el tiempo en función del grado de conocimiento que en las épocas concretas se tenían. La práctica totalidad de ellas eran verdaderas en cuanto que eran ciertos los hechos que las sustentaban, pero en realidad estos hechos eran más bien efectos que causas. Tuvo que formular Harman (1957) la teoría de los radicales libres para empezar a establecer las bases etiológicas fundamentales del proceso de envejecimiento. Según este autor los radicales libres que inevitablemente se producen en la célula, dañarían indiscriminadamente y continuamente todas las moléculas celulares sean estructurales o funcionales (o de ambas funciones), de manera estocástica. Es pues un fenómeno al azar de carácter acumulativo que provoca esa pérdida funcional celular que conduce al envejecimiento y la muerte. La teoría de los radicales libres puede no justificar todo el envejecimiento pero sí la mayor parte de la etiología del mismo

Más tarde la citada teoría se centró más, adscribiéndose a la mitocondria, como el orgánulo base del envejecimiento por el daño oxidativo, ya que es el lugar donde se producen la gran mayoría de radicales libres, en concreto especies reactivas de oxígeno, y por tanto donde más daño a todos los niveles se puede producir. Así surge la teoría mitocondrial del envejecimiento.

La teoría mitocondrial del envejecimiento no sólo está justificada molecularmente, dado que lo lógico es que el mayor daño oxidativo se produzca en el lugar donde se generan

la casi totalidad de las especies reactivas de oxígeno, sino también lo está funcionalmente. En efecto, en la mitocondria reside el sistema de generación fundamental y mayoritario de energía a través del sistema de transporte de electrones o cadena respiratoria. La provisión energética a la célula es el hecho primario y básico que hace posible todas las funciones celulares y cuando no se produce el citado aporte, la célula no funciona adecuadamente, acabando con un daño molecular que acarreará el correspondiente daño funcional. En el fondo de todo, está el hecho de que la vida no es posible sin energía.

En función de lo dicho, hay que entender la agresión oxidativa celular como un hecho inevitable, como una especie de servidumbre biológica que hay que sufrir para poseer un sistema eficaz de obtención de energía basado en la oxidación de los macronutrientes.

Ante el citado estrés oxidativo el organismo ha dispuesto un sistema complejo de defensa antioxidativa tanto a nivel extracelular como intracelular, tanto a nivel de membranas como de territorio extramembranoso. Moléculas orgánicas e inorgánicas, compuestos con carácter enzimático como no enzimático, sustancias liposolubles e hidrosolubles, componen una batería coordinada e intrincada de defensa antioxidativa.

El problema que se plantea especialmente a nivel nutricional es cómo se puede intervenir para que la agresión oxidativa sea menor y/o la defensa antioxidativa sea mayor. En el primer caso el ejemplo más evidente y casi único es el de la restricción energética, capaz como se ha visto tanto en invertebrados como en vertebrados incluyendo mamíferos, de aumentar el período vital. La razón fundamental está en que una disminución en el aporte de macronutrientes suministradores de energía, reduciría el fenómeno oxidativo y por tanto la producción de especies reactivas de oxígeno.

En el segundo supuesto indicado de mejorar la defensa antioxidativa, se encuentran dos posibles alternativas, que pueden llevarse a cabo unitariamente o conjuntamente. Por una parte, se pueden aportar determinados antioxidantes, sobre todo los de carácter esencial como vitamina C, α -tocoferol, β -caroteno y otros carotenoides y flavonoides y otros compuestos fenólicos. Esta manipulación nutricional y alimentaria es correcta, pero tiene determinadas limitaciones en el sentido de que solamente es eficaz cuando hay un déficit celular de los citados antioxidantes, pues cuando no lo hay, una suplementación excesiva y desequilibrada

puede no conseguir el efecto deseado, y por el contrario puede conducir a reacciones secundarias de carácter más o menos nocivo.

Una segunda estrategia nutricional propuesta por nuestro equipo de investigación desde hace varios años para la defensa antioxidativa, no consiste en el reforzamiento de esta defensa como son los antioxidantes, sino en la instauración de una estructura celular menos oxidable. En síntesis, este sistema consiste en lograr una membrana celular y más en concreto una membrana mitocondrial más resistente al ataque oxidativo reduciendo su grado de instauración a base de aumentar el nivel del ácido graso monoinsaturado oleico en detrimento de ácidos grasos más insaturados, especialmente el linoleico. De esta manera la agresión oxidativa generaría una peroxidación lipídica menor, causa importante en el conjunto del daño oxidativo celular. Esta biomanipulación de las membranas celulares se puede hacer a través de aceites de distinto grado de insaturación que pueden condicionar la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

En función de todo lo dicho, el objetivo es comprobar cómo el distinto grado de insaturación del aceite alimentario puede condicionar el correspondiente nivel de insaturación de las membranas celulares y por tanto el menor daño oxidativo en función de una menor peroxidación lipídica. Para alcanzar el objetivo propuesto, nuestras condiciones de trabajo fueron las siguientes:

a.- Aceites ensayados

Los aceites ensayados fueron dos, aceite de oliva y aceite de girasol, que representan dos tipos claramente diferenciados. En el primero el ácido graso mayoritario es el ácido monosaturado oleico, mientras que el aceite de girasol se caracteriza porque el ácido de mayor contenido es el diinsaturado es el linoleico.

Por otra parte el aceite de girasol puede considerarse que representa a toda una serie de aceites de semillas como maíz, cartamo, soja, germen de trigo, pepita de uva y algún otro.

Ambos aceites además han sido ensayados con adición o no del coenzima Q, componente de la cadena respiratoria y además molécula identificada como claramente antioxidante.

b.- Orgánulo celular investigado

Como consecuencia de lo anteriormente reflexionado, parece obligado en un estudio de envejecimiento, investigar en el orgánulo celular que sustenta fundamentalmente el citado proceso, para comprobar si el aceite de la dieta es capaz de influenciar la membrana mitocondrial, aumentando o disminuyendo la peroxidación lipídica, que puede o no conducir a un daño mitocondrial y/o celular.

c.- Tejido investigado

Todos los tejidos del organismo son capaces de modificar su composición lipídica de la membrana por efecto de la grasa alimentaria. Dentro de ellos merece la pena estudiar los que son postmitóticos o terminalmente diferenciados, dado que cualquier lesión o muerte celular no tiene la capacidad regenerativa que caracteriza a los tejidos mitóticos.

Dentro de los tejidos postmitóticos se ha elegido el sistema nervioso, que por lo acabado de indicar, en caso de daño oxidativo, puede conducir a lesiones celulares de mayor importancia y con carácter más irreversible. Este interés se ve reforzado por el hecho de que enfermedades como Alzheimer, Parkinson, etc. de carácter neurológico están claramente asociadas al daño oxidativo.

CAPITULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.- ENVEJECIMIENTO

1.1.- Concepto

El envejecimiento es un proceso fisiológico irreversible y por tanto inevitable, cuya causalidad depende de diversos factores aunque cada día cobra mayor importancia la creencia de que es la falta de energía la causa última de una serie de desórdenes celulares que conducen al citado envejecimiento. Lo que desencadena la escasez de provisión energética será motivo de reflexión posteriormente.

La **causalidad** del envejecimiento no parece estar ligada a un mandato genético que a modo de reloj biológico marcará un principio y un final del proceso, sino a un conjunto de **casualidades** que generando daños celulares acumulativos llegará a un "umbral" que se podría denominar de daño celular, a partir del cual el envejecimiento fuera imposible de detener. Es decir, en esa situación el organismo es incapaz de poseer mecanismos para mantener la homeostasis.

Lo acabado de exponer explica la heterogeneidad del envejecimiento en los seres vivos, de tal modo que cada individuo envejece a una velocidad distinta, siendo también diferente el momento de la muerte, aunque exista para cada ser un tope de periodo vital.

1.2.- Envejecimiento, periodo vital y genes

1.2.1.- Diferencia entre envejecimiento y periodo vital

El envejecimiento, que también podríamos identificarlo con el término de expectativa de vida, es variable como se acaba de comentar y diferente al periodo vital o periodo de tiempo máximo que ha alcanzado algún individuo de la especie que se considere. En el caso del ser humano la información actual habla de un periodo vital de 125 años, periodo de tiempo que, al parecer, se ha mantenido constante a lo largo de los últimos cien mil años.

En la **Figura 1** se muestra como ha incrementado la expectativa de vida para el ser humano en las sociedades socioeconómicamente desarrolladas a lo largo de la era cristiana. Los cambios más importantes en las curvas de supervivencia que se muestran en la **Figura 1**, se producen a partir del pasado siglo (siglo XX), en donde como se puede comprobar se produce una rectangularización de las curvas, lo que indica que a medida que avanza el siglo mayor número de individuos mueren a edades más avanzadas.

Las razones del fenómeno descrito están de una manera genérica justificadas, por una reducción en los factores que agreden al individuo y un aumento en los que lo defienden. De una manera concreta, la anulación y control de los procesos infecciosos, como proceso clave entre los primeros y una mejor alimentación como fundamental entre los segundos, explican en una mayor parte el porque del apreciable aumento en las expectativas de vida.

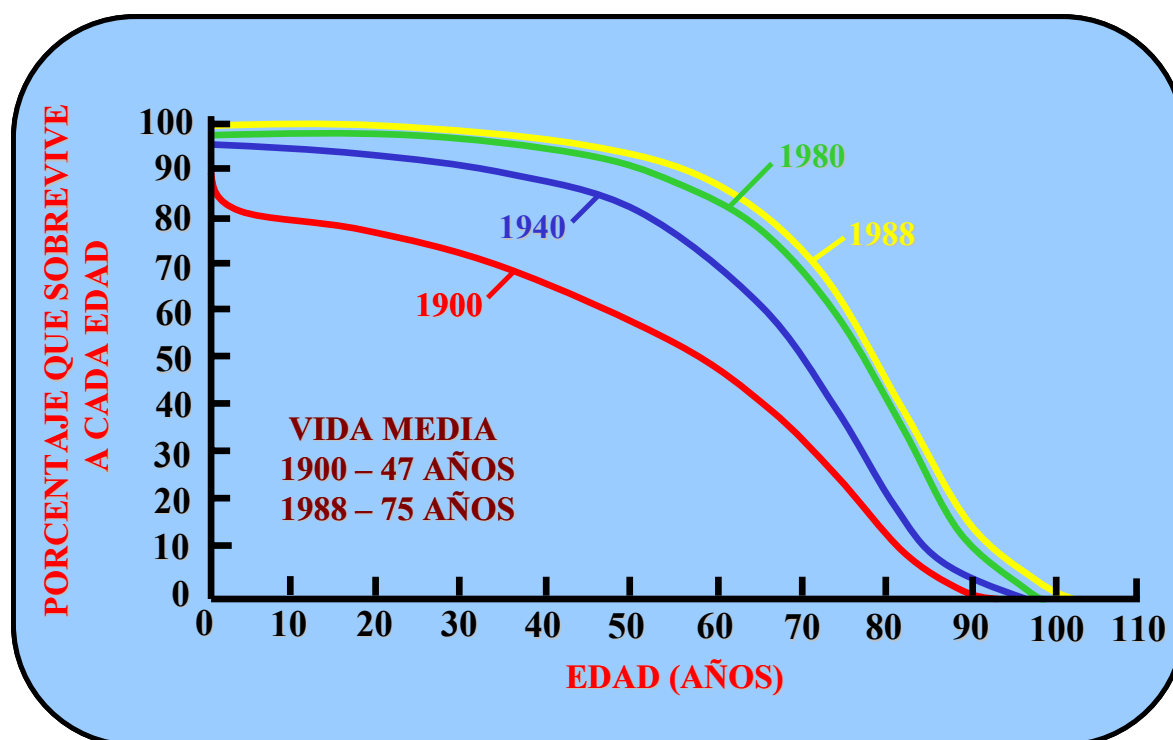


Figura 1 .- Supervivencia humana a lo largo del siglo XX

1.2.2.- Expresión génica y envejecimiento

Existen bastantes estudios en organismos diversos, desde los de tipo unicelular (levaduras) a vertebrados superiores, incluidos mamíferos como el ratón, en los que se comprueban que determinadas mutaciones genéticas prolongan o acortan el periodo vital y asimismo mejoran la calidad de sus expectativas de vida.

También se ha observado que una manipulación nutricional, como la restricción calórica, es capaz de afectar la expresión génica, prolongando el periodo vital (*Lee C.K. et al, 1999; Blanc S. et al, 2003; Heilbronn L y Ravussin, E, 2003*)

Los estudios se han centrado fundamentalmente en las siguientes especies:

a.- *Saccharomyces cerevisiae*.- La obtención de mutantes en diversos genes de determinadas vías de señalización aumenta el periodo vital. Asimismo, la reducción de glucosa en el medio de cultivo (restricción calórica) conduce al mismo fenómeno (*Guarentee L. y Lennon C, 2000; Kennedy B.K. et al, 1995*)

b.- *Cenorhabditis elegans*.- Se han investigado en este nematodo diversas vías de señalización como la de la insulina IGF-1 y la *clk*, que por mutación de algunos de los genes que las determinan, o por estímulos sensoriales gustativos, o reproductores o por restricción calórica, que actúan a través de las vías citadas, conducen a un aumento del periodo vital del gusano (*Walter D.W. et al, 2000; Van Voorheis W.A. et al, 1999*)

c.- *Drosophila melanogaster*.- También en la mosca de la fruta determinadas mutaciones genéticas repercuten en la duración del periodo vital (*Promislow D.E.L. et al, 1999, Shaw T.H. et al, 1999; Buck S. et al, 2000*)

d.- Ratón.- Ciertas mutaciones genéticas prolongan y acortan el periodo vital de los ratones. Asimismo, la restricción calórica conduce a una prolongación del mismo (*Kapahi P. et al, 1999; Lee C.K. et al, 2000*)

En la **Tabla 1**, se observa las mutaciones genéticas en *C.elegans*, *D. melanogaster* y ratón. La proteína expresada del gen normal y la prolongación y acortamiento del periodo vital.

Tabla 1 .- Relación entre determinadas mutaciones genéticas y la resistencia al estrés oxidativo

Influencia fenotípica			
Especies/ mutaciones	Periodo vital	Resistencia al estrés	Gen
<i>C. elegans</i>			
age-1	65% aumento	Aumentada (UV, calor)	Homólogo de PI(3)k humano
daf-2	100% aumento	Aumentada (UV, calor)	Homólogo del receptor de insulina humano
daf-16	Suspensión de la longevidad por mutaciones age-1 y daf-2	Suspensión de la resistencia al estrés de age-1 y daf-1	Factor de transcripción
clk-1	40% aumento	Aumentada (UVC)	Síntesis de Co Q
spe-10	40% aumento	Aumentada (UV, pero no calor)	Desconocido (defecto germinal)
spe-26	65% aumento	Aumentada (UV, calor)	Desconocido (defecto germinal)
old-1	65% aumento	Aumentada (UV, calor)	Receptor de la tirosina quinasa
ctl-1	25% disminución. Supresión de la longevidad conferida por las mutaciones daf-2 y clk-1	No detectada	Catalasa citosólica
mev-1	37% disminución	Hipersensibilidad al oxígeno	Subunidad citocromo b de la succinato deshidrogenasa
<i>Drosophila</i>			
mth	35% disminución	Aumentada (UV, calor)	Receptor acoplado a la proteína Q
<i>Ratón</i>			
shc	30% aumento	Aumentada (UV, H ₂ O ₂)	30% aumento
prop-1	50% aumento	Aumentada (ROS)	50% aumento

Lo más destacables desde la perspectiva de la presente memoria, es que hay una asociación clara y evidente entre la duración del periodo vital y la resistencia o no al estrés oxidativo (*Finkel T. y Holbrook N, 2000*). Esta relación en la mayoría de los casos estudiados se explica por una aumento (o reducción) en la actividad enzimática de enzimas antioxidantes, especialmente superóxido dismutasa (*Ku et al, 1993*) y catalasa e incluso enzimas relacionados con la biosíntesis del coenzima Q. Este último hecho ocurre en las distintas especies estudiadas independientemente de su complejidad biológica.

Del conjunto de estudios que relacionan el envejecimiento y la expresión génica, se pueden establecer una serie de conclusiones destacando las siguientes:

a.- Alteraciones en genes diversos pueden prolongar o acortar el periodo vital de distintas especies.

b.- Mutaciones en un solo gen de especies muy separadas en la evolución, afectan al periodo vital.

c.- La visión conjunta de genes implicados en el envejecimiento no permite ofrecer una visión armónica.

d.- Existen algunas vías (Sir, IGF) relacionadas con el periodo vital, que parecen mantenerse a lo largo de la evolución, es decir, son vías de señalización altamente conservadas, lo que las hace especialmente interesantes desde el punto de vista de la biología del envejecimiento.

e.- En muchos casos se observa la participación del sistema endocrino, junto a las vías metabólicas relacionadas con el *estatus* energético de la célula.

f.- Reproducción y envejecimiento permiten ofrecer un sentido etiológico a la vida de las especies.

g.- Llama especialmente la atención la participación de insulina y hormona similar a la insulina (IGF-I), que además de lo que se ha visto en relación al envejecimiento, es tan importante en el metabolismo de la glucosa, además de su general efecto anabolizante.

h.- Es también destacable la relación entre resistencia al daño oxidativo y afectación del periodo vital.

i.- La restricción calórica como sistema de prolongación del periodo vital en las diversas especies estudiadas es una situación, que permite armonizar los hechos endocrinos, metabólicos y de daño oxidativo.

2.- RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS

2.1.- Concepto de radical libre y especie reactiva

2.1.1.- Radical libre

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química (átomo, ion o molécula) capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura (esto es, electrones que se encuentran sólo en un orbital en lugar de hallarse apareados) (Mataix J y Battino M, 2002).

Los RL pueden ser catiónicos, aniónicos o presentar carga neutra y, precisamente debido a la existencia de electrones desapareados, son extremadamente reactivos y en general muy nocivos para la célula. El electrón no apareado puede pertenecer al oxígeno, y entonces es un RL del oxígeno, o a otro átomo como carbono (C), azufre (S), nitrógeno, (N) siendo en estos casos también radicales libres, aunque no del oxígeno.

Los RL son más o menos reactivos y ésta reactividad depende de la localización del electrón.

Siempre que un RL cede un electrón a una molécula no radical o toma un electrón de ella, o simplemente se une a la misma, se produce un radical.

Existen tres mecanismos posibles de formación de un RL:

a.- Mediante la adición de un electrón a una molécula, proceso denominado de "transferencia electrónica", que es bastante común en los sistemas biológicos.

*Así ocurre en los casos del anión superóxido (O_2^-), del radical hidropéroxido (HO_2^{\cdot}) (formado a partir del superóxido y un protón) y del radical hidroxilo formado a partir del peróxido de hidrógeno con ganancia de un electrón y un protón. En éste es como si el oxígeno molecular ganara un átomo de hidrógeno ($H^+ + e^-$) (**Figura 2a**).*

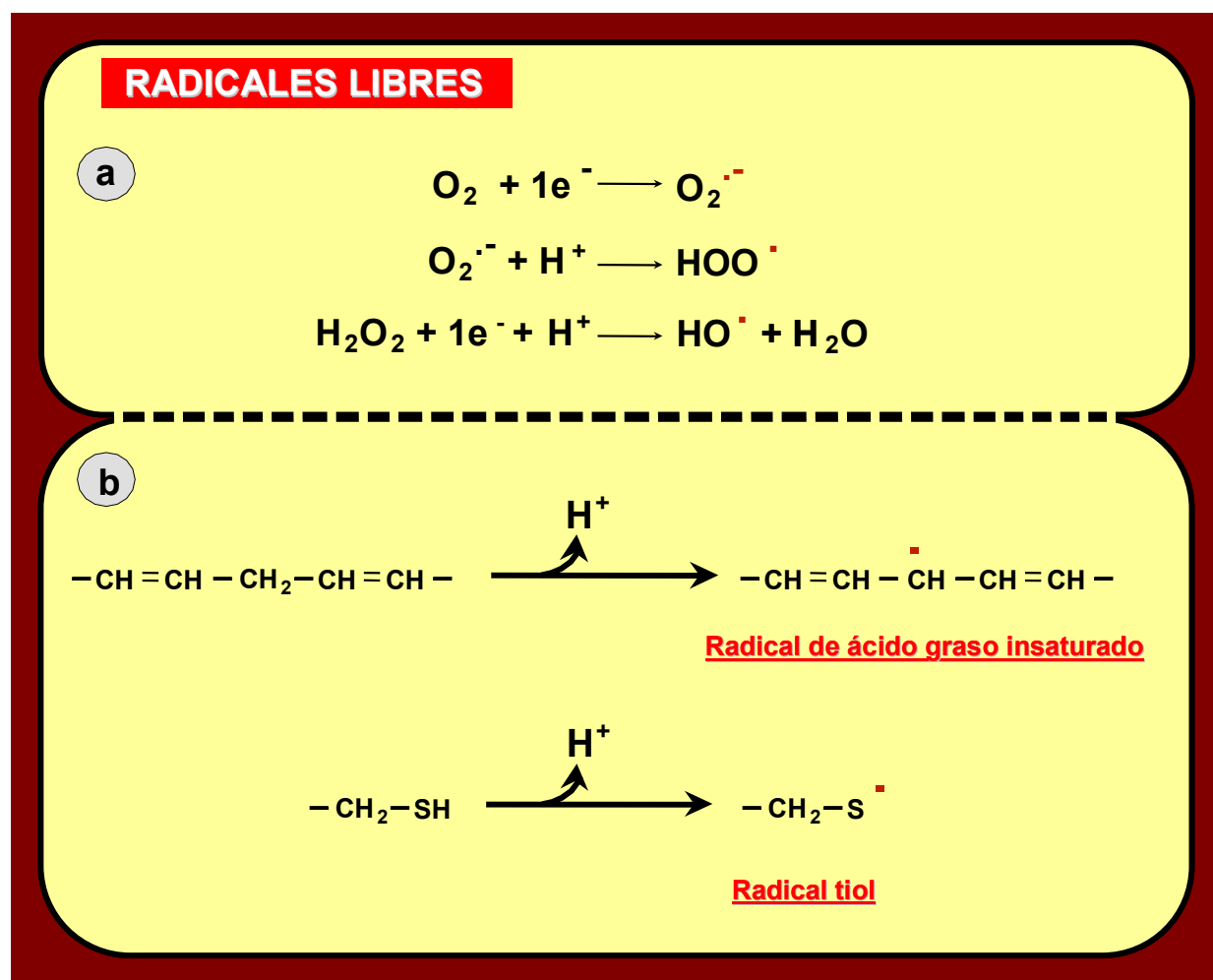
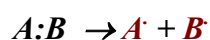


Figura 2 .- Mecanismos genéricos de producción de radicales libres

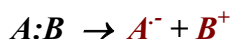
b.- A través de la pérdida de un protón de una molécula normal.

Por este mecanismo se pueden formar diversos RL, como radicales de ácidos grasos insaturados (linoleico, linolénico y otros), o radicales tioles (R-S[•]) a partir de restos de metionina, glutatión, o de proteínas diversas, etc. (**Figura 2b**).

c.- A través de la rotura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, conservando cada fragmento resultante uno de los electrones apareados del enlace (es decir, es una fisión homolítica). Este mecanismo requiere una amplia disponibilidad de energía:



Existe además una fisión heterolítica que no produce RL sino sólo iones, porque los electrones del enlace covalente se conservan, ambos, en uno solo de los fragmentos de la molécula parental:



Una vez formado el radical libre (reacción de iniciación, **Figura 3a**), éste tiene como característica fundamental, la capacidad de transferir el electrón a otros compuestos. De este modo se crean otros RL, generando reacciones en cadena que pueden amplificarse, llegando a afectar progresivamente a los tejidos corporales (reacción de propagación, **Figura 3b**)

El RL deja de ser efectivo cuando se destruye (cuando se “apaga”), por diversos mecanismos:

- Reacción con otro RL, compartiendo electrones y formándose una estructura estable (**Figura 3c.1**).
- Reacción con determinadas moléculas no radicales, que se convierten en RL (pero de menor reactividad) y que, a su vez, se estabilizan dejando de ser radicales libres (**Figura 3c.2**).

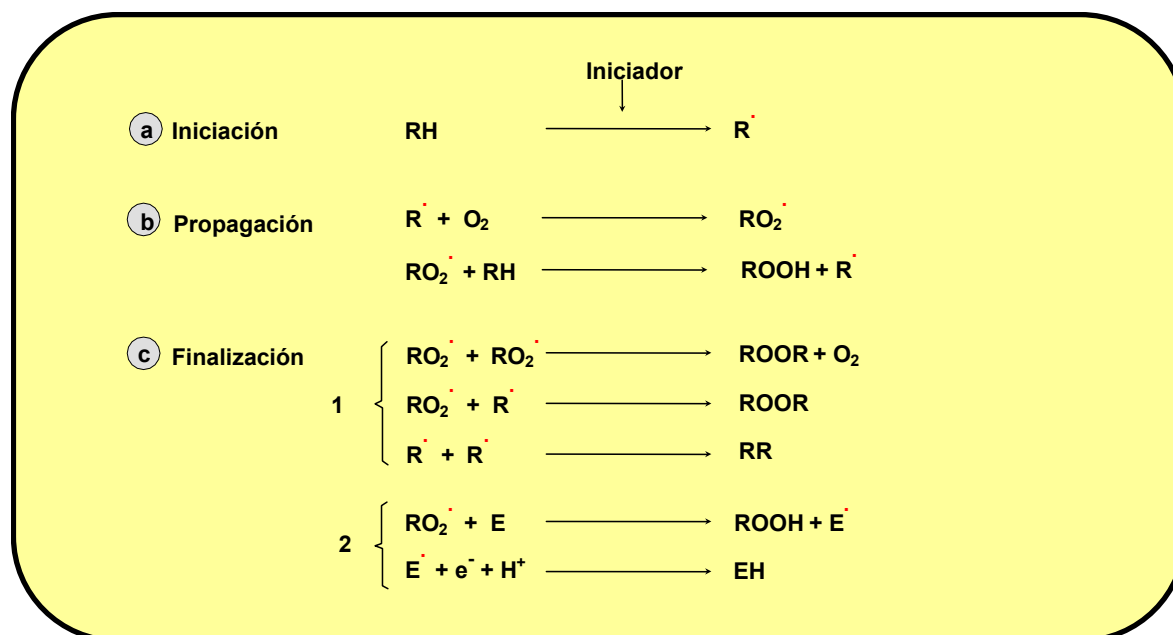


Figura 3.- Fases de formación de un radical libre a partir de una molécula, o átomo, o ión (R), propagación del fenómeno creando otros radicales libres (RO₂) y finalización de la existencia de RL a través de dos mecanismos distintos (c1 y c2 o “scavenging” (e⁻ + H⁺ proceden de un reductor como ácido ascórbico))

2.1.2.- Especies reactivas (ER)

El término especie reactiva hace referencia a un grupo de moléculas que incluyen no sólo a los radicales libres propiamente dichos, sino también a algunas especies no radicales, es decir, sin electrones desapareados. Estas especies reactivas poseen al menos un electrón en un orbital de mayor contenido energético que el correspondiente a su estado fundamental, lo que las hace más reactivas, pudiendo incluso generar radicales libres. Las más importantes son las especies reactivas del oxígeno (ERO). Algunos ejemplos son el ozono (O_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($ClOH$) y el singlete de oxígeno (1O_2).

En general, la vida media de radicales libres y especies reactivas es extremadamente corta, aunque no es igual para todos. Así, mientras algunos son suficientemente estables como para difundir a cierta distancia desde donde se producen (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$), otros (como el radical hidroxilo HO^{\cdot}) son tan reactivos que reaccionan a distancias no superiores a 1-5 diámetros moleculares desde su origen de formación.

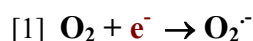
Ha sido ampliamente demostrado que tanto los radicales libres como las especies reactivas se producen de forma constante in vivo. Como consecuencia de esto, los organismos no sólo deben tener un sistema de defensa antioxidante para protegerse de ellos, sino también mecanismos reparadores que impidan la acumulación de las moléculas dañadas oxidativamente (como se verá más adelante). Sin embargo, no todos los radicales libres se producen de forma accidental, y así, algunos de ellos tienen papeles útiles para el metabolismo celular, como ocurre en la síntesis de derivados eicosanoides y otros.

2.2.- Tipos de radicales libres y especies reactivas del oxígeno

En la **Figura 4** se muestran diversas vías de formación de radicales libres del oxígeno, destacando a continuación los aspectos más interesantes de ellos, así como de otros átomos y moléculas.

a.- Radical superóxido

Se trata de un radical libre cargado, formado como consecuencia de una reducción monovalente o monoelectrónica del oxígeno molecular [1].



Es una especie menos reactiva que otros radicales como pueda ser el HO· y aunque su participación en procesos citotóxicos ha sido observada en numerosos estudios (*Fridovich, I., 1976; McCord, J.M., 1979*), no parece ser una agente citotóxico que actúe directamente, sino que su principal efecto sería el de actuar como fuente de H₂O₂ u otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (*Cheeseman, K.H. y Slater, T.F., 1993*).

Son muy variados los sistemas enzimáticos y no enzimáticos en los que se produce este radical, así como otros radicales. Aparentemente, la principal fuente de producción de anión superóxido se encuentra en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, ya que de un 5 a 10% del oxígeno consumido es parcialmente reducido por electrones provenientes de los transportadores de dicha cadena (*Borevis, A. y Chance, B., 1973*). Así, la ubisemiquinona aparentemente es la responsable de cerca del 75% de superóxido formado por esta vía (*Borevis, A. y Cadenas, E., 1975*) y la NADH deshidrogenasa la productora del resto (*Turrens, J.F. y Borevis, A., 1980*).

Entre otras fuentes nos encontramos, el escape de electrones del citocromo P₄₅₀ en el retículo endoplasmático hepático, la autooxidación de moléculas como hemoproteínas, hidroquinonas, catecolaminas, ascorbato, tioles, etc., o como productos durante los procesos de fagocitosis en la respuesta inflamatoria, o reacciones como las catalizadas por xantina oxidasa y aldehído oxidasa, etc., (*McCord, J.M., 1989*).

Como se muestra, aunque su producción en muchos casos presenta un carácter accidental, es cierto que en otros muchos muestra un papel funcional. Entre sus actividades se ha observado su función como vasoconstrictor en células del músculo liso (*Laurindo, F.R.M. et al, 1991*), o su actividad antibacteriana en las células fagocitarias activadas (*McCord, J.M., 1989*).

A pH bajos el anión superóxido podría protonarse, transformándose en el radical perhidroxilo (HO_2^\cdot), siendo esta forma protonada más reactiva y capaz de generar lipoperoxidación, “in vitro”, al poder reaccionar directamente con ácidos grasos polinsaturados libres, aunque “in vivo” se ha demostrado que su tendencia es reaccionar con lipoperóxidos ya formados dando lugar a radicales peroxilo (*Bielski, B.H.J. et al, 1983*). Sin embargo, a pH fisiológicos menos del 1% del superóxido se encuentra en su forma protonada (*Cheeseman, K.H. y Slater, T.F., 1993*).

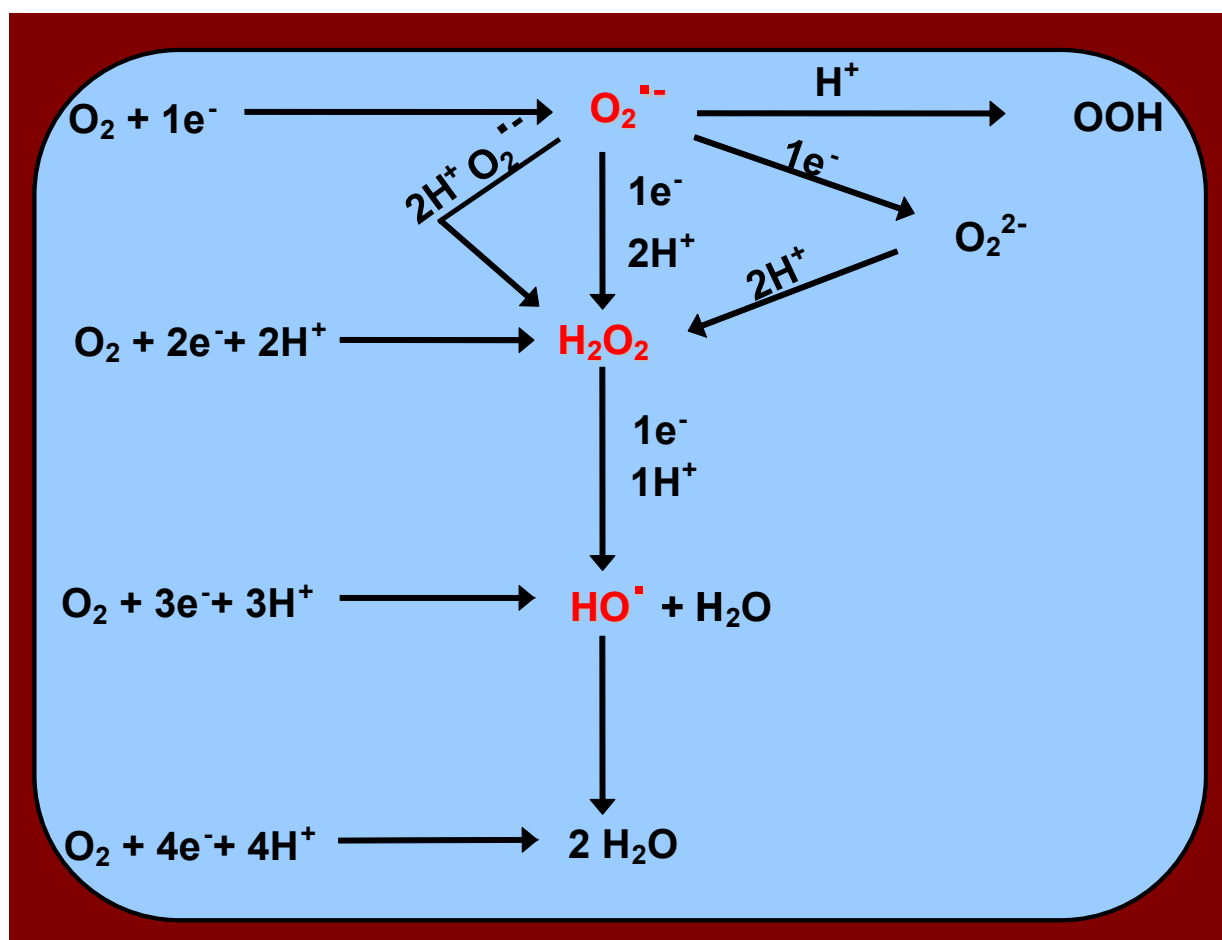
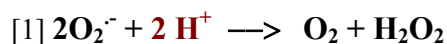


Figura 4.- Diversas vías de formación de radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno

Es un metabolito del oxígeno intracelular, formado por una dismutación del anión superóxido (catalizada por la superóxido dismutasa (SOD))[1], o bien directamente vía reducción bivalente del oxígeno[2].

SOD



El H_2O_2 al igual que el anión superóxido, presenta una reactividad química limitada, pero su capacidad para atravesar membranas y el hecho de poder generar en presencia de iones metálicos de transición o del $\text{O}_2^{\cdot-}$, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), hace que se incluya dentro del término genérico de “especies reactivas del oxígeno”, a pesar de no ser en sí un radical libre ya que no presenta electrones desapareados.

En mitocondrias, en condiciones fisiológicas, se ha estimado una producción de 0.3 a 0.6 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$ de proteína, pudiéndose incrementar dicha producción con un aumento de PO_2 en el medio, lo que implica al H_2O_2 en el efecto letal inducido por altas presiones parciales de este gas (*Chance, B. et al, 1979*).

Se ha observado que pequeñas concentraciones de H_2O_2 producen lisis eritrocitaria, y asimismo puede producir la oxidación directa de compuestos sulfidrilos, tales como residuos de metionina de diversas proteínas e inducir indirectamente la peroxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares (*Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1984*). Igualmente, se ha mostrado la inducción de la producción del factor activador plaquetario por el endotelio en presencia de H_2O_2 (*Redl, H. et al, 1993*).

En otros estudios se ha encontrado que altos niveles de peróxido de hidrógeno, pueden inactivar a la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa en células de mamífero, así como a la fructosa bifosfatasa y aconitasa en plantas (*Halliwell, B. et al, 1992*).

El H_2O_2 , tiene la capacidad de atravesar con facilidad las membranas biológicas, pudiendo causar o promover el daño oxidativo en macromoléculas distantes de su lugar de producción (*Chance, B. et al, 1979*).

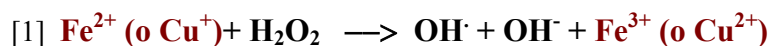
c.- Radical hidroxilo

Es el radical más reactivo entre las especies oxigénicas conocidas, capaz de reaccionar, de un modo directo, con prácticamente cualquier molécula biológica y dando

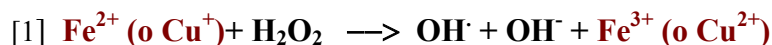
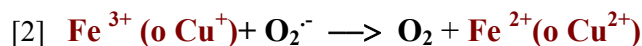
lugar a productos que no pueden regenerarse a través del metabolismo celular. Las reacciones tienen lugar a una velocidad muy elevada, por lo que ocurren muy cerca del sitio de origen, de ahí que el daño causado por este radical sea sitio-específico.

Los mecanismos de producción del radical hidroxilo pueden ser:

- Descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente hierro ferroso (Fe^{2+}) (*Minotti, G. y Aust, S.D., 1987*) y cobre cuproso (Cu^{2+}) (*Anuona, O.I. et al, 1991*), reacción denominada de Fenton [1], la cual sucede "in vitro".



- Descomposición del anión superóxido y metales de transición, reacción de Haber-Weiss o también denominada en algunos casos reacción de Fenton conducida por el $\text{O}_2^{\cdot-}$ (*Halliwell, B. et al, 1992*)[2-1], la cual acontece "in vivo".



Hay otras vías de producción de radical hidroxilo en organismos vivos, entre los que se encuentra la fisión homolítica del agua provocada por excesiva exposición a radiaciones ionizantes (*Von Sonntag, C., 1987*) o bien la descomposición de peroxinitrilo, independiente de metales iónicos de transición, (*Beckman, J.S. et al, 1990*). En esta última vía también interviene el anión superóxido, ya que es el causante de la formación de radical peroxinitrilo al reaccionar con el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), especialmente en fagocitos y células endoteliales vasculares (*Saran, M. et al, 1989*).

d.- Singlete de oxígeno

No se trata de un radical en sí, pero junto al radical hidroxilo, es considerada como una de las principales especies oxigénicas capaces de reaccionar directamente con

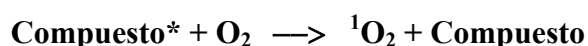
macromoléculas como puedan ser ácidos grasos (*Sevanian, A y Hochstein, P. 1985; Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*).

Es producido por absorción de energía por una molécula de oxígeno, lo que causa una nueva disposición de los electrones como consecuencia del cambio de orientación de uno de sus espines. La vía más importante de producción en sistema biológicos se da cuando ciertos compuestos son iluminados en presencia de oxígeno, estos compuestos absorben la luz, adquiriendo un estado de alta excitación electrónica, y transfiriendo ese exceso de energía al oxígeno con lo que se convierte en oxígeno singlete (*Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*) [1].

Luz



[1]



Entre estos agentes fotosensibles, nos encontramos colorantes (p.ej. eosina), cierto tipo de drogas (p.ej. tetraciclinas) y una serie de sustancias encontrados en el cuerpo humano, como pueden ser porfirinas, riboflavinas y bilirrubina (*Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*). Así, por ejemplo, en pacientes con cierto tipo de porfiria, se produce acumulación de porfirinas que pueden provocar daño en la piel, al interactuar la luz solar con ellas dando lugar a la formación de oxígeno singlete (*Krinsky, N.I., 1989*).

A pesar de la capacidad del oxígeno singlete para reaccionar con ácidos grasos, no se puede considerar como un inductor de la peroxidación lipídica, como pueda serlo el OH \cdot , puesto que reacciona directamente con el ácido graso para dar peróxidos [2], sin que exista sustracción de hidrógeno, no dándose por lo tanto las reacciones en cadena (*Halliwell, B. Chirico, S. 1993; Frankel, E.N., 1984*).



La reacción de peróxidos entre sí, pueden producir oxígeno singlete, siendo esta otra vía de producción, aunque menor, puesto que la probabilidad de colisión entre estos peróxidos es baja.

Otra vía de producción es la observada por Kanofsky y Sima (*Kanofsky, J.P. y Sima, P., 1991*), en la que la interacción del ozono con ciertas moléculas biológicas produce oxígeno singlete.

2.3.- Radicales libres y especies reactivas de otros átomos y moléculas

Se pueden encontrar radicales libres y especies reactivas centrados sobre átomos y moléculas diferentes al oxígeno. De ellos se expone a continuación una breve y obviamente incompleta relación:

Radicales libres derivados del nitrógeno.- *Se trata del dióxido de nitrógeno (NO_2) y del óxido nítrico (NO). Son moléculas que se respiran con el aire y que pueden reaccionar rápidamente con compuestos de tipo hemo. Ambas son estables, si bien el óxido es mucho más reactivo con moléculas orgánicas que el dióxido. Por su parte, el NO_2 reacciona con diversas moléculas formando RL. El NO es relativamente inestable en condiciones aeróbicas, y se genera en un proceso NADPH-dependiente mediante una NO-sintetasa, de la cual existen diferentes subfamilias. No tiene importantes propiedades citotóxicas y es fisiológicamente un potente vasodilatador, originariamente conocido como un factor de relajación derivado del endotelio.*

Radicales libres derivados del azufre.- *El átomo de azufre puede dar lugar a radicales tiol (RS), los cuales pueden formarse de la oxidación de glutatión, de metionina y cisteína, y reaccionar también con NO y NO_2 . Por ejemplo, muchas reacciones entre NO_2 , isoprenos y otros constituyentes del humo del tabaco, producen especies que inactivan oxidativamente la antiproteasa humana.*

Radicales libres derivados del carbono (R^\cdot).- *Resultan del ataque de un radical oxidante (HO^\cdot) sobre una estructura biológica, como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos y bases diversas, a la que sustrae un átomo de hidrógeno que está unido a un carbono. La reacción del R^\cdot con el oxígeno es muy rápida y forma el correspondiente radical peroxilo (radical alquilperoxilo) (OOR). A su vez, OOR puede generar el radical alcoxilo (OR) altamente inestable, que se apaga o decae rápidamente a través de un mecanismo llamado de β -escisión.*

Radicales libres de tipo ariloxilo ($ArO\cdot$).- Son una forma más general de los radicales fenólicos derivados de los radicales fenoxílicos primarios ($C_6H_5O\cdot$) provenientes del fenol. Los radicales fenoxílicos se pueden generar del fenol por acción tanto del $\cdot OH$ como de radicales oxidantes; pueden originarse también a partir de antioxidantes fenólicos (por ejemplo, α -tocoferol), hidroxianisol butilato (BHA), o butil hidroxitolueno (BHT). $ArO\cdot$ se forma de antioxidantes fisiológicos heterocíclicos (serotonina, 5-OH-Trp, etc.) y algunos derivados aromáticos hidroxilados (8-hidroxiguanosina, ácido úrico, naftol y otros). Estos tipos de radicales se apagan rápidamente y no son tan reactivos como los del oxígeno.

Radicales libres derivados del cloro.- Aunque no es un radical, el ácido hipocloroso ($HOCl$) es un compuesto altamente reactivo. Se produce durante la fagocitosis o como resultado de la actividad mieloperoxidásica sobre el H_2O_2 . El $ClO\cdot$ es un potente oxidante del grupo $-SH$ de la superficie celular y puede inhibir los sistemas de transporte de membrana, así como llegar a “clorar” residuos de tirosina.

Radicales libres procedentes de las quinonas.- Se trata de radicales libres que son importantes en varios procesos biológicos. Son el radical semiquinona ($HQ\cdot$) y el radical anión semiquinona ($Q\cdot^-$).

En la **Tabla 2** se presenta un sumario de los RL y especies reactivas de mayor trascendencia biológica, así como sus fuentes más destacables. Desde el punto de vista de la agresión oxidativa los más importantes son: $O_2\cdot^-$, $HO\cdot$, H_2O_2 , $OO\cdot$, $R-S\cdot$ y $ClO\cdot$.

Tabla 2

Radicales Libres y Especies Reactivas de relevancia biológica y vías metabólicas donde se generan		
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	Especies de oxígeno parcialmente reducidas
Ozono	O_3	
Dióxido de nitrógeno	NO_2	Atmósfera
Óxido nítrico	NO	Metabolito de la arginina
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Cadena de transporte electrónico mitocondrial y microsomal, XO/XDH, oxidasas celulares diversas, fagocitos
Hidroxilo	HO^\bullet	Deriva del anterior
Anión Superóxido	$\text{O}_2^{\bullet -}$	Ácidos grasos de fosfolípidos de membrana, aminoácidos, hidratos de carbono
Hidroperóxilo	HOO^\bullet	Deriva del anterior
Alcoxilo	OR^\bullet	Cadena de transporte electrónico mitocondrial, metabolismo de peroxisomas y degradación de purinas
Peroxilo	OOR^\bullet	Deriva del anterior
Aciloxilo	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^\bullet$	Ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana
Acilperóxilo	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OO}^\bullet$	Deriva del anterior
Ariloxilo	ArO^\bullet	Fenol
Arilperóxilo	ArOO^\bullet	Deriva del anterior
Ácido hipocloroso	HOCl	Se forma en fagocitos
Radical semiquinona	HQ^\bullet	Cadena respiratoria
Radical anión semiquinona	$\text{Q}^{\bullet -}$	Cadena respiratoria
Radical tiol	$\text{R}-\text{S}^\bullet$	Aminoácidos azufrados de proteínas

2.4.- Fuentes de producción de radicales libres y especies reactivas

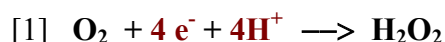
Son muchas y variadas las fuentes de RL y ER, pudiendo diferenciarse en endógenas y exógenas. Entre las endógenas se encuentran, el sistema de transporte electrónico mitocondrial, el sistema de transporte electrónico microsomal, diversas enzimas oxidativas citosólicas y peroxisomales, las hemoproteínas y la actividad derivada del proceso de fagocitosis. Entre las fuentes exógenas destacan los xenobióticos, determinados venenos y toxinas, diversas moléculas propias de los fenómenos de contaminación, las radiaciones ionizantes (especialmente los [rayos g](#), rayos X y UV), fármacos diversos, el ozono, hiperóxia e isquemia-reperfusión, el alcohol y otros.

A continuación se exponen con más detalle algunas de estas fuentes, con especial atención a aquellas que destacan por su elevada producción de RL y ER.

a.- Sistema de transporte electrónico (Cadena respiratoria)

Bajo condiciones fisiológicas normales, esta puede ser considerada como la mayor fuente de producción de radicales libres de forma accidental.

Del total del oxígeno que llega a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el 90 al 95% del mismo es metabolizado a agua mediante la vía de la reducción tetravalente, sin formación de intermediarios tóxicos [1].



Sin embargo, el 5-10% del oxígeno consumido sufre una reducción monovalente, por electrones procedentes de los transportadores de la cadena que escapan al control de la misma (*Borevis, A. y Chance, B., 1973*), dando lugar a la formación de anión superóxido, el cual rápidamente se dismuta, por acción de la superóxido dismutasa a peróxido de hidrogeno (*Boveris, A. y Cadena, E., 1975*), con la consecuente formación posterior de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss.

Se han observado dos sitios principales en la formación de estos radicales libres, uno es el paso de ubiquinona hacia citocromo C₁, donde el intermediario semiubiquinona es capaz de reducir oxígeno a anión superóxido, siendo este paso el responsable de prácticamente el 75% de anión formado (*Borevis, A. y Cadenas, E., 1975*); el otro paso es a nivel de la NADH deshidrogenasa (*Turrens, J.F. y Borevis, A., 1990*).

La producción de superóxido por esta vía aumenta bajo dos diferentes condiciones físicas, principalmente, una de estas vías, es cuando la concentración o consumo de oxígeno se encuentra incrementado, como puede ser por ejemplo en el caso de actividad física (*Litarru, G.P., 1994*), en la que el consumo de oxígeno puede aumentar de 10 a 40 veces con respecto al estado de reposo (*Aw, T.Y. et al, 1986*).

La otra vía, se da cuando la cadena de transporte de electrones está completamente reducida, como puede suceder durante el periodo de isquemia y posterior reperfusión (*McCord, J.M., 1989; Flitter, W.D., 1993*).

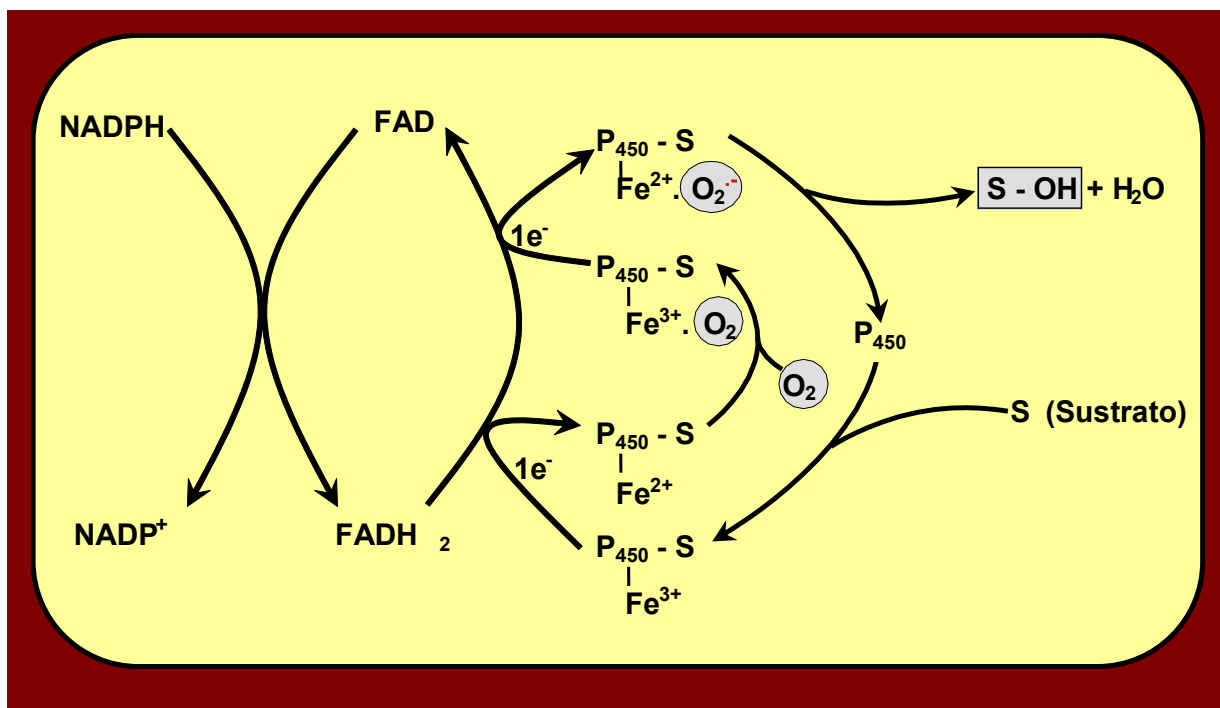
b.- Sistemas de transporte electrónico no fosforilante

Figura 5.- Ejemplo de sistema hidroxilante microsomal hepático, con formación de anión superóxido

El retículo endoplásmico, es decir, la fracción microsomal de la célula, contiene sistemas de transporte electrónico no fosforilante (diferente del transporte electrónico mitocondrial que es fosforilante). Dichos sistemas participan en diversas reacciones de hidroxilación y desaturación que pueden tener carácter biosintético o degradativo, y de las cuales se van a citar algunos ejemplos destacables. En algunas reacciones de hidroxilación se producen RL y ERO.

Un sistema de hidroxilación microsomal hepático se muestra en la **Figura 5**. Dicho sistema está constituido por una flavoproteína denominada NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa, y un citocromo microsómico, el P₄₅₀. Como se observa, en la primera etapa un equivalente electrónico es transferido desde NADPH a la flavoproteína FAD a la que reduce por completo. Posteriormente, los electrones son transferidos desde la flavoproteína reducida a la forma oxidada del citocromo P₄₅₀ (Fe³⁺) para dar la forma reducida P₄₅₀ (Fe²⁺). Ésta con oxígeno molecular (O₂) conduce a un compuesto intermedio capaz de

originar finalmente el sustrato hidroxilado correspondiente (S-OH), pero en esta etapa intermedia se ha formado anión superóxido (O_2^-).

La hidroxilación puede darse en diversos compuestos de gran importancia biológica como esteroides o ácidos grasos. Ejemplos destacables en este segundo caso, son la formación de eicosanoides a partir de ácido araquidónico y la autooxidación de catecolaminas.

Por último, otras fuentes potenciales de RL y ERO a nivel microsomal se encuentran en el metabolismo de diferentes xenobióticos (fármacos, componentes alimentarios, polución, tabaco, etc.), que a través de óxido-reducciones, producen esos radicales.

c.- Sistema de la xantina oxidasa

Se trata de un enzima encargado de catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y de esta a ácido úrico, acoplado a dicha oxidación una reducción monovalente del oxígeno molecular, con la consiguiente formación de anión superóxido.

En condiciones fisiológicas normales se encuentra en su forma nativa, xantina deshidrogenasa, la cual utiliza NAD^+ como aceptor de electrones, no teniendo lugar por lo tanto la reducción de oxígeno molecular ni la formación de O_2^- . En tejidos sanos el porcentaje del enzima en su forma oxidada es muy bajo, habiéndose observado en algunos estudios un valor aproximado de un 10%, aunque este porcentaje podría ser debido a intermediarios proteolíticos, creados durante la degradación normal de la proteína en la célula (Roy, R.S. y McCord, J.M., 1983).

Sin embargo, durante alteraciones de los mecanismos homeostáticos celulares, como puede suceder en isquemia (**Figura 6**) o hipoxia, tiene lugar un gran aumento en la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, aumento consecuente de un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y activación de determinadas proteasas. La proporción y mecanismo de transformación de xantina deshidrogenasa a oxidasa podría ser específica del tejido en la que tiene lugar (Roy, R.S. y McCord, J.M., 1983), pudiendo ser convertida por una proteólisis limitada (Batelli, M.G. et al, 1972), o por oxidación de grupos tioles (DellaCorte, E. y Stirpe, F., 1972).

En numerosos estudios se ha observado la participación de esta fuente de producción de radicales en distintas patologías o daños fisiológicos, como por ejemplo en la isquemia/reperfusión (*Friedl, H.P. et al, 1990; Granger, D.N. et al, 1981*), síndrome de distres respiratorio del adulto (*Grun, C.M. et al, 1987*), shock hemorrágico o traumático (*Redl, H. et al, 1993*), quemaduras (*Friedl, H.P. et al, 1989*), etc., observándose en todas ellas degradación del pool de nucleótidos de adenina, degradándose el ATP a hipoxantina y xantina, aumento del Ca^{2+} intracelular, aumento de ácido úrico consecuente de la actividad de la xantina oxidasa, etc. El ejercicio físico intenso presenta similitud con las observaciones anteriores, por lo que en esta situación también podría actuar esta vía de producción de radicales libres (*Sjodin, B. et al, 1990*).

Igualmente, se ha observado que la adición de alopurinol inhibe la xantina oxidasa, lo cual representa una protección frente al daño producido por isquemia/reperfusión en distintas especies animales (*Parks, D.A. et al, 1982; McCord, J.M., et al, 1985; Werns, S.W. et al, 1986; Johnson, W.D. et al, 1991*).

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre este enzima, sigue existiendo controversia acerca de su papel real en ciertas patologías, controversia basada en las marcadas diferencias, tanto en la distribución como en la concentración de la misma en los distintos modelos animales usados, observándose por ejemplo una gran actividad de xantina oxidasa cardíaca en ratas, perros y ratones mientras que en conejos, cerdos y humanos se ha mostrado una muy pequeña actividad de la misma (*de Jong, J.W. et al, 1990*).

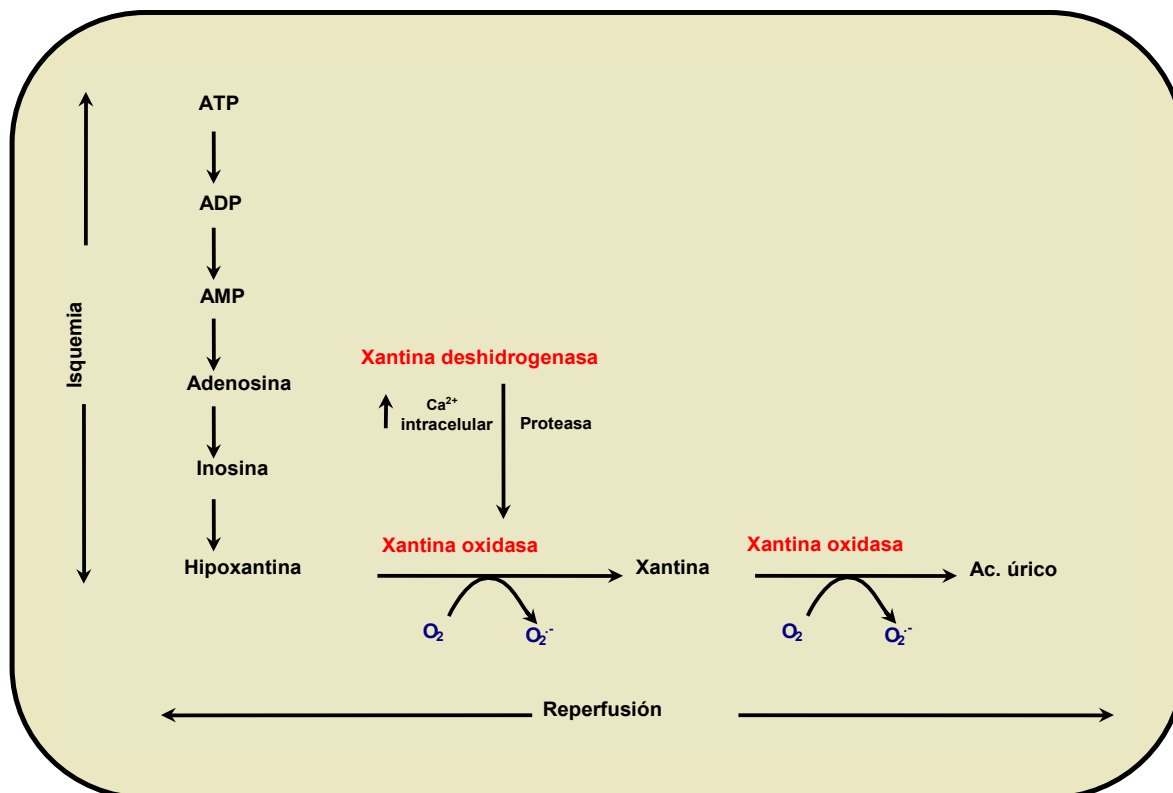


Figura 6.- Mecanismo de generación de anión superóxido por xantina oxidasa durante una isquemia reperusión

d.- Fagocitosis

En la introducción de este capítulo se apuntaba al proceso inflamatorio como base etiopatogénica de determinadas enfermedades, debido a la formación de gran cantidad de RL por células fagocíticas.

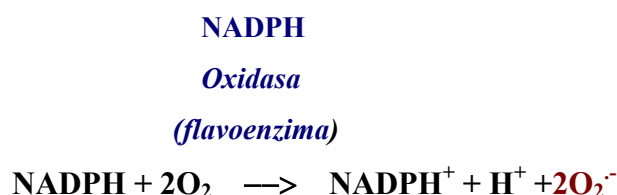
La inflamación representa una respuesta del organismo a una serie de estímulos, es decir, la respuesta normal de un tejido a una agresión de tipo mecánico, químico o infeccioso. Tiene carácter de protección local cuya misión es destruir, diluir o aislar, bien al agente agresor o bien al tejido dañado. Hace veinte siglos, el médico romano Celsus la caracterizó en su forma aguda por la tetralogía: rubor, tumor, calor y dolor, con la pérdida asociada de funcionalidad.

El que la inflamación sea aguda o crónica depende de la regulación humoral y de la respuesta celular. Además, las moléculas que se consideran normalmente mediadores de la inflamación a varios niveles son muy numerosas. Un hecho común a todo tipo de inflamación es la infiltración en el tejido afectado de células capaces de moverse libremente. Se trata fundamentalmente de leucocitos polimorfonucleares, aunque también es posible encontrar monocitos y macrófagos. Estas células se activan y llevan a cabo la fagocitosis a través de un mecanismo de consumo de oxígeno, que no es sensible al cianuro (es decir, no mitocondrial). Dicho consumo de oxígeno puede llegar a ser de hasta veinte a treinta veces superior al que existe previo a la activación. El consumo de oxígeno por neutrófilos y macrófagos se debe a la acción de un sistema citocromo b_{245} -NADPH que oxida a una flavoproteína ligada a la membrana plasmática.

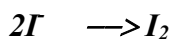
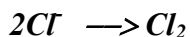
Como consecuencia del proceso de fagocitosis aumenta la producción de NADPH a través de la ruta de las hexosas fosfato. De forma paralela, hay un incremento en la generación de anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso, especies todas capaces de dañar la membrana celular y las biomoléculas asociadas a ella, además de cumplir su específica misión de defensa del organismo destruyendo oxidativamente al agente agresor.

Si el estímulo que generó el proceso de fagocitosis continúa, se puede llegar a una situación de inflamación crónica caracterizada por la formación de un tejido vascular granulomatoso que finalmente se convierte en tejido fibroso.

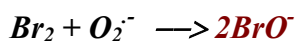
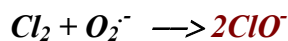
Tal y como acaba de mencionarse, los macrófagos y ciertas células fagocíticas producen una gran cantidad de superóxido, durante la denominada "explosión" oxidativa (o explosión respiratoria) que sigue a su activación y que es fundamental para la destrucción de los gérmenes invasores. La reacción implicada es la siguiente:



Además de la acción a través del $O_2^{\cdot -}$ existe otra línea de defensa que utiliza este anión superóxido y que se basa en la existencia de mieloperoxidasa, que previamente oxida los halogenuros (hidruros de halógenos) en halógenos:



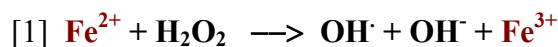
Estos halógenos en contacto con aniones superóxido producen hipocloritos o hipobromitos, que son aún más activos que aquél a la hora de degradar sustancias extrañas.



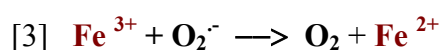
e.- Metales de transición

Radicales libres como $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 han sido mostrados como radicales con baja reactividad directa sobre macromoléculas, centrándose su mayor peligrosidad en la producción de otros radicales mucho más reactivos, como el OH^{\cdot} , para lo cual requieren la participación de iones metálicos de transición.

Entre estos metales, el hierro ha despertado gran interés, por su abundancia y por su participación en la generación de OH^{\cdot} , mediante la clásica reacción de Fenton [1].

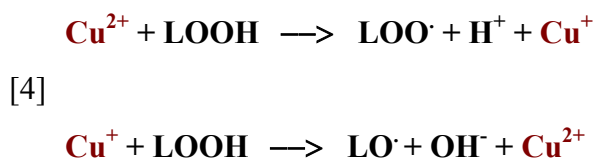


La reacción de Fenton se ve estimulada por agentes reductores, lo cuales son capaces de oxidar el ión ferrico (Fe^{3+}) a ferroso, ya que el Fe^{3+} no es nada reactivo con el H_2O_2 . Entre estos agentes reductores se encuentra el ascorbato [2] o el anión superóxido [3].



Otro ión metálico que despierta un interés creciente es el cobre, siendo frecuentemente utilizado *in vitro* para estimular la lipoperoxidación de lipoproteínas de baja

densidad, aunque necesita la presencia de trazas de peróxidos lipídicos [4] (*Estrebauer, H. et al, 1989*).



Se ha observado que el cobre “in vitro” estimula más que el hierro la formación de especies reactivas del oxígeno que puedan causar daño a bases del ADN (*Guyton, K.Z. y Kensler, T.W., 1993*).

En vista a las actuaciones de los iones metálicos en la formación de radicales libres, un sistema preventivo de la oxidación podría ser la utilización de compuestos que atraparan estos iones, dificultando su encuentro con los radicales libres. De hecho el organismo tiene un perfecto sistema de transporte y almacenamiento de estos iones mediante proteínas especiales. Sin embargo el estrés oxidativo puede liberar iones metálicos de las estructuras que los contienen, como por ejemplo, el O_2^- que puede movilizar hierro desde la ferritina y el H_2O_2 que puede atacar grupos hemo, liberando el hierro (*Saran, M. y Bors, W., 1990*).

2.5.- Objetivos biológicos de los radicales libres y especies reactivas

*La capacidad de cada radical libre o especie activa como potencial agente prooxidante viene determinada, desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas, como son su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Así, una especie muy reactiva como el $\cdot\text{OH}$ reaccionará con cualquier molécula que tenga cerca, sin especificidad alguna, y el peligro radificará en la importancia funcional del compartimento celular en el que se origine o la molécula a la que ataque. De esta forma, si la molécula atacada es una base purínica o pirimidínica del **nucleón ADN**, se pueden generar graves modificaciones de éstas e incluso una rotura simple o de las dos hélices de esta molécula. Por el contrario, si la producción del radical tiene lugar en un entorno como el plasma sanguíneo y la molécula dañada es una de las enzimas que se hallan presentes en gran exceso, el daño biológico real será prácticamente imperceptible.*

Otra especie menos reactiva que el radical hidroxilo, como es el anión superóxido, reaccionará de forma menos indiscriminada pero con mayor especificidad y mayor selectividad en cuanto a sus “dianas”, por lo que su actuación puede tener mayores consecuencias biológicas. A lo anterior hay que añadir la difusibilidad de RL y ERO, que a su vez depende de la reactividad y de la carga neta del radical libre. Así, por orden creciente de reactividad, están el $O_2^- < H_2O_2 < OH$. Éstos son los tres compuestos con mayor capacidad de difusión, capaces de reaccionar con moléculas que están alejadas de su lugar de origen, e incluso de internarse en otros compartimentos celulares por su capacidad de atravesar las membranas celulares al no tener carga iónica.

Debido a estas características, algunos RL y ERO pueden interactuar rápidamente y modificar tanto pequeñas biomoléculas libres (vitaminas, aminoácidos, carbohidratos simples, lípidos), como macromoléculas (proteínas o ácidos nucleicos), o estructuras supramoleculares (membranas y lipoproteínas). Básicamente, los objetivos (blancos) de los RL y ERO son cinco:

- Biomoléculas orgánicas de bajo peso molecular.*
- Proteínas.*
- Ácidos nucleicos.*
- Activación génica.*
- Ácidos grasos insaturados.*

2.5.1.- Biomoléculas orgánicas de bajo peso molecular

Entre ellas sobresalen las siguientes:

- Vitaminas: Acido ascórbico, carotenoides, α -tocoferol, quinonas.*
- Hidratos de carbono: Glucosa, ribosa.*
- Aminoácidos: Histidina, triptófano, cisteína, metionina.*
- Acido úrico.*
- Colesterol.*
- Pequeños péptidos solubles como el glutati6n.*

Las reacciones de RL y ERO con las vitaminas A, C, E y quinonas, glutatión y ácido úrico, llevan habitualmente a la fase de finalización de la cadena de reacción de radicales y serán discutidos en el apartado de antioxidantes.

Los hidratos de carbono están sujetos a degradación oxidativa pudiéndose producir radicales de azúcar por la reacción del OH. En dicha reacción tiene lugar la pérdida de un hidrógeno de cualquiera de los átomos de carbono. Así, se puede generar una desoxirribosa con un radical centrado en el cuarto carbono. En este caso, reacciones sucesivas del radical del azúcar llevan a una rotura del ADN, seguido a su vez de la liberación de la base intacta o del azúcar modificado. Los mucopolisacáridos, como el ácido hialurónico, pueden ser despolimerizados por el ataque de RL/ERO en el fluido sinovial (lo que justificaría la artritis) y también los proteoglicanos pueden sufrir daños oxidativos similares.

Algunos aminoácidos sufren modificaciones oxidativas directas que pueden alterar su papel fisiológico después de la interacción con RL/ERO. Las modificaciones que tienen lugar pueden ser reversibles (por ejemplo, la óxido-reducción de los grupos tioles), o bien irreversibles (por ejemplo, la rotura del anillo de histidina o triptófano).

La oxidación del colesterol es de particular interés biológico, puesto que se producen hidroperóxidos de colesterol y una familia de oxisteroles oxidados sobre el anillo β del esterol, y derivados del colesterol oxidado están implicados en la aterosclerosis y en la enfermedad cardiovascular. Ha sido también postulado, que la presencia de oxisteroles en la sangre puede ser el resultado de un eficaz mecanismo antioxidante in vivo. Dicho sistema se basa en la posible interacción a nivel de la sangre y diversos tejidos de diferentes elementos oxidantes con colesterol, y los derivados oxidados del mismo serían excretados vía biliar fecal.

2.5.2.- Proteínas

Los radicales libres son capaces de atacar residuos aminoacídicos de proteínas, dando lugar a entrecruzamientos catalíticos, cambios en la conformación y pérdida de funciones (*Winrow, V.R. et al, 1993*). Este daño es rápidamente eliminado por proteasas, evitando la acumulación de proteínas dañadas, existiendo un fino balance entre daño y reparación.

El ataque de radicales libres a proteínas podría ser clasificado en dos categorías (*Litarru, G.P., 1994*):

- a) Ataques difusos, dando lugar a modificaciones generalizadas.

- b) Ataques selectivos, dando lugar a modificaciones en sitios específicos.

En las primeras modificaciones se producen ataques en diferentes regiones de la estructura proteica, dando lugar a alteraciones estructurales, agregaciones intra e intercatenarias, fragmentación y/o desnaturalización. Este daño es comúnmente observado como consecuencia de exposiciones a radiaciones ionizantes, ozono o como consecuencia secundaria de cadenas de propagación de radicales libres, entre las que destaca la lipoperoxidación y especialmente la producción de entrecruzamiento catalítico por parte del malondialdehído (**Figura 7**) (*Gillery, P. et al, 1991*).

Las modificaciones específicas, son extremadamente selectivas, siendo los aminoácidos lisina, histidina, arginina y prolina los más frecuentemente atacados (*Litarru, G.P., 1994*). En este tipo de daño oxidativo juega un papel importante los metales de transición, siendo los enzimas que contienen metales de transición los que aparentemente presentan mayor riesgo de sufrirlas (*Stadtman, E. R., 1990*). Estas modificaciones son normalmente llamadas "oxidaciones catalizadas por metales" y casi siempre implican cambios covalentes, siendo estas proteínas las más susceptibles a la acción proteolítica de proteasas intracelulares específicas .

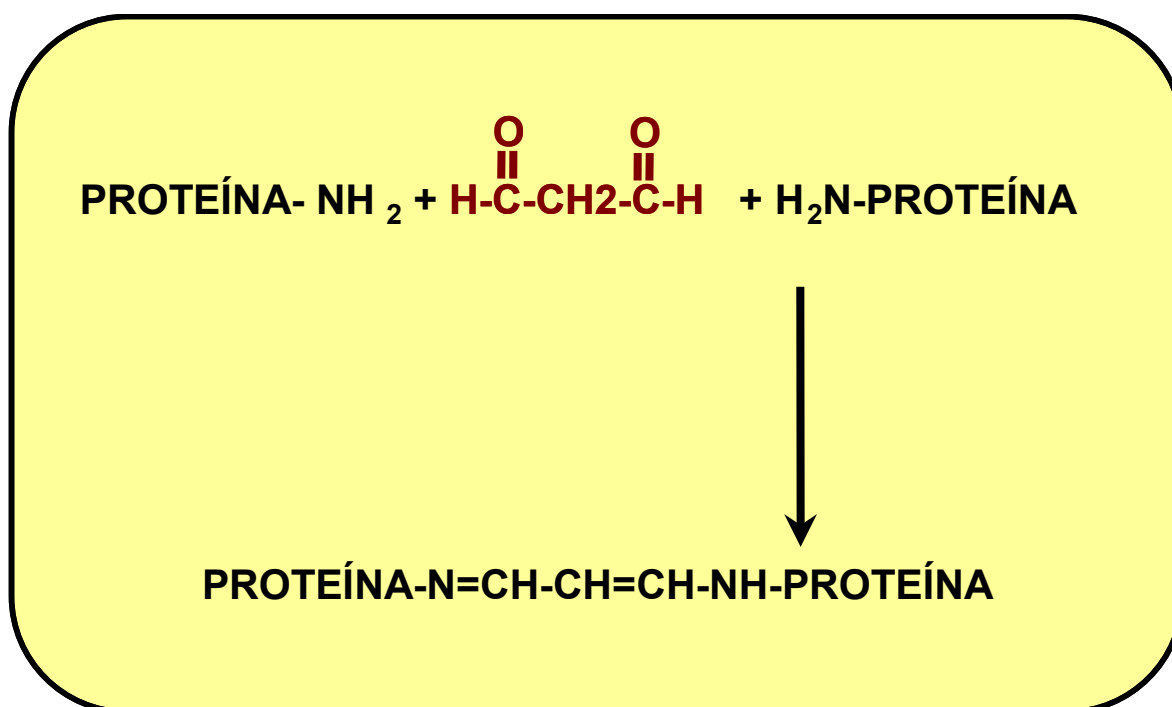


Figura 7.- Alteración proteica por efecto de los radicales libres

Estos ataques oxidativos a proteínas dan lugar, entre otras consecuencias, a alteraciones en la permeabilidad de las células de diferentes tejidos. Así, en células miocárdicas se ha observado una disminución en la permeabilidad al Na^+ y Ca^{2+} y un incremento en la salida de K^+ , como consecuencia de ataques oxidativos a ATPasas Na^+/K^+ e intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Ramón, J.R., 1993). También se han observado ataques a ATPasas dependientes de calcio, dando lugar a alteraciones de la homeostasis del calcio intracelular, pudiéndose producir daños a nivel del citoesqueleto y roturas de ADN y ARN (Orrenius, S. et al, 1989).

Numerosos estudios han mostrado el daño producido por sistemas generadores de radicales libres a gran variedad de proteínas celulares y plasmáticas, por ejemplo en procesos inflamatorios se ha observado el daño a inmoglobulinas G (IgG), dando lugar a IgG alteradas (Lunec, J. et al, 1986; Griffiths, H.R. y Lunec, J, 1989) y a la antiproteasa alfa-1-antitripsina como consecuencia de la oxidación de residuos de metionina (Carp, H. et al, 1982).

2.5.3.- Ácidos nucleicos

Las alteraciones del ADN, como molécula portadora del material genético, merece una atención muy especial, siendo importante conocer las consecuencias de la interacción del ADN con el estrés oxidativo. Así, en patologías en las que el estrés oxidativo es elevado, tales como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, esclerodermia, cáncer, hipertensión arterial, envejecimiento, etc., se observa un mayor nivel de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas, pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de determinadas cromosomas, como es el caso del X en ciertos casos de envejecimiento en mujeres (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996).

Las alteraciones de ADN que más frecuentemente se observan en situaciones de estrés oxidativo son incremento en los niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en la bases púricas y pirimídicas.

El papel del oxígeno en la mutagenicidad del ADN en bacterias fue demostrada hace casi treinta años (Fenn, W.O. et al, 1957). Hoy en día, se ha demostrado la interacción de los radicales libres del oxígeno con el ADN, bien directamente como en el caso del radical hidroxilo o bien indirectamente como es el caso del H_2O_2 y O_2^- en presencia de metales de transición y como consecuencia de la formación de radical hidroxilo, siendo el H_2O_2 altamente peligroso por su capacidad para atravesar membranas y producir OH^\cdot (Nassi-Caló, L. et al, 1989; Breimer, L.H., 1990).

Otro daño indirecto sobre el ADN por parte de los radicales libres, es el producido mediante endonucleasas calcio dependientes, cuya actividad se incrementa como consecuencia de un aumento de Ca^{2+} intracelular (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996).

Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas, destaca la formación del 8-hidroxiguanina, con un alto efecto mutagénico y responsable de que durante la replicación se empareje con la adenina en vez de la citosina. Respecto a las bases pirimídicas, se encuentran los glicoles de timina y citosina y los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a fragmentación ya que las bases afectadas no pueden emparejarse correctamente (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996). Igualmente, pequeñas proporciones de

OH[·] pueden interactuar con los azúcares componentes del ADN, dando lugar a la formación de radicales de azúcares (*Dizdaroglu, M., 1993*).

El NO, también puede dar lugar a reacciones de desaminación y despurinización, mediante el N₂O₃ formado en la interacción de NO, oxígeno y O₂⁻. También se ha observado entrecruzamientos producidos por la interacción del malondialdehído (MDA) con los grupos aminos del ADN (*Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996*).

En los procesos de excitación fotoquímica, como sucede en la exposición a radiaciones UV, el oxígeno molecular da lugar a la formación de anión superóxido y conjuntamente a la formación de oxígeno singlete, interactuando este último directamente con el ADN, aumentando el daño directo que produce el radical hidroxilo.

El ADN mitocondrial, por su localización en el entorno de la cadena de transporte de electrones, principal fuente de especies reactivas del oxígeno, presenta una mayor tasa de fragmentaciones y mutaciones por modificaciones oxidativas de sus bases, por ejemplo la presencia de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina es 16 veces superior a la encontrada para el ADN nuclear (*Ritcher, C. et al, 1988*), siendo esta mayor tasa de mutación muy importante en los procesos de envejecimiento.

2.5.4.- Ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) existen como ácidos libres (ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, etc.), como tioésteres (Acil Co A) y como ésteres (fosfo y esfingolípidos, ésteres del colesterol, triglicéridos). La oxidación de PUFAS se conoce como peroxidación lipídica, siendo especialmente importante la que ocurre a nivel de los contenidos en los fosfolípidos de las membranas celulares (o de lipoproteínas). Este fenómeno oxidativo es la expresión más conocida de la toxicidad de RL/ERO. El que los fosfolípidos sean componentes básicos de todas las membranas celulares, resalta la importancia del citado proceso oxidativo. Además este hecho explica, en gran medida, las

alteraciones estructurales y funcionales en las que están implicados RL y ERO en numerosas enfermedades.

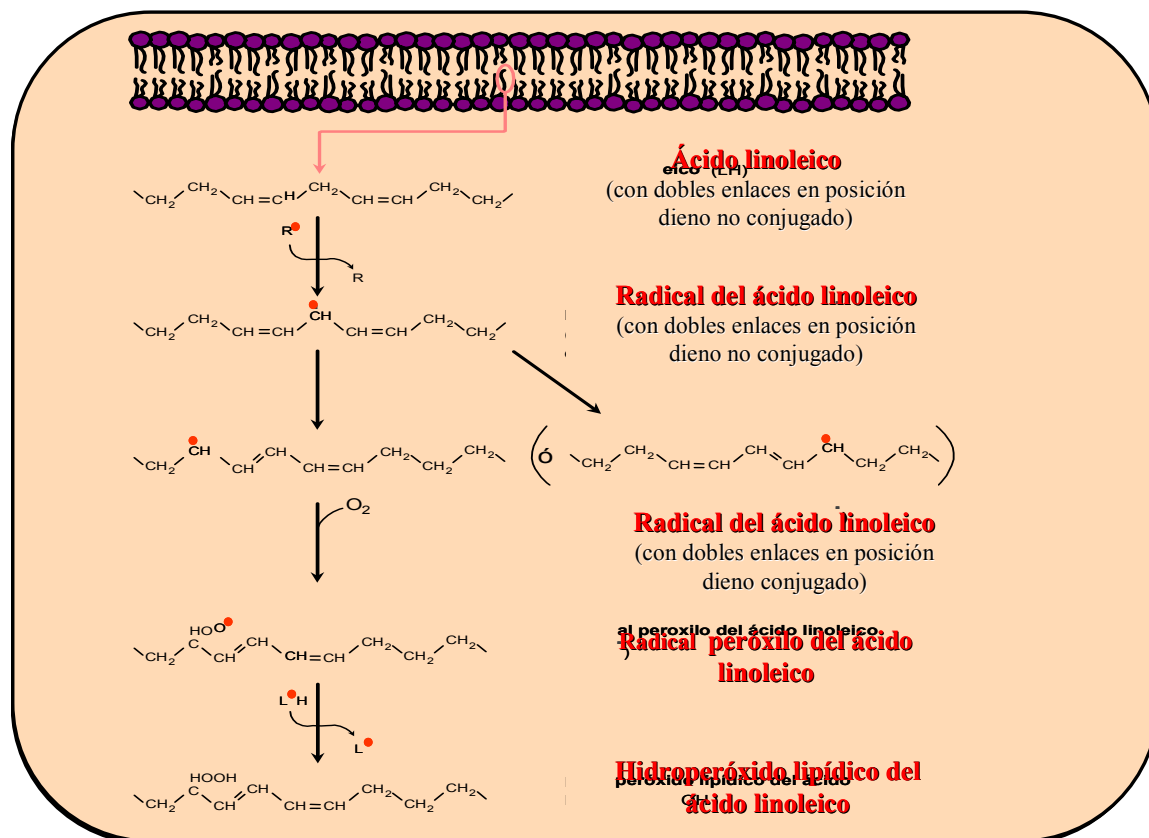


Figura 8.- Peroxidación lipídica del ácido linoleico de membrana biológica

En la **Figura 8** se muestra esquemáticamente la peroxidación lipídica que puede sucederle al ácido graso poliinsaturado linoleico de un fosfolípido de membrana. Los PUFAS naturales poseen dobles enlaces C=C de tipo cis. Cada doble enlace está separado del sucesivo por un CH₂ alílico, lo que le hace particularmente susceptible al ataque de los RL. En efecto, un RL con suficiente energía puede fácilmente abstraer un átomo de hidrógeno del carbono metilénico alílico de un PUFA (LH) iniciando así una reacción en cadena en la masa lipídica. Como consecuencia, el lípido se transforma en un radical centrado en un carbono(L); esto se acompaña de una reordenación de los enlaces que se estabilizan gracias a la formación de dienos conjugados. L[•] reacciona rápidamente con O₂, formando un peroxi-radical lipídico (LO₂[•]) que puede a su vez abstraer un átomo de H₂ de otro PUFA dejando un radical sobre el carbono y un hidroperóxido lipídico (LOOH).

La cadena de reacciones de los RL consiste en tres etapas esenciales: Inicio, propagación y terminación (**Figura 3**). La propagación continúa hasta que dos RL se unen para terminar la cadena. Por tanto, un único evento de iniciación puede provocar la conversión de numerosas cadenas de PUFA en hidroperóxidos lipídicos. Así, un único evento inicial que desencadene la peroxidación lipídica puede ser amplificado hasta que se agote la disponibilidad de O_2 y de cadenas de PUFA no oxidadas. Por otra parte, la duración y la velocidad de la cadena de peroxidación dependen directamente del grado de insaturación lipídica. Para una serie de ácidos grasos insaturados de uno a seis dobles enlaces, esta velocidad aumenta según la relación 0,025: 1:2:4:6:8 (más de 300 veces del primero al último: ácidos oleico, linoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico).

La peroxidación lipídica da origen a numerosos productos (muchos de ellos biológicamente activos y citotóxicos), que pueden dividirse en tres categorías principales:

a.- Productos de rotura de la cadena

b.- Productos formados de la reordenación del LOOH, o reordenación y sucesivas oxidaciones (hidroperóxidos, epidióxidos, dihidroperóxidos, endoperóxidos bicíclicos y compuestos mono, di-, tri-, ceto- y epoxi-hidróxidos).

c.- Productos de oxidación de alto peso molecular por reacciones de polimerización que provocan enlace eter-peroxi- y C-C cruzados en la molécula de lípido peroxidado.

En la primera categoría (a), se encuentran sustancias que se obtienen de la rotura de dobles enlaces C-C adyacentes a un grupo hidroperóxido, por lo que es posible identificar tres clases de moléculas importantes:

- Alcanales, como por ejemplo malondialdehído (MDA), que a través de la reacción con tioles proteicos y/o enlaces con grupos amino de las proteínas, pueden causar un considerable daño intracelular.

- Alquenes, como por ejemplo 4-hidroxi-nonenal (HNE) y 4-hidroxi-xenal. A diferencia de los radicales, estos son productos con una vida media más bien larga. Los alquenes, junto con los alcanales, pueden difundir del lugar de origen a la

membrana o a la lipoproteína, modificando su integridad estructural y funcional, su fluidez y su permeabilidad. HNE puede alterar la estructura de la apo B de la lipoproteína a través de modificaciones de sus residuos ϵ -lisínicos. Puesto que estos sucesos tienen lugar en la zona interna de la membrana biológica, se pueden ver afectados todos los fenómenos de la señal celular y el flujo iónico. También se pueden alterar propiedades apolipoproteicas, modificando las características inmunológicas. Incluso en el caso en que se formen junto a los ácidos nucleicos, pueden alterar la secuencia del mensaje y/o la estructura molecular del ADN/ARN, provocando así un daño todavía mayor en los mecanismos genéticos y/o en la biosíntesis proteica.

- Alcanos, como por ejemplo, pentano y etano, que son los productos terminales de la oxidación de los PUFAS. Estos compuestos se utilizan en el laboratorio para ver el grado de daño de esos ácidos grasos.

Conviene destacar que el daño celular que representan los peróxidos formados a nivel endógeno, también se puede producir a través de lípidos peroxidados provenientes de la dieta que se incorporan como tales en la estructura celular. De ahí que la manipulación de aceites comestibles sea un hecho a tener en cuenta.

3.- FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ENVEJECIMIENTO

3.1.- La pérdida de capacidad energética como causa del envejecimiento

En un apartado previo se ha hablado de la diferencia entre periodo vital y envejecimiento, conceptos ambos que quedan recogidos en la doble pregunta:

¿ Porque vivimos un determinado tiempo?

¿ Porque envejecemos?

Con respecto a la primera cuestión, el periodo vital esta realmente determinado por el genoma, pero no por genes en concreto a modo de un reloj biológico, sino por un genoma

global, resultado de la evolución de una especie, que garantiza la sobrevivencia de la misma. Así pues, el periodo vital depende de la máxima capacidad fisiológica que la especie posee en el momento de la maduración sexual, y que corregida a través de la selección natural, permite que esta especie se propague (se reproduzca) y sea independiente, permitiendo como se ha dicho su sobrevivencia.

Lo que codifica el genoma es esa máxima capacidad fisiológica que tiene su expresión fenotípica en el periodo vital. Más aún, es posible que desde una perspectiva teleológica, lo que hace el genoma, es gobernar la integridad molecular desde la concepción hasta el final de la época reproductora, pero puede ser incapaz de mantener indefinidamente la fidelidad molecular. Después de la fase reproductora la energía disponible para mantener el ordenamiento celular disminuye, de modo que la sobrevivencia continuada se determina solo indirectamente por el genoma.

Es en esta segunda fase, cuando se entiende el envejecimiento. Este es un proceso no regulado genéticamente, estocástico (al azar), que ocurre después de la maduración y sucede por una reducción en la energía disponible que permite mantener la fidelidad molecular.

Así pues, el genoma humano se ha configurado para alcanzar un periodo vital, de una duración que permita nuestra sobrevivencia. El que se llegue o no a la duración máxima depende del envejecimiento, o del grado de envejecimiento de cada persona. La falta de regulación génica del envejecimiento, se entiende cuando se comprueba la heterogeneidad del mismo a nivel individual. Los individuos no envejecen a la misma velocidad, ni los cambios que se observan con la edad son idénticos.

Naturalmente, el que no haya una regulación génica, no quiere decir que no haya una influencia génica en el envejecimiento.

La casualidad en el envejecimiento

El desorden molecular que caracteriza el envejecimiento, puede ser debido a diversas causas, pero puede que tenga una importancia especial el daño o estrés oxidativo.

Hace ya un siglo que se formula la hipótesis de la velocidad de vivir ("*The rate of living*"), que propone que la velocidad metabólica de una especie determina en última instancia su expectativa de vida.

El eslabón entre metabolismo y envejecimiento lo estableció Denham Harman en los años 50, postulando la teoría de los RL como agresores celulares o **teoría de los radicales libres del envejecimiento**. A mayor velocidad metabólica, más RL, más precoz es el envejecimiento.

Aunque la hipótesis de la velocidad metabólica como condicionante del periodo vital, ha sido discutida, dado que aves y primates sobre todo tienden a vivir más tiempo que el predicho en función de su velocidad metabólica, no hay que olvidar que esto puede entenderse porque las mitocondrias de esos animales producen menos RL (ROS), o puede incluso porque tengan mejores sistemas antioxidantes o mejores sistemas de reparación celular.

3.2.- **Mitocondria: Estructura y función**

3.2.1.- Visión general de la obtención de la energía celular

Las mitocondrias son las estructuras celulares encargadas de obtener la mayor parte de la energía celular en forma de adenosin trifosfato (ATP), energía proveniente de la contenida en los enlaces químicos de los macronutrientes.

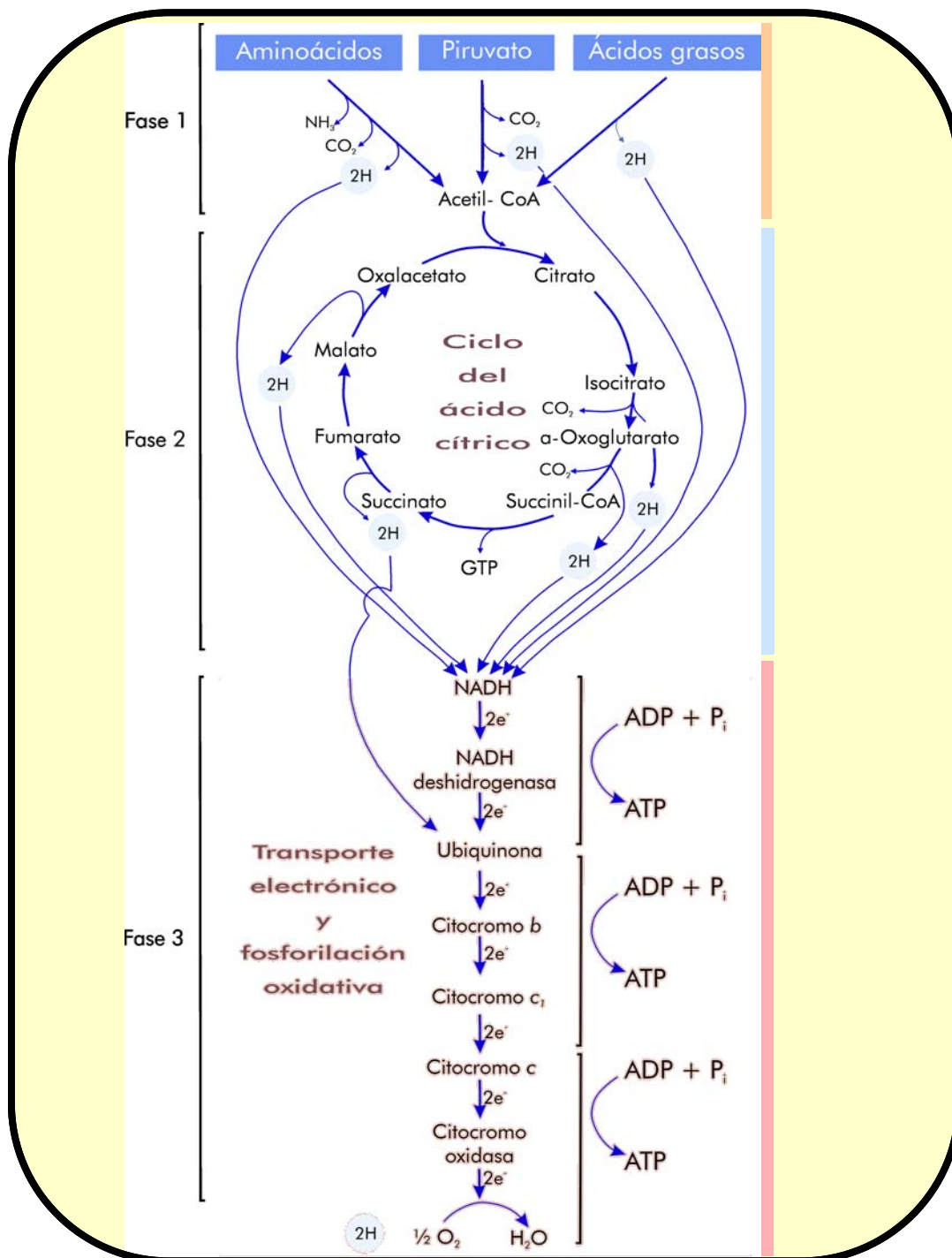


Figura 9.- Vías degradativas generales de los macronutrientes

Los citados macronutrientes sufren procesos de degradación, muchos de cuyos pasos son reacciones de oxido-reducción. En la **Figura 9** se muestra el esquema general en el que después de vías degradativas específicas para cada macronutriente, los productos resultantes de las mismas acaban convergiendo en el conocido ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. Los hidrógenos procedentes de la reducción de determinados compuestos de estas vías son "conducidos" mediante deshidrogenasas a la llamada cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEmt), que como su nombre indica va a ser la encargada del transporte de electrones procedentes del hidrógeno, lo cual lleva consigo unas graduales liberaciones de energía que se utilizan para sintetizar ATP a partir de adenosin difosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi), mediante una reacción acoplada a la CTEmt, denominada fosforilación oxidativa.

Por otra parte, al final de la CTEmt el H^+ , e^- y el oxígeno molecular generan agua endógena.

Son muchas las reacciones enzimáticas y las vías metabólicas localizadas en los diferentes compartimentos mitocondriales, que contribuyen a la transferencia de los equivalentes de reducción, desde los sustratos oxidables, hasta la cadena de transporte de electrones. Las más importantes son las que se encargan de la β -oxidación de los ácidos grasos, oxidación del piruvato, el ciclo de Krebs, la glutamato deshidrogenasa y las reacciones implicadas en el metabolismo de los aminoácidos.

3.2.2.- Estructura mitocondrial

Estructuralmente tal y como se muestra en la **Figura 10**, la mitocondria está constituida por una doble membrana separando dos compartimentos

La membrana externa es lisa y algo elástica, con un 40% de lípidos y un 60% de proteínas, presentando más colesterol y fosfolípidos que la membrana interna. Esta membrana es permeable a moléculas de bajo peso molecular (no superior a 10000 dalton).

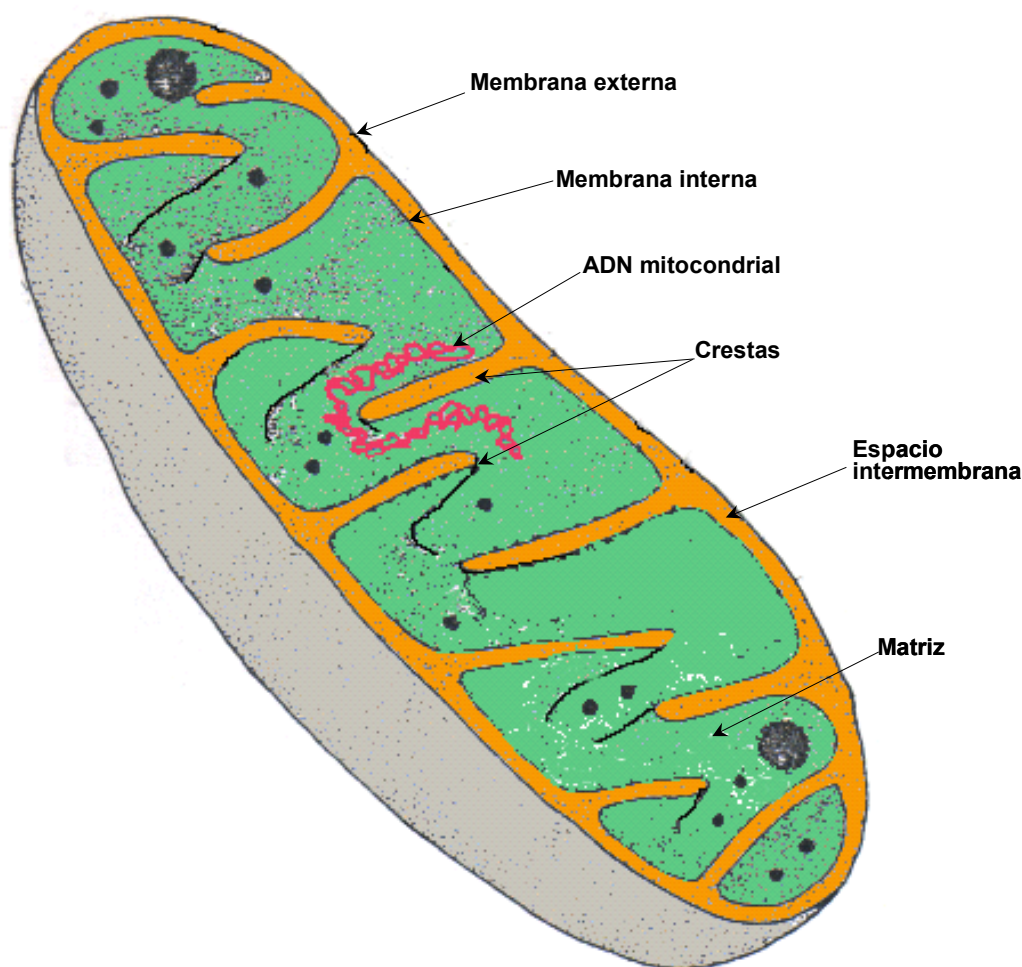


Figura 10 .- Estructura mitocondrial

La membrana interna, presenta una serie de pliegues (crestas mitocondriales), las cuales son un recurso para aumentar el área superficial de esta membrana en relación con el volumen mitocondrial y cuyo número está en relación con la intensidad respiratoria del tejido. La membrana interna está constituida por un 20% de lípidos y un 80% proteínas (a diferencia de otras membranas biológicas donde la proteína no llega al 50%), siendo muy rica en cardiolipina, que puede encontrarse presente en la membrana en forma de sal o de complejo de quelación con diferentes cationes, esencialmente Ca^{2+} y Mg^{2+} (*de Teresa, C., 1995*). Presenta poco colesterol y es muy rica en ácidos grasos no saturados lo que explica su baja viscosidad . Es impermeable a los iones.

Los diferentes fosfolípidos mencionados son importantes desde un punto de vista funcional y estructural y van a adquirir relevancia en el contexto de la presente memoria, por

su riqueza en ácidos grasos insaturados capaces de sufrir la peroxidación lipídica, junto al hecho de que su contenido va a relacionarse en mayor o menor grado con el tipo de ácidos grasos alimentarios.

La estructura se completa con un espacio intermembrana, localizado entre ambas membranas y una matriz, rodeada por la membrana interna. La matriz mitocondrial es una fase gelatinosa, donde tiene lugar el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbónicos.

La mitocondria dado su papel clave en la generación de la energía celular, muestra una gran riqueza enzimática, fundamentalmente de vías oxidativas, biosintéticas, de transporte y los necesarios para la expresión del genoma mitocondrial, destacando de un modo especial las que se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3 .- Enzimas presentes en distintas zonas mitocondriales

MEMBRANA EXTERNA	NADH-citocromo b ₆ reductasa	Monoamino oxidasa	Citocromo b ₅
	Quinurenina hidroxilasa	A. fosfatídico fosfatasa	Lisofosfatidil acil transferasa
	Glicerol fosfato acil transferasa	Nucleosido difosfoquinasa	Elongasa de los ácidos grasos
	Fosfolipasa A		
ESPACIO INTERMEMBRANA	Adelinato quinasa (miocinasa)	Nucleósido difosfoquinasa	
	Nucleósido monofosfoquinasa		
MEMBRANA INTERNA	NADH-coenzima Q reductasa	Succinato-coenzima Q reductasa	
	Ubiquinol-citocromo c reductasa	Citocromo c oxidasa	
	β-hidroxibutirato deshidrogenasa	Piridin nucleotido transhidrogenasa	
	Carnitina acil transferasa	Ferroquelatasa	
	ATP sintetasa	ATP translocasa	
MATRIZ	Piruvato deshidrogenasa	Aspartato aminotransferasa	ARN polimerasa
	α-cetoglutarato deshidrogenasa	Ornitina Carbamiltransferasa	ADN polimerasa
	Citrato sintasa	Carbamil fosfato sintetasa	
	Aconitasa	Acil-CoA sintetasa	
	Isocitrato deshidrogenasa (NAD)	Acil-CoA deshidrogenasa	
	Isocitrato deshidrogenasa (NADP)	Enoil hidrasa	
	Fumarasa	β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	
	Glutamato deshidrogenasa	β-cetoacil-CoA tiolasa	
	Piruvato carboxilasa	Enzima activadora de los aminoácidos	

3.2.3.- La cadena de transporte mitocondrial y la fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa es un proceso mediante el cual la disminución de energía libre que acompaña a la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, se acopla a un desplazamiento vectorial de protones desde la matriz al espacio exterior de la membrana interna. Gracias a este desplazamiento vectorial y a que la membrana interna es impermeable a los protones se crea un gradiente electroquímico entre el exterior y el interior de la mitocondria, cuya energía o fuerza protón-motriz permite la síntesis de ATP mediante la ATP sintetasa.

El mecanismo mitocondrial para el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se compone principalmente de cinco sistemas enzimáticos lipoproteicos, localizados en la bicapa lipídica de la membrana interna y con valores crecientes de potencial redox, lo que permite una liberación de energía gradual desde los equivalentes de reducción hacia el oxígeno. La transferencia de electrones entre los complejos esta garantizada por dos moléculas de gran movilidad, la ubiquinona y el citocromo C.

Los complejos enzimáticos son los siguientes (**Figura 11**):

- * Complejo I.- NADH-ubiquinona oxidoreductasa
- * Complejo II.- Succinato-ubiquinona oxidoreductasa
- * Complejo III.- Ubiquinol-citocromo C oxidoreductasa
- * Complejo IV.- Citocromo C-oxígeno oxidoreductasa o citocromo c oxidasa

De los aproximadamente 60 polipéptidos que constituyen estos complejos, trece son codificados por el ADN mitocondrial; siete del complejo I, uno del complejo II, tres del complejo III y dos del complejo V.

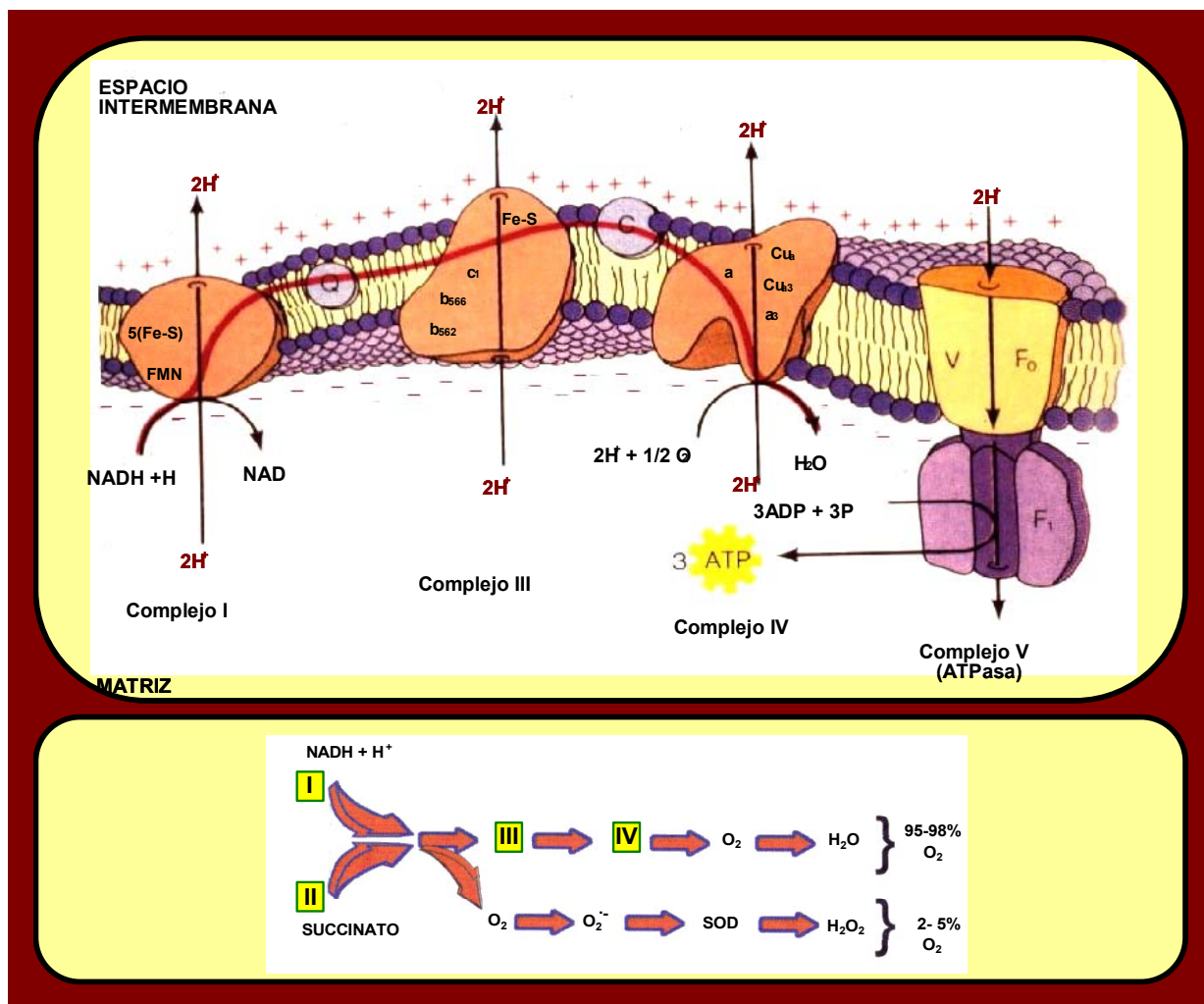


Figura 11 .- Componentes de la cadena de transporte de electrones y ATP sintetasa

Los transportadores de electrones son estructuras quinónicas (FMN, FAD, coenzima Q) y complejos metálicos de transición (centros Fe-S, grupos hemo y proteínas con centro de Cu).

Como se observa en la **Figura 12**, en la cadena de transporte de electrones hay tres puntos, a nivel de los complejos I, III, y IV, en los que se produce descensos relativamente grandes de energía libre, teniendo lugar el desplazamiento vectorial de protones que aportan la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP.

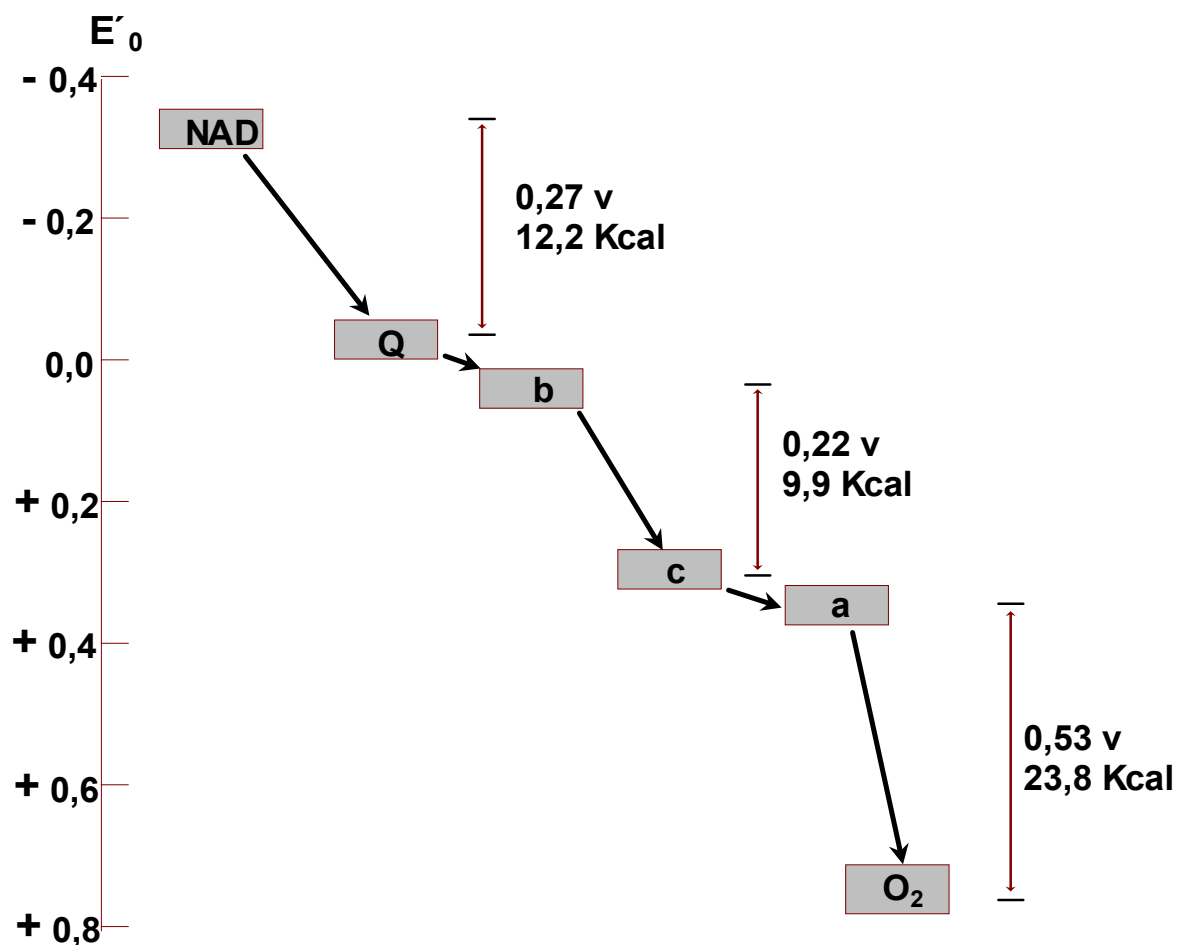


Figura 12.- Liberación de energía en la cadena de transporte electrónico mitocondrial

A partir de la etapa de transferencia de electrones del citocromo $a+a_3$ al oxígeno, el proceso se hace irreversible, inclinándose así el sistema hacia la síntesis de ATP (*Battino, M., 1989; Benzi, G., 1992*).

a.- NADH: ubiquinona reductasa (Complejo I)

Este primer complejo es el más grande de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, siendo el encargado de transferir electrones del NADH al coenzima Q, es decir, cataliza la reducción, sensible a la rotenona, de los homólogos de ubiquinona a partir del NADH. Acoplada a dicha transferencia de electrones, tiene lugar una translocación vectorial de protones (H^+) desde la matriz al espacio intermembrana.

El complejo presenta un peso molecular de unos 117×10^4 daltons y fue aislado por primera vez en 1961 por Hatefi et. al. en mitocondrias de corazón bovino (*Hatefi, Y. et al, 1961; Hatefi, Y. et al, 1963*). Se encuentra constituido por cerca de 41 polipéptidos y varios componentes no proteicos como FMN, hierro no hémico, azufre ácido-lábil, CoQ y fosfolípidos (*Ragan, C.I. et al, 1982; Walker, J.S., 1992; Arizmendi, J.M. et al, 1992*).

Los polipéptidos componentes de este complejo se pueden dividir en dos dominios, un dominio extrínseco y predominantemente hidrofílico y un dominio, insertado en la membrana, hidrofóbico. Esta distribución parece estar relacionada con la codificación de los distintos componentes por el ADN mitocondrial y el ADN nuclear. Así se ha observado que todos los componentes codificados por el ADN mitocondrial se encuentran en el dominio hidrofóbico (*Chomyn, A. et al, 1986; Friedrich, T., 1989*).

En los componentes hidrofílicos o hidrosolubles nos encontramos dos grupos o fracciones:

- La fracción hidrosoluble flavoproteica (FP), constituida por tres subunidades.

- La fracción hidrosoluble proteica (IP), constituida por 9 polipéptidos o subunidades.

La fracción FP, consiste en una NADH deshidrogenasa-flavin dependiente, que contiene FMN y presenta una notable especificidad por la quinona y el complejo férrico (análogo de la ubiquinona y el citocromo c) como aceptores electrónicos. Conjuntamente a esta NADH deshidrogenasa, el complejo I presenta 5 grupos Fe-S binucleares y 3 tetranucleares.

El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde la NADH a los homólogos ubiquinónicos y al ferrocianuro (como aceptor artificial de electrones), acoplándose a la reducción del coenzima Q, pero no a la del ferrocianuro, una translocación vectorial protónica. La transferencia de electrones es inhibida por rotenona, piericidina A, barbitúricos y mercuriales.

Hoy en día, no está clarificado totalmente el mecanismo de actuación de este complejo, quedando numerosos interrogantes, entre los que se encuentra la estequiometría H^+/e^- de la translocación protónica asociada a la transferencia de electrones y que según algunos autores podría ser de 1, 1.5 e incluso 2, dependiendo del modelo de transferencia de electrones que se siga. En los diversos modelos de transferencia de electrones entre los componentes del complejo I, se alternan las posiciones de los grupos Fe-S, FMN y del coenzima Q, modificándose así la estequiometría H^+/e^- (Ragan, C.I., 1990).

b.- Succinato: ubiquinona oxidoreductasa (complejo II)

Se trata del complejo más simple de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Es el encargado de catalizar la transferencia de electrones desde el succinato a la ubiquinona (Hatefi, Y. et al, 1963) y se encuentra ubicado en la cara de la membrana interna mitocondrial que da a la matriz.

El complejo II de mamíferos presenta un peso molecular de unos 2×10^5 daltons, se encuentra constituido por cuatro subunidades proteicas codificadas por el ADN nuclear y contiene un grupo prostético FAD unido covalentemente, 3 centros Fe-S y un citocromo del tipo b, siendo estos compuestos los cromóforos de dicho complejo.

Los componentes del complejo II pueden dividirse en dos grandes fracciones: La enzima succinato deshidrogenasa (SDH) y los péptidos hidrofóbicos asociados con el citocromo b_{560} .

La SDH se encuentra constituida por dos subunidades hidrosolubles de 70 y 27 Kdaltons, contiene un FAD ligado covalentemente a la subunidad mayor. Esta unión covalente tiene la finalidad de aumentar el potencial redox estándar de la pareja FAD/FADH₂, acercándolo al de la pareja redox succinato/fumarato y facilitando así la actividad de la SDH (Davis, K.A. y Hatefi, Y., 1971; Nichols, D.G., 1982).

La composición aminoacídica de las dos subunidades de SDH, está altamente conservada entre especies (Schroder, I. et al, 1990).

El citocromo b del complejo II se diferencia de los encontrados en el citocromo III, no sólo por espectrofotometría, sino también en el origen. Así el citocromo b del complejo II se

sintetiza en los ribosomas citosólicos, mientras que los del complejo III están codificados por el ADN mitocondrial (*Weiss, H. Y Kolb, H.J., 1979*).

La actividad de la SDH es estable sólo cuando el enzima está ligado a la membrana, ya que la SDH aislada se deteriora rápidamente en condiciones aeróbicas (*Hatefi, Y. y Stiggall, D.L., 1976*).

c.- Ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa (complejo III)

Es el complejo encargado de transferir los electrones de la ubiquinona reducida (CoQH_2) o ubiquinol al citocromo c. Acoplada a esta transferencia tiene lugar una translocación vectorial de protones desde la matriz al espacio intermembrana.

El complejo presenta un peso molecular de 25 Kdaltons, está constituido por 9-10 polipéptidos, tres de los cuales se encuentran asociados al centro redox:

- Hemo de los citocromos b_{562} , b_{566} y c_1

- Grupo (2Fe-2S)

Además, aparecen dos especies de ubisemiquinonas presentes en diferentes zonas del complejo III (*Ohnisha, T. y Trunpower, B. L., 1980*).

El complejo III se trata de un dímero que se extiende a través de la membrana interna mitocondrial, proyectándose por ambos lados fuera de la membrana.

Como se ha comentado anteriormente, acoplada a la transferencia de electrones tiene lugar una translocación de protones con una estequiometría H^+/e^- igual a 2.

El mecanismo de actuación de este complejo no está del todo clarificado, existiendo dos posibles hipótesis, una propuesta por Mitchell y denominada “Ciclo Q” (*Mitchell, P., 1976; Monstantinov, A.A., 1990*) y otra propuesta por Wikstrom denominada “Ciclo b” (*Wikstrom, M. et al, 1981*).

En ambas hipótesis, el complejo III se puede considerar como una estructura con dos centros redox de alta potencia (proteína Fe-S y citocromo c_1), y dos de baja potencia (citocromo b_{562} y citocromo b_{566}). Así, el ubiquinol cede un electrón a los centros de alta potencia y uno a los centros de baja potencia.

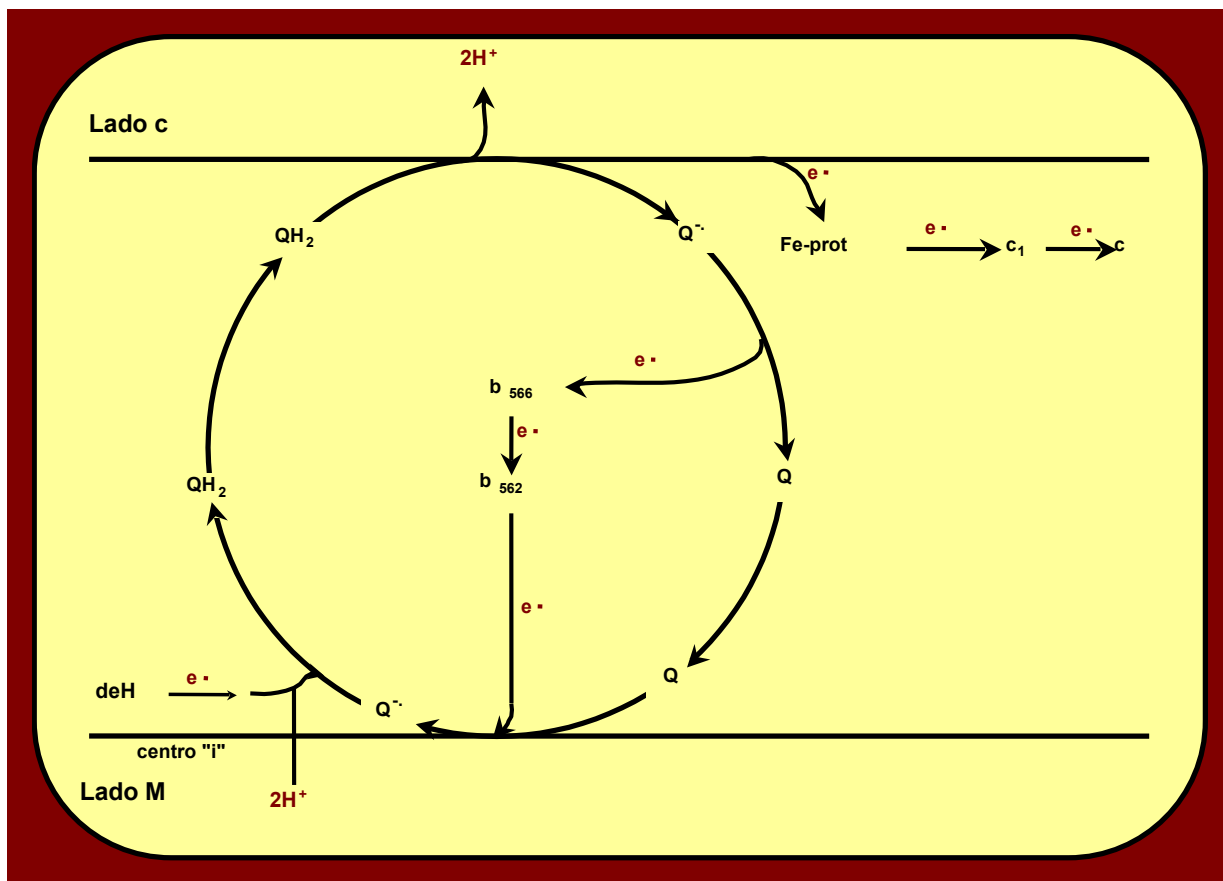


Figura 13.- Ciclo Q del coenzima Q

Según el “Ciclo Q” (**Figura 13**), el ubiquinol cede un electrón en un punto próximo al lado citoplasmático de la membrana (denominado centro “o”) al citocromo c, mediante la proteína Fe-S y el citocromo c_1 ; esto determina la liberación de dos protones al lado citoplasmático de la membrana mitocondrial interna y la formación de semiquinona, la cual debido a su gran inestabilidad, cede rápidamente su electrón a los centros redox de baja potencia. El ciclo se completa cuando la quinona, en el denominado centro “i”, situado próximo a la matriz, recibe un electrón del citocromo b, formando así una semiubiquinona que posteriormente es reducida a ubiquinol por la deshidrogenasa. Se tiene por tanto la transferencia escalar de un electrón del ubiquinol al citocromo c acompañado de la translocación vectorial de dos protones.

En el “Ciclo b” (*Figura 14*), por el contrario, la translocación protónica tiene lugar en los citocromos b, por un mecanismo de bomba protónica acoplado a reacciones de oxidoreducción.

Así, en el “Ciclo Q”, el transportador de protones es la ubiquinona y la estequiometría de la reacción es $2H^+/e^-$, mientras que en el “ciclo en b”, el transportador es la molécula transmembrana de citocromo b y la estequiometría puede variar teóricamente según los aspectos moleculares de este mecanismo de translación.

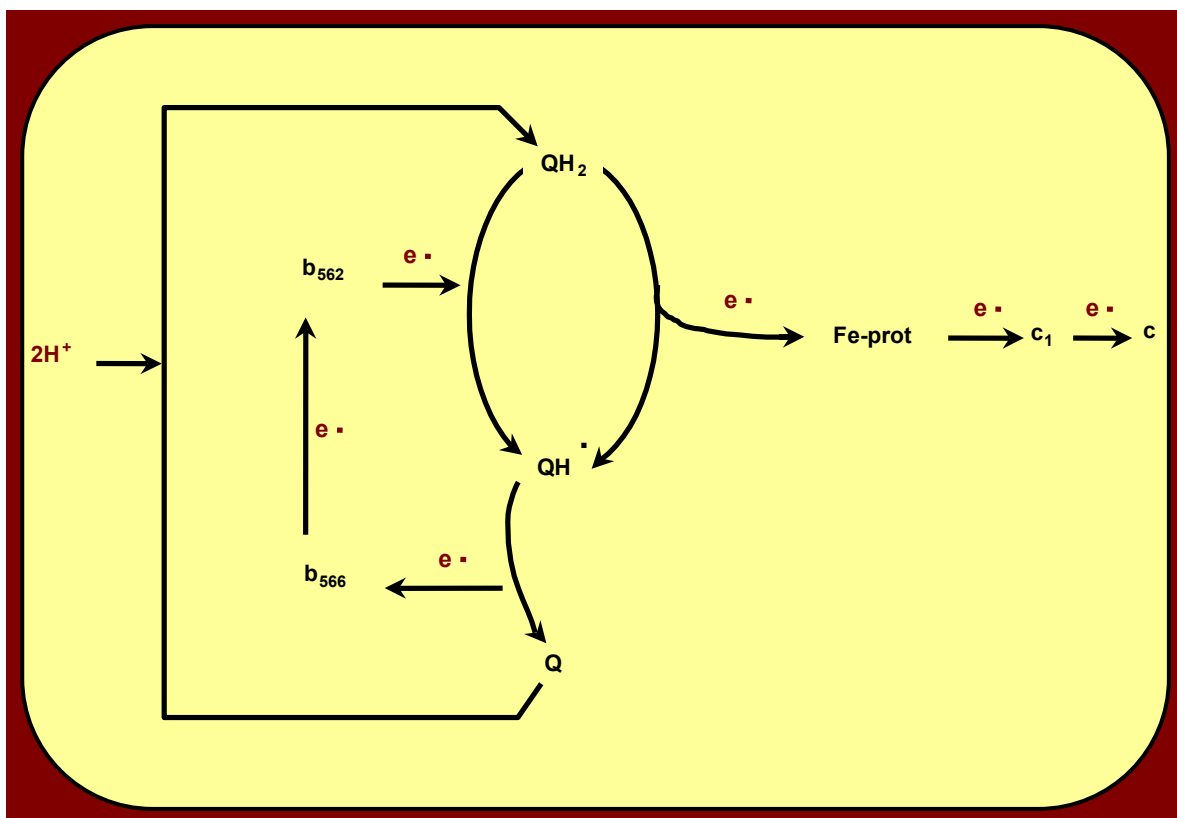


Figura 14.- Ciclo b del coenzima Q

d.- Ferrocitocromo c: oxígeno oxidoreductasa o citocromo oxidasa (Complejo IV)

Va a ser el complejo encargado de catalizar la etapa terminal de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, es decir, la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno molecular. Acoplada a esta transferencia de electrones, tiene lugar una translocación protónica. Es inhibido específicamente por el cianuro.

La citocromo oxidasa atraviesa la membrana interna mitocondrial, presentando una estructura en “Y” (*Figura 15*).

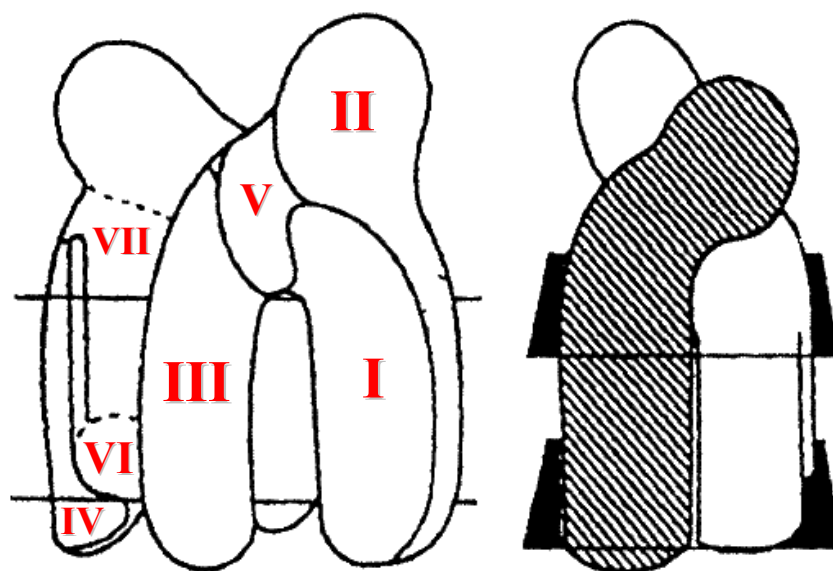


Figura 15
.-
Estructura en Y de la citocromo oxidasa

En
ma

míferos el complejo presenta 13 subunidades proteicas, con pesos moleculares que varían de 5000 a 56000 daltons. Las tres subunidades mayores (I, II y III), son codificadas por el ADN mitocondrial, e insertadas en la membrana por el lado de la matriz (*Tzagoloff, A. et al, 1979; Kadenbach, B. et al, 1983; Azzi, A. y Müller, M., 1990*).

El complejo IV, contiene como grupos protéticos dos hemos iguales (a y a_3), cada uno asociado a un átomo de cobre (Cu_a y Cu_{a3}). Estos dos hemos, están localizados en dos diferentes ambientes y orientados perpendicularmente al plano de la membrana interna. El hierro hemínico a (Fe_a), presenta seis uniones de coordinación y está unido axialmente al nitrógeno en dos imidazoles neutros (*Hatefi, Y., 1985*), el hemo a_3 , está unido en la posición axial a un nitrógeno imidazólico y al Cu_{a3} .

Los grupos prostéticos de la citocromo oxidasa, se hallan localizados en las subunidades I y II (*Ludwig, B. y Schatz, G., 1980*). En la subunidad III no aparecen centros metálicos, estando relacionada esta subunidad con la función de bomba protónica del enzima, ya que en experimentos realizados por Casey et. al. (*Casey, R.P. et al, 1979*), se observó que la dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) inhibía casi en un 80% la función de translocación

protónica por reacción con la subunidad III, esta función también se ha observado en estudios posteriores (*Malatesta, F. et al, 1983; Saraste, M. et al, 1981*).

La citocromo oxidasa estaría compuesta por dos centros redox con una diferencia de potencial de 0.1 V, siendo el primer centro el citocromo a-Cu_a que es el aceptor de electrones del ferrocitocromo c y el segundo centro el citocromo a₃-Cu_{a3}, encargado de reducir el oxígeno molecular.

La citocromo oxidasa tiene en cada monómero un sitio de alta afinidad y uno de baja afinidad para su unión al citocromo c.

Un mecanismo propuesto para explicar la reducción del oxígeno, prevé la captación de electrones con la formación de tres compuestos intermediarios: el intermediario I, se forma por la adquisición de dos electrones por el oxígeno molecular con reducción a peróxido; el intermediario II, se constituye por la adquisición de un tercer electrón que rompe la unión oxígeno-oxígeno, con la consecuente reducción del primer átomo de oxígeno con formación de agua; el intermediario III, se debe a la adquisición de un cuarto electrón que reduce completamente el segundo átomo de oxígeno, terminándose así la reducción tetraelectrónica del oxígeno molecular (*Capaldi, R.A., 1990*).

La estequiometría H⁺/e⁻ tiene valores comprendidos entre uno y dos (*Wikstrom, M. y Krab, 1979*).

e.- Citocromo c

El citocromo c es la única proteína de la cadena respiratoria extremadamente hidrófila y por ello fácilmente extraíble de la membrana mitocondrial, propiedad que ha permitido su purificación y cristalización.

Presenta una única cadena polipeptídica de 104 aminoácidos, con un grupo prostético hierro-protoporfirina IX, unido covalentemente a la cadena polipeptídica por enlaces tioester (*Figura 16*).

La posiciones de coordinación del hierro, V y VI, se encargan de la unión con el nitrógeno imidazólico de la histidina 18 y con el azufre de la metionina 80, obligando así al

hemo a adoptar una conformación planar tanto en el estado oxidado como en el reducido (Battino, M., 1989; Quiles, J.L., 1995).

La superficie de la molécula está densamente cargada, con distintas áreas en las que los residuos catiónicos, en particular los de la lisina, son responsables de la interacción con el citocromo c_1 y $a + a_3$ en el funcionamiento normal de la cadena respiratoria.

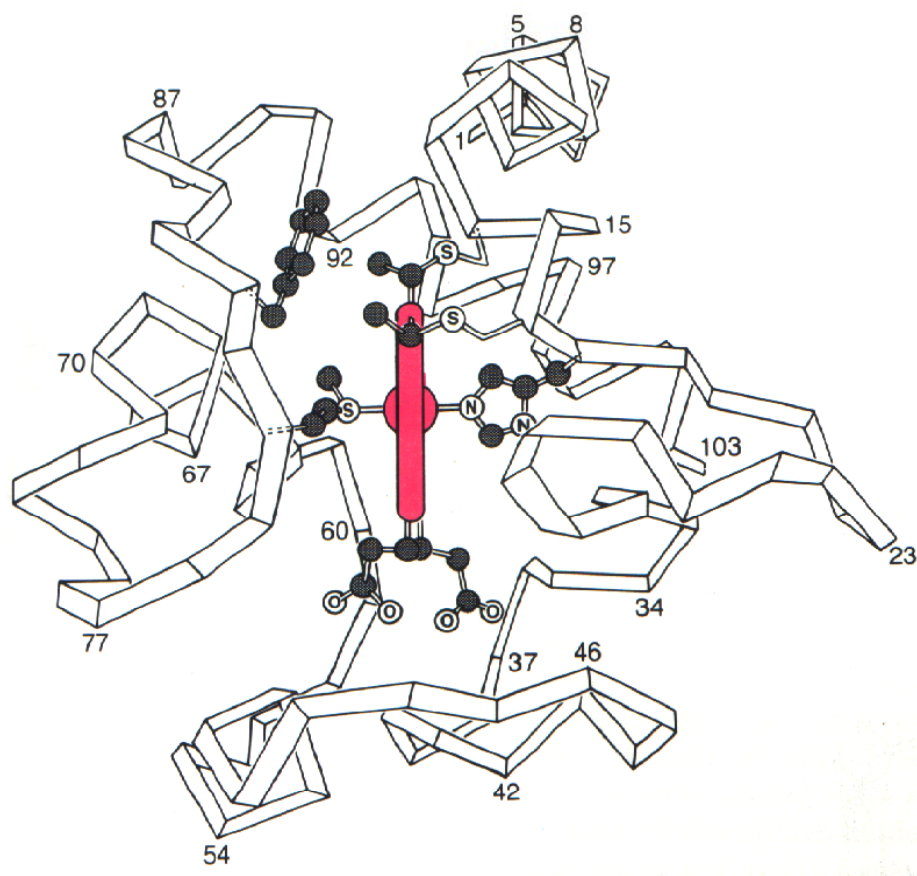


Figura 16.- Estructura del citocromo C

El hierro del citocromo c pasa reversiblemente de la forma ferrosa a la férrica, haciendo posible la transferencia de electrones. La carga del hierro en el estado oxidado del citocromo c parece localizarse en el átomo de azufre de la metionina 80 y se estabiliza gracias a la interacción del azufre y la carga de los aminoácidos adyacentes. La llegada de un electrón desestabilizaría este equilibrio y facilitaría la reducción del hemo.

f.- Coenzima Q

El coenzima Q o ubiquinona (2,3 dimetoxi-5-metil-6-poliprenil benzoquinona), es una benzoquinona que presenta en la posición 6 una cadena lateral constituida por un número variable (de 1 a 15) de unidades isoprenoides. Fue descubierta independientemente por Crane, en 1954, en los Estados Unidos y por Norton en Inglaterra (*Crane, F.L. et al, 1957*).

Las quinonas son dicetonas con estructura $\text{O}=\text{C}-(\text{C}=\text{C})_n-\text{C}=\text{O}$ derivadas de componentes aromáticos. Sus grupos carbonilo se pueden encontrar en el mismo anillo o anillos separados, y su actividad electrófila determina la mayor parte de las propiedades oxidorreductoras de las quinonas.

Las quinonas representan la clase más amplia de compuestos quinónicos y están ampliamente difundidas en la naturaleza, encontrándose de hecho, como componentes de diversos sistemas biológicos.

Las quinonas metabólicamente importantes presentan una cadena lateral terpénica (ubiquinona, plastoquinona, vitamina K), que les permite localizarse en la fase lipídica de la membrana.

En los mamíferos, a excepción de los roedores que presentan CoQ₉, la ubiquinona presente es el CoQ₁₀ (*Ramasarma, T., 1985*), es decir, la quinona dotada de 10 unidades isoprenoides en su cadena lateral.

Su función en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, es la de transferirlos desde todos los complejos tipo DH (NADH:CoQ reductasa, Succinato:CoQ reductasa, colina DH, α -glicerol P DH, etc.) al complejo III.

La ubiquinona parece estar localizada en el plano medio de la bicapa lipídica, con la cabeza polar oscilando transversalmente de un lado a otro de la membrana (*Lenaz, G., 1988; Lenaz, G. et al, 1995; Samori, B. et al, 1992*) (**Figura 15**). Este movimiento transversal de la ubiquinona, es probable que este limitado a oscilaciones de su grupo polar, permitiendo las interacciones con los agentes redox solubles en agua.

Debido a su capacidad de difusión en los lípidos de membrana, se pensó que podría ser un factor limitante, pero en condiciones fisiológicas la difusión de la ubiquinona no parece serlo para la actividad respiratoria (*Fato, R. et al, 1986; Lenaz, G., 1988*). No obstante, si se ha comprobado que una disminución de los niveles fisiológicos de CoQ, disminuiría la capacidad de transferencia electrónica y por tanto la síntesis de ATP (*Parenti-Castelli, G. et al, 1987; Battino, M. et al, 1990*).

3.3.- Teoría mitocondrial del envejecimiento

3.3.1.- Base conceptual

Se ha comentado anteriormente que el envejecimiento parece deberse a una incapacidad de la producción de energía celular debido al daño oxidativo celular producido por radicales libres.

Ahora bien, cada día cobra más importancia, como hecho claro en el citado proceso de envejecimiento, la pérdida de la funcionalidad mitocondrial en concreto como consecuencia de la agresión oxidativa a diversas estructuras mitocondriales. Esa menor funcionalidad mitocondrial conduciría a una reducción en la eficacia de obtención de energía, lo que paralelamente afectaría al fisiologismo celular y por tanto al del organismo en conjunto. Esta idea conceptual constituye lo que fue enunciado por *Miquel* (1980), como la **teoría mitocondrial del envejecimiento**, que en la actualidad se conoce también como **teoría del envejecimiento por estrés oxidativo**, dado que también intervienen en la agresión oxidativa determinadas especies reactivas que no son radicales libres.

3.3.2.- La mitocondria como fuente de estrés oxidativo

La explicación, más básica, lógica y directa del papel de la mitocondria en el envejecimiento esta en los hechos siguientes:

- a.- La mitocondria es la estructura celular donde se genera la gran mayoría de la energía producida en la célula.
- b.- La mitocondria es también la estructura celular donde se genera la mayor cantidad de radicales libres y especies reactivas.

De ambos hechos sale una conclusión clara, los RL y ER agreden oxidativamente a las moléculas, estructurales y funcionales, de la mitocondria sobre todo y en primer lugar, lo que conduce a una pérdida funcional de la misma y por tanto su capacidad para generar suficiente energía para mantener la homeostasis celular.

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son respectivamente el producto de la reducción univalente y bivalente del oxígeno y ambos son producidos, tal como se comentó previamente, de forma habitual durante el metabolismo aeróbico, fundamentalmente a nivel mitocondrial (*Cadenas, E y Davis, K.J.A., 2000*). Se ha estimado que entre un 1 y un 5% del oxígeno total consumido por la mitocondria no es reducido enteramente a agua y es transformado en $O_2^{\cdot-}$ el cual de manera espontánea o como consecuencia de la acción de la superóxido dismutasa es convertido a su vez en H_2O_2 . Aunque la citocromo oxidasa (COX) es la que se ocupa de la reducción del oxígeno, apenas genera radicales libres, siendo las dos principales regiones de la CTEmt con capacidad para producir ERO el complejo I y el complejo III (*Cadenas, E. et al, 1977; Ksenzenko, M. et al, 1983; Shimomura, Y. et al, 1985; Cross, A.R. y Jones, O.T., 1991*). Lo que ocurre es que durante el paso de los electrones de un complejo a otro, algunos de ellos escapan y se unen directamente al oxígeno circundante, generándose $O_2^{\cdot-}$. Además, en la membrana mitocondrial externa hay una fuente adicional de ERO proveniente de la desaminación de aminas biógenas por monoamino oxidasas las cuales a través de una reducción dielectrónica producen H_2O_2 partiendo de O_2 (*Hauptmann, N. et al, 1996*).

El nivel fisiológico de producción de ERO a nivel de CTEmt depende del estado metabólico mitocondrial. Así, el estado de reposo mitocondrial (estado 4), caracterizado por un nivel bajo de respiración y no disponibilidad de ADP, se asocia con una elevada producción de ERO, tal vez como consecuencia del alto grado de reducción de los componentes de la cadena. Por otro lado, el estado mitocondrial activo (estado 3), caracterizado por un alto consumo de oxígeno y elevada disponibilidad de ADP, muestra una producción de ERO relativamente baja. Por último, en el estado de anoxia (estado 5), caracterizado por una limitación en el suministro de oxígeno y una ausencia de respiración, no se observa producción de ERO (*Cadenas, E y Davis, K.J.A., 2000*).

3.3..3.- La mitocondria como blanco del estrés oxidativo

Como se acaba de comentar en el apartado anterior todas las macromoléculas estructurales y funcionales de la mitocondria sufren agresión oxidativas, siendo destacables los hechos siguientes:

a.- Ácidos grasos insaturados

Las membranas biológicas en general son muy sensibles al estrés oxidativo debido a la presencia de enlaces dobles de tipo carbono-carbono en las colas lipídicas de los fosfolípidos que las componen (*Montine, T.J. et al, 2002*). El daño oxidativo a los lípidos de la membrana se puede realizar de forma directa mediante su iniciación por ERO como los radicales hidroxilo o el anión superóxido, o bien de forma indirecta mediante algunos productos de la propia peroxidación lipídica como son ciertos aldehidos altamente reactivos que a su vez potencian el fenómeno (*Esterbauer, H. et al, 1991*). En cualquier caso y sea de un modo u otro, la oxidación de los lípidos de membrana mitocondrial da lugar a la alteración de los mismos y a cambios en la fluidez de la misma, a variaciones en su relación con las proteínas adyacentes y como consecuencia de todo lo anterior a alteraciones en su función (*Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., 1999*). Además en el caso concreto de la mitocondria hay un lípido presente en la membrana interna llamado cardiolipina, altamente insaturado y por consiguiente de elevada susceptibilidad a la oxidación. La oxidación de la cardiolipina es extremadamente perjudicial por hallarse implicado en la función de proteínas de la CTEmt tales como la COX o el transportador de nucleótidos de adenina (TNA) (*Paradies, G. et al., 1998*).

b.- Proteínas

Debido a la proximidad física entre proteínas y lípidos, el daño oxidativo a las proteínas mitocondriales como resultado directo del estrés oxidativo o bien como una consecuencia de la peroxidación lipídica puede dar lugar a entrecruzamiento, degradación y pérdida de función de las mismas. Numerosas proteínas de membrana como la ATPasa, el TNA, la COX, etc., son fácilmente inactivados mediante estrés oxidativo. Además, la oxidación de proteínas determina la apertura del poro de permeabilidad de transición, clave en el proceso de apoptosis. En resumen, la alteración de las proteínas de la CTEmt tiene como consecuencia directa una pérdida de funcionalidad mitocondrial e indirectamente una elevación de la producción de ERO (*Lippe, G. et al, 1991; Forsmark-Andree, P. et al, 1997*).

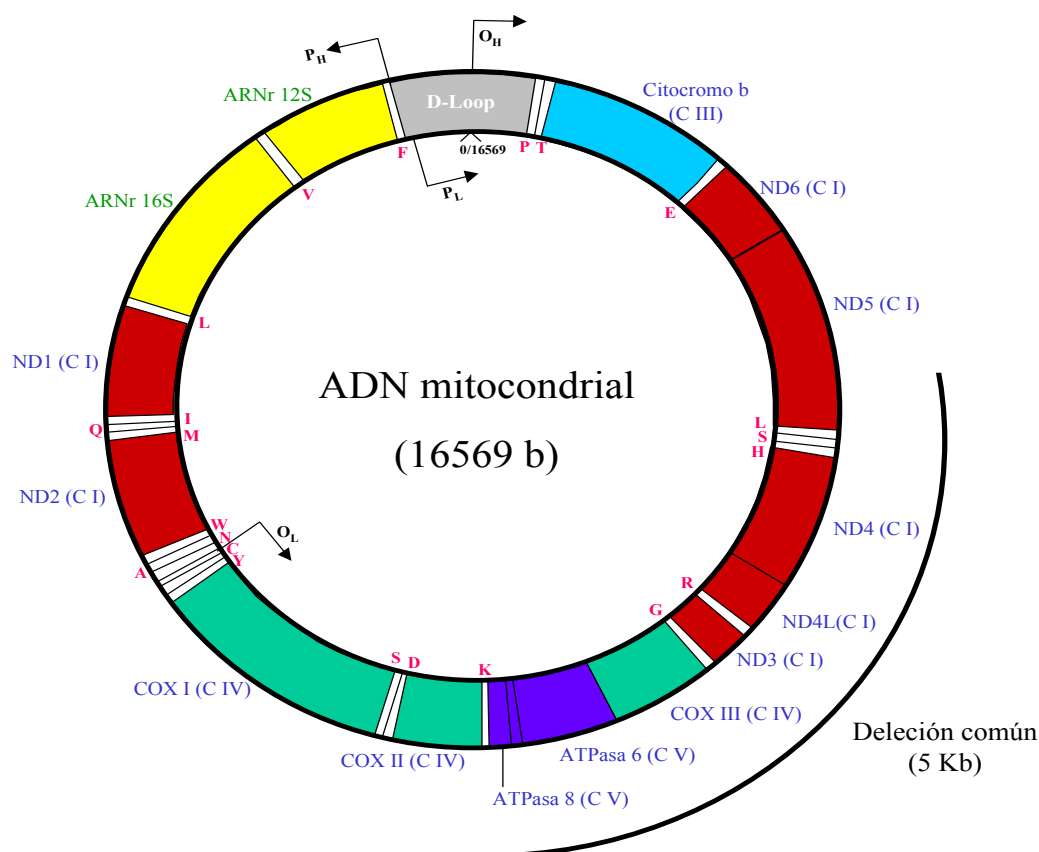


Figura 17.- Estructua del ADN mitocondrial

c.- ADN mitocondrial

La mitocondria cuenta con un genoma propio que es diferente en estructura y organización al nuclear. Se trata de un número variable de copias idénticas de ADN de cadena doble y circular (hasta 10 copias), localizado en la matriz mitocondrial, próximo a determinadas

zonas de la membrana mitocondrial interna (precisamente el lugar de máxima generación de ERO). Su tamaño es pequeño (16,5 Kb) y codifica para 13 proteínas mitocondriales, 7 de las subunidades del complejo I, una proteína del complejo III, 3 del complejo IV, 2 del complejo V (la ATPasa), 22 ARN de transferencia y dos ARN ribosómicos (**Figura 17**) (Lenaz, G., 1998; Cadenas, E. y Davies, K.J.A., 200; Van Remmen, H. y Richardson, A., 2001).

El resto de proteínas que completan los complejos respiratorios se forman por expresión de los correspondientes ADN nucleares, emigrando desde los lugares de síntesis proteicos citoplasmáticos a la mitocondria.

El daño oxidativo al ADNmt es más severo que el sufrido por el ADN nuclear, siendo las razones propuestas las siguientes:

- El ADNmt se localiza muy cercano a los lugares de la membrana mitocondrial interna donde se generan las ERO.
- La mitocondria como se ha indicado es la estructura donde se generan la gran mayoría de ERO.
- El ADNmt carece de histonas protectoras (Richter, C. et al, 1988). También se ha postulado durante mucho tiempo que la mitocondria carecía de un sistema de reparación de ADN. En la actualidad se reconoce la existencia de un sistema de reparación del ADNmt, que aunque todavía es un gran desconocido, se sabe que es capaz de reparar el daño oxidativo (por ejemplo daño a bases y roturas de una sola cadena). Además se sabe que la vía de reparación de escisión de bases juega un papel predominante dentro del sistema de reparación de ADNmt (Bohr, V.A. y Anson, R.M., 1999).

Según muchos indicios, el daño oxidativo al ADNmt es más importante desde el punto de vista del envejecimiento que el ejercido sobre lípidos y proteínas. Esto se debe a que el ADNmt dañado se puede propagar debido a la capacidad de división de mitocondrias y células, lo cual permite la amplificación de las consecuencias fisiológicas del daño. Además, el daño al ADNmt podría ser incluso más importante que el daño al ADN nuclear ya que todo

el genoma mitocondrial codifica genes que son expresados, mientras que el nuclear contiene una gran cantidad de secuencias no transcribibles (*Van Remmen, H. y Richardson, A., 2001*).

El estrés oxidativo puede afectar al ADNmt de diversas formas de entre las cuales las más conocidas son la alteración oxidativa de bases, el aumento en el nivel de deleciones y la aparición de mutaciones puntuales. La forma más común hasta la fecha de estudiar la alteración oxidativa de bases de ADN es mediante el análisis de la 8-hidroxi 2-deoxiguanosina mediante HPLC con detección electroquímica. Numerosos laboratorios han hallado niveles más elevados de este biomarcador a nivel mitocondrial con respecto al hallado en núcleo durante el envejecimiento (*Chung, M.H. et al, 1992; Agarwal, S. y Sohal, R.S., 1994*).

Actualmente se sabe que los niveles de daño oxidativo al citado ADNmt, evaluados según el nivel de deleciones correspondientes a diversos tejidos de diversas especies envejecidas, son como mínimo diez veces más elevadas que el daño infligido al ADN nuclear (*Meccoci et al, 1993, Ames et al, 1993*). Asimismo, el aumento en el porcentaje de deleciones se correlaciona directamente con la elevación del daño oxidativo. Por otra parte, también se ha establecido que las deleciones del ADNmt son especialmente en tejidos postmitóticos, como corazón músculo esquelético y encéfalo, que además son tejidos altamente dependientes de la respiración aeróbica, lo cual sucede en numerosas especies incluyendo humano, monos, roedores y nematodos (*Yoneda, M. et al, 1995*).

En el caso concreto del tejido nervioso, está perfectamente establecido que las deleciones del ADNmt en núcleo candelado, putamen y sustancia nigra son considerablemente más elevadas que en otras regiones encefálicas que demandan menor consumo de oxígeno e implican menores niveles de degradación de dopamina catalizada por la monoamino oxidasa, que es una vía asociada a una producción aumentada de H_2O_2 (*Soong et al, 1992*).

De entre todas las deleciones estudiadas, existe una que por su frecuencia de aparición ha sido llamada “delección común” (**Figura 17**) y que se ha visto que aumenta hasta 2 y 3 veces con la edad en tejidos como el cerebro (*Cortopassi, G.A. et al, 1992*). No obstante, dado que el porcentaje en que se eleva el grado de deleciones no supera el 2-3% se especula sobre la importancia fisiológica que este fenómeno tiene desde el punto de vista del envejecimiento (*Van Remmen, H. y Richardson, A., 2001*). Las mutaciones del ADNmt son la base de un número importante de patologías humanas, lo que ha abierto un nuevo y excitante

campo en la investigación mitocondrial. El ADNmt tiene un tipo de transmisión maternal y además hay numerosas copias de la molécula en una célula (poliplasmia) existiendo la posibilidad de que una mutación experimente diferentes grados de heteroplasmia. Todo esto hace que para que una lesión se manifieste fenotípicamente es necesario que sobre el 80% del ADNmt de una célula deba estar mutado (*Lenaz, G., 1998; Michikawa, Y. et al, 1999*). Básicamente, las consecuencias fenotípicas de una mutación del ADNmt deben ser defectos en la maquinaria implicada en la fosforilación oxidativa de la mitocondria y este tipo de defectos son en cierto modo la base de las alteraciones asociadas al proceso normal de envejecimiento.

3.3.4.- Evidencias experimentales de la implicación de la mitocondria en el envejecimiento

Uno de los eventos comunes al envejecimiento es la pérdida progresiva de la funcionalidad mitocondrial, pudiéndose considerar de forma general este orgánulo como una especie de reloj biológico del envejecimiento (*Salvioli, S. et al, 2001*). La mitocondria ha sido propuesta como el nexo de unión entre la acumulación edad-dependiente del daño oxidativo producido por las ERO y las alteraciones en la función fisiológica asociadas con el envejecimiento (*Van Remmen, H. y Richardson, A., 2001*). De este modo, diversas evidencias experimentales indican que la mitocondria es uno de los principales blancos del proceso del envejecimiento. Entre dichas evidencias se pueden enumerar las siguientes (*Salvioli, S. et al, 2001*):

- Acumulación de grandes deleciones y mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial (ADNmt) y descenso en el número de copias del mismo en algunos tejidos.
- Descenso con la edad de la actividad enzimática de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.
- Aumento en la producción de radicales libres, probablemente como consecuencia de las alteraciones anteriores.
- Cambios en la morfología mitocondrial y descenso del potencial de la membrana mitocondrial.

Estas evidencias corroboran que la función mitocondrial sufre importantes alteraciones durante el envejecimiento y deberían ser consideradas las causantes del fenotipo de envejecimiento, más que considerar al envejecimiento como una consecuencia de tales alteraciones. Hay una serie de observaciones que apoyan esta relación causa efecto (*Salvioli, S. et al, 2001*):

- Cuando se microinyectan mitocondrias procedentes de fibroblastos de rata vieja en células de ratas jóvenes éstas últimas sufren de forma rápida un proceso de senescencia y degeneración.
- Existe una relación inversa entre el nivel de producción mitocondrial de hidroperóxidos y la vida máxima de las especies.
- La administración de diversos antioxidantes como glutatión, vitamina C, N-acetil cisteína o coenzima Q es capaz de disminuir o eliminar el estrés oxidativo inducido por las mitocondrias y provoca un aumento de la vida media y máxima en diversas especies.

Diferencias en la funcionalidad mitocondrial pueden ser importantes para lograr un envejecimiento adecuado o inadecuado. Esto se puede deducir del estudio de determinados grupos de población en diversas partes del mundo. Así por ejemplo se ha visto que una variante hereditaria de una línea germinal de ADNmt (halogrupo J) se asocia con un mejor envejecimiento y una mayor longevidad en la población italiana (*De Benedictis, G. et al, 2000*). Por otro lado, en Japón se han descubierto tres mutaciones asociadas a una línea germinal de ADNmt halladas con una elevada frecuencia en personas centenarias de esta parte del mundo (*Tanaka, M. et al, 1998*).

Otro punto importante a tener en cuenta con respecto a la relación de la mitocondria y el envejecimiento es que dicho orgánulo no sólo es la planta energética celular y la principal fuente de ERO, sino que además muchas señales convergen en la mitocondria, la cual puede a su vez modificar y ajustar su metabolismo en respuesta a dicha información. De este modo se debe considerar también a la mitocondria como un elemento de control de la expresión génica nuclear. Así, se ha descubierto que un número elevado de proteínas con papel

regulador o de adaptación se hallan localizadas en la mitocondria o bien son translocadas a ella para su activación. Este es el caso de Nur77/TR3, p53, PKC δ , JNK/SAPK, algunas caspasas y miembros citoplasmáticos de la familia del Bcl2 tales como Bid, Bax o Bim (Finkel, T. y Holbrook, N.J., 2000).

En relación al papel de la mitocondria en el envejecimiento, el control de los procesos de apoptosis por parte de estos orgánulos resulta de suma importancia. Dicho control se pierde a menudo en las células viejas, las cuales por otro lado presentan una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Las ERO disminuyen el potencial de membrana mitocondrial, lo que permite la apertura del poro de transición, saliendo al exterior mitocondrial calcio y otros sustratos. Esta secuencia de reacciones da lugar a apoptosis en linfocitos, hígado y cerebro en el caso de ratones viejos (Watson, W.H. et al, 2000).

4.- SISTEMAS ANTIOXIDANTES DEL ORGANISMO

4.1.- Tipos genéricos de defensas antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo. La salud del organismo depende en gran medida de eficaces sistemas de defensa antioxidante que actúan contra el daño producido por RL y ER.

Existen varias clasificaciones de las defensas antioxidantes, sobresaliendo dos:

a.- Defensas antioxidantes primarias y secundarias.

Las primarias previenen el fenómeno oxidativo impidiendo la formación del radical libre, o eliminando el radical libre cuando éste se forma. Aquí se incluirían la vitamina E, el ácido ascórbico, β -caroteno, ácido úrico y algunas enzimas como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y DT-diaforasa.

En cuanto a las secundarias, su función no residiría en ser protectoras o eliminadoras del agente oxidante, sino que su papel sería el de eliminar los productos

nocivos formados, impidiendo una acumulación indeseable. En este segundo grupo se incluyen enzimas de reparación del ADN, así como exonucleasas y endonucleasas, enzimas proteolíticos (proteasas y peptidasas), enzimas lipolíticos (fosfolipasa A₂) y transferasas.

Como sus nombres indican, excepto los sistemas de reparación de ADN, las restantes enzimas lo que hacen es metabolizar los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos que han sido dañados por el ataque de RL/ERO. Dichos materiales no sólo no tienen interés biológico, sino que su permanencia los convertiría con toda probabilidad en agentes nocivos como se acaba de indicar.

b.- Defensas antioxidantes en función del mecanismo de acción.- Actualmente se puede utilizar una clasificación muy semejante, pero en lugar de utilizar los términos primaria y secundaria, se denominan los sistemas antioxidantes en función de los mecanismos de acción, precisamente los mismos que se han indicado previamente: antioxidantes de prevención, antioxidantes eliminadores de radicales (radical scavenger) y sistemas enzimáticos de reparación o de síntesis de novo. En la **Tabla 4** se muestra una serie de antioxidantes, de gran importancia en el sistema de defensa antioxidante del organismo, clasificados según el mecanismo de acción.

Tabla 4.- Clasificación de los sistemas antioxidantes basados en su mecanismo de acción

Tipo del sistema de defensa	Mecanismo de acción	Nombre del antioxidante
Antioxidantes de prevención	Impiden la formación de RL - Descomposición no radical de LOOH y H ₂ O ₂ - Secuestro del metal por quelación - Inactivación del O ₂ activo	- Catalasa, glutatión peroxidasa y -S-transferasa - Transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina - Superóxido dismutasa, carotenoides
Antioxidantes eliminadores de radicales	Remueven radicales al inhibir el inicio de la cadena y romper la propagación de la cadena	- Lipofílicos: ubiquinol, vitaminas A y E, carotenoides - Hidrofílicos: Ácido úrico, ácido ascórbico, albúmina, bilirrubina
Enzimas de reparación y "de novo"	Reparan los daños y reconstituyen la membrana	- Enzimas de reparación del DNA, proteasas, transferasas, lipasas

4.2.- *Sistemas de defensa antioxidante destacables*

4.2.1.- *Enzimas*

4.2.1.1.- Superóxido dismutasa

Familia de metaloenzimas, conocida por acelerar la dismutación espontánea de $O_2^{\cdot-}$ hacia H_2O_2 y O_2 .

Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos aeróbicos, jugando un importante papel en el control de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en los compartimentos celulares (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

Se aislaron por primera vez en 1939, por Man y Keilin a partir de eritrocitos bovinos, aunque en este primer aislamiento no se le asoció ninguna actividad enzimática, siendo denominada hemocupreína por su contenido en cobre. Posteriormente McCord y Fridovich, en 1969, mostraron su capacidad enzimática para inhibir la oxidación de ferrocitocromo C por eliminación de $O_2^{\cdot-}$, siendo renombrada como superóxido dismutasa (SOD) (McCord, J. y Fridovich, I., 1969).

Hoy en día, se pueden localizar en mamíferos tres grandes familias separadas en base a los metales que contiene y/o su localización en la célula. Dos familias son intracelulares, las superóxido dismutasas cobre, cinc-dependientes (Cu, Zn-SOD) y las manganeso dependientes (Mn-SOD) y una extracelular, las superóxido dismutasas extracelulares (Ec-SOD) (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

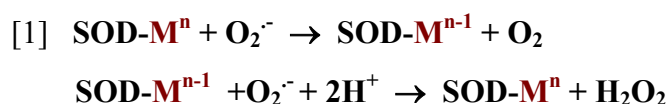
Las Cu,Zn-SOD, presentan un peso molecular de 32.000 daltons, estando constituidas por dos subunidades idénticas, con un átomo de cobre y otro de cinc cada una (Fridovich, I., 1975). De estos dos metales, el Cu es el que presenta una actividad catalítica, localizándose en el sitio activo del enzima, mientras que el Zn desempeña una función básicamente estructural (Dreosti, I.E. y Record, I.R., 1979). Esta familia se localiza principalmente en el citosol de la célula. Su gen se localiza en el cromosoma 21 humano (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

Las Mn-SOD, están constituidas por cuatro subunidades idénticas, con un átomo de Mn por unidad. Su peso molecular es de 80.000 daltons y su localización primordialmente mitocondrial (Fridovich, I., 1975). Su gen se localiza en el cromosoma 6 humano (*Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994*).

La última familia, las Ec-SOD, fué descubierta en 1982 por Stefan Marklund en tejido pulmonar, tratándose de un tetrámero de 135.000 daltons y con un átomo de cobre por subunidad. Su gen se localiza en el cromosoma 4 humano. Esta SOD presenta menor actividad que las intracelulares (*Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994*).

Las superóxido dismutasas están ampliamente distribuidas por todos los tejidos, salvo la Mn-SOD que no se localiza en eritrocitos. En humanos, las Cu, Zn-SOD, presentan mayor actividad en hígado y sustancia blanca del cerebro, y las Mn-SOD en hígado, corazón y páncreas. Las Ec-SOD son más activa en el espacio extracelular del útero, glándulas tiroideas y páncreas (*Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994*).

El mecanismo general de actuación de las SOD es el mostrado en la ecuación [1].



La superóxido dismutasa ha sido utilizada en la limitación del daño oxidativo, mediante inyección directa en sitios de inflamación, demostrando un efecto antiinflamatorio, aunque es crítica una dosis correcta (*Winrow, V.R. et al, 1993*). También se ha observado su papel protector de la mucosa intestinal en procesos de isquemia-reperfusión (*Shengyun, F, y Chistensen, J., 1995*), en radioterapia (*Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994*), así como en otras patologías y órganos.

Es interesante la posible participación de las Cu, Zn-SOD en la relación especies reactivas del oxígeno-síndrome de Down-demencia de Alzheimer. Se ha observado que el síndrome de Down da lugar a una sobreproducción de la SOD, al encontrarse en el cromosoma 21, sobreproducción que no se encuentra acompañada de un incremento de

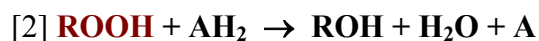
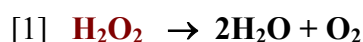
glutación peroxidasa ni catalasa, lo que conlleva un aumento en la producción de H₂O₂, con los consecuentes posibles efectos tóxicos. A este proceso se le añade el hecho de que la actividad de la Cu, Zn-SOD se localiza preferentemente en el hipotálamo, región vulnerable al daño oxidativo en la enfermedad de Alzheimer (Evans, P.H., 1993).

4.2.1.2.- Catalasa

Fué una de las primeras enzimas antioxidantes descritas, hallándose en prácticamente todas las células de animales y plantas (*Deisseroth, A. y Douce, A.L., 1970*). Se trata de una enzima intracelular ferriporfirínica, localizada principalmente en peroxisomas (80%) y citosol (20%) (*Nieto, N., 1993*).

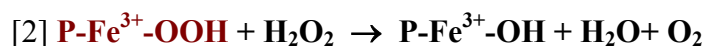
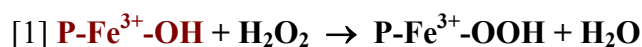
Se halla constituida por 4 subunidades, cada una con un grupo hemo enlazado en su centro activo.

La función de la catalasa es doble, ya que tanto cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [1] (actividad catalítica), como la oxidación de donadores de hidrógeno, como pueden ser metanol, etanol, fenoles, etc., con la consumición de 1 mol de peróxidos [2] (actividad peroxídica) (*Aebi, H., 1984*). Dentro de los peróxidos consumidos se encuentra el H₂O₂ y los hidroperóxidos alquilo, siendo en este caso la reactividad de la catalasa inversa a la longitud de la cadena.



El que predomine la reacción [1] o la reacción [2], va a depender de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de H₂O₂ en el sistema (*Aebi, H., 1984*). Se ha observado que la descomposición de H₂O₂ es muy rápida, mientras que las reacciones peroxidativas son relativamente lentas (*Aebi, H., 1984*). En ambas reacciones, lo primero en formarse es un complejo primario entre el H₂O₂ o el hidroperóxido y el hierro del grupo prostético [1], dando lugar a la formación del complejo activo I, complejo que

reacciona con otra molécula de hidroperóxido para dar finalmente agua y oxígeno [2] (Deisseroth, A. y Dounce, A.L., 1970).



La catalasa presenta una afinidad por el H_2O_2 baja, es decir necesita altas concentraciones del mismo para poder trabajar rápido (Roberfroid, M. y Buc-Calderón, P., 1995), aunque se ha observado una rápida inactivación de la actividad de la catalasa a concentraciones de H_2O_2 superiores a 0.1M, por formación de los complejos inactivos II y III (Aebi, H., 1984); igualmente se ha observado inactivación de la catalasa por anión superóxido (McCord, J., 1989).

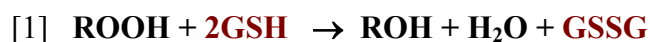
La concentración de este enzima es distinta en los diferentes órganos o compartimentos, así, en plasma su concentración es bastante baja (Ramón, J.R., 1993), encontrándose prácticamente ausente en cerebro, aunque su actividad puede ser inducida por el factor de crecimiento nervioso (Evans, P.H., 1993), siendo muy activa en hígado y eritrocitos (Nieto, N., 1993).

Se ha observado que puede ser el antioxidante celular más importante cuando se escapa de la células necrosadas, autolimitando la extensión del daño por radicales libres. Experimentalmente se ha utilizado con éxito en la isquemia-reperfusión del corazón aislado de rata, para minimizar las arritmias severas y la destrucción miocárdica producida por especies reactivas del oxígeno (Ramón, J.R., 1993).

También se ha demostrado su capacidad para atrapar ácido hipocloroso e inhibir metaloproteínas (Baud, L. y Ardaillou, R., 1993).

4.2.1.3.- Glutathion peroxidasa

Este término engloba a un conjunto de enzimas que catalizan la reacción de hidroperóxidos con glutatión (GSH), dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de reducción de hidroperóxidos [1].



El radical (R) puede ser cualquier grupo orgánico, aromático o alifático, o simplemente hidrógeno, siendo en este caso el substrato el H₂O₂ (*Mannervik, B., 1985*).

En organismos vivos se encuentran dos grandes grupos, las glutatión peroxidasas-selenio dependientes y la selenio independientes (*Mannervik, B., 1985; Nieto, N., 1993*).

Las selenio dependientes son tetraméricas, conteniendo selenio en forma de enlaces covalentes selenio-cisteína en su centro activo (*Mannervik, B., 1985*). Son activas frente a hidroperóxidos orgánicos y H₂O₂, localizándose primordialmente en citosol (70%), y en menor cantidad en mitocondrias (30%), en la matriz mitocondrial y en lugares de contacto entre la membrana externa e interna mitocondrial (*Nieto, N., 1993; Benzi, G. y Moretti, A., 1995*).

El segundo grupo no requiere selenio para su actividad catalítica, presentando en general una menor afinidad por el H₂O₂. Realmente esta actividad peroxidasa es llevada a cabo por las glutatión transferasas, las cuales se ha observado que aumenta su actividad de peroxidasa, disminuyendo su actividad transferasa, en situaciones de estrés oxidativo; este aumento y cambio de actividad ha sido observado en microsomas de hígado de rata entre otros órganos y especies (*Warholm, M. et al, 1985; Aniya, Y. y Naito, A., 1993; Erifi, M. et al, 1993*).

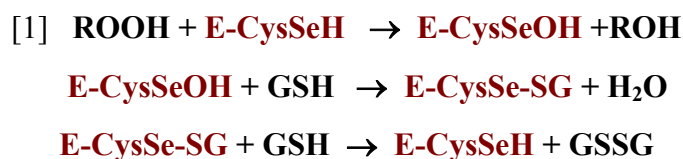
Las selenio independientes se localizan en citosol, mitocondrias y fracciones celulares que contengan membranas.

En la mayoría de los animales las selenio dependientes son las responsables de la mayor fracción de actividad peroxidasa (*Guthenberg, C., 1985*).

En mamíferos se ha descubierto un segundo tipo de glutatión peroxidasas selenio dependientes que, a diferencia de las anteriores está constituida por una sola unidad, son formas isoenzimáticas de las glutatión peroxidasas selenio dependientes, que actúan sobre

hidroperóxidos de fosfolípidos sin necesidad de la actuación de la fosfolipasa A₂. Son enzimas solubles, localizados en citosol pero activos sobre membranas (*Maiorino, M. et al., 1990*). Son menos activas sobre el H₂O₂ que las glutatión selenio dependientes, presentando igual reactividad frente a hidroperóxidos de ácido linoleico y siendo las únicas activas sobre hidroperóxidos de fosfolípidos (*Maiorino, M. et al, 1990*).

El mecanismo de acción de las selenio dependientes sigue el esquema de la reacción [1].



4.2.1.4.- *Glutathion reductasa*

Se trata de una flavoproteína localizada en el citosol y mitocondrias de la mayoría de los tejidos. Actúa catalizando la reducción NADPH dependiente del glutatión disulfato oxidado, hacia glutatión reducido (GSH) [1]. A su vez el NADP⁺ se regenera reduciéndose a través de la vía de las pentosas fosfato (glucosa 6P → gluconato)



Está constituida por dos subunidades idénticas, presentando un peso molecular de 100.000 daltons y como grupo prostético FAD (*Carlberg, I. y Mannervik, B., 1995*).

Su importancia radica en la capacidad para mantener los niveles de glutatión reducido, el cual juega un importante papel en varios procesos de oxido-reducción, entre los cuales se encuentra el servir de sustrato donador de hidrógenos en la actividad de la glutatión peroxidasa.

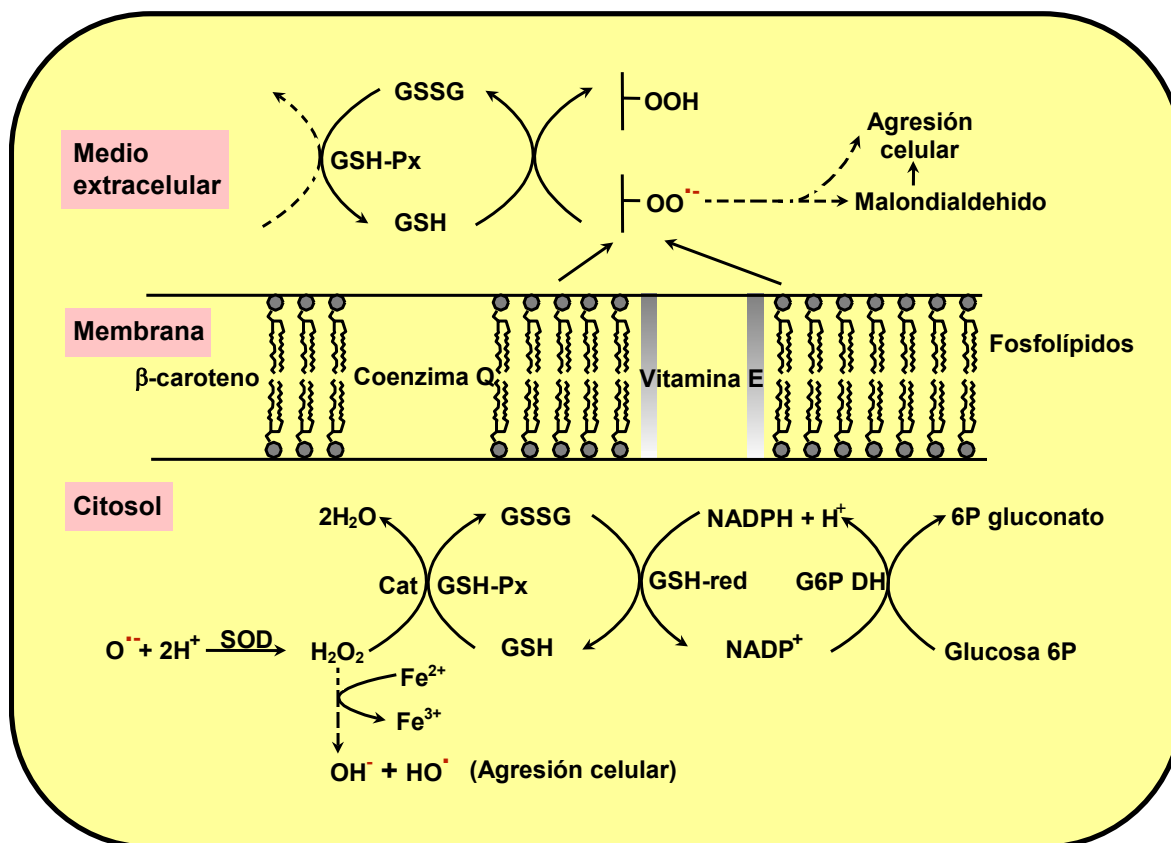
En la **Figura 18** se muestra un esquema general de las distintas enzimas comentadas.

4.2.2.- Componentes no enzimáticos

4.2.2.1.- *Vitamina E*

Su estructura química es la de una molécula de tocol, constituida por un nucleo hidroxicromona al que se une una cadena de fitilo. Existen al menos ocho formas isoméricas, las cuales se dividen en dos grupos, cuatro con una cadena saturada de fitilo (α -, β -, γ -, y δ -tocoferol) y cuatro con una cadena de fitilo con dobles enlaces en la posición 3', 7' y 11' (α -, β -, γ -, y δ -tocotrienol). Las diferencias entre las formas isoméricas de cada grupo se encuentran en la posición de los grupos metilo en el anillo.

De estas formas isoméricas el α -tocoferol predomina en muchas especies, siendo la forma más activa biológicamente y el mejor antioxidante liposoluble en células de mamíferos y sangre (Burton, G.W. et al, 1982).



Se ha demostrado experimental y clínicamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, la función de la vitamina E como antioxidante lipofílico, mediante la eliminación de radicales libres (Tapel, A., 1968; Chow, C.K., 1991; Liebler, D.C., 1993), siendo conocida su actividad para eliminar oxígeno singlete, así como otros radicales del oxígeno (Sies, H. et al, 1993).

El sitio activo se encuentra en el grupo 6-hidroxilo del anillo cromanol, el cual se sitúa, a nivel de membrana, cerca de la superficie polar, mientras que la cadena fitilo, se encuentra interaccionando con los ácidos grasos de los fosfolípidos en la región no polar, siendo esta la responsable de la cinética de transporte y retención en membranas (Graham, W.B. y Maret, G.T., 1990), no estando completamente fijo en estas

El mecanismo de inhibición de la oxidación, especialmente de lípidos, por α -tocoferol, está ampliamente estudiado *in vitro* y bastante bien comprendido (Liebler, D.C., 1993). Al parecer es a nivel del radical lipídico peroxilo (LOO \cdot), en lo que respecta a la cadena de propagación de la peroxidación lipídica, donde se observa su actuación, eliminándolo e impidiendo que continúe la cadena y por lo tanto la formación de nuevos radicales.

Se conoce que el α -tocoferol, atrapa al radical peroxilo 10 veces más rápido de lo que este reacciona con otro lípido, es decir, sobre el 90% de los radicales peroxilo son atrapados por α -tocoferol antes de que ataquen a otros lípidos (Machlin, L.J., 1991). Igual eficiencia se ha observado *in vivo* para atrapar radicales alcoxilos e hidroxilos.

El radical α -tocoferoxilo formado en la reacción, puede seguir varias direcciones: reaccionar con otro radical peroxilo y dar un aducto, reaccionar con otro radical de vitamina E y dar un dímero α -tocotrieno, ser reducido por un reductor como la vitamina C, ubiquinol o glutatión; otra vía es la sustracción de un átomo de hidrógeno de lípidos o hidroperóxidos, dando un radical lipídico o radical peroxilo respectivamente, pudiéndose volver a poner en funcionamiento la cadena de propagación. En la **Figura 23** se representan estas vías. La potencia de la vitamina E como antioxidante va a depender de estas reacciones competitivas (Packer, L., 1991). (**Figura 19**).

Como ya ha sido mencionado, son numerosos los estudios que demuestran que el α -tocoferol actúa como un potente antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos (Niki, E., 1995; Jessup, W. et al, 1990).

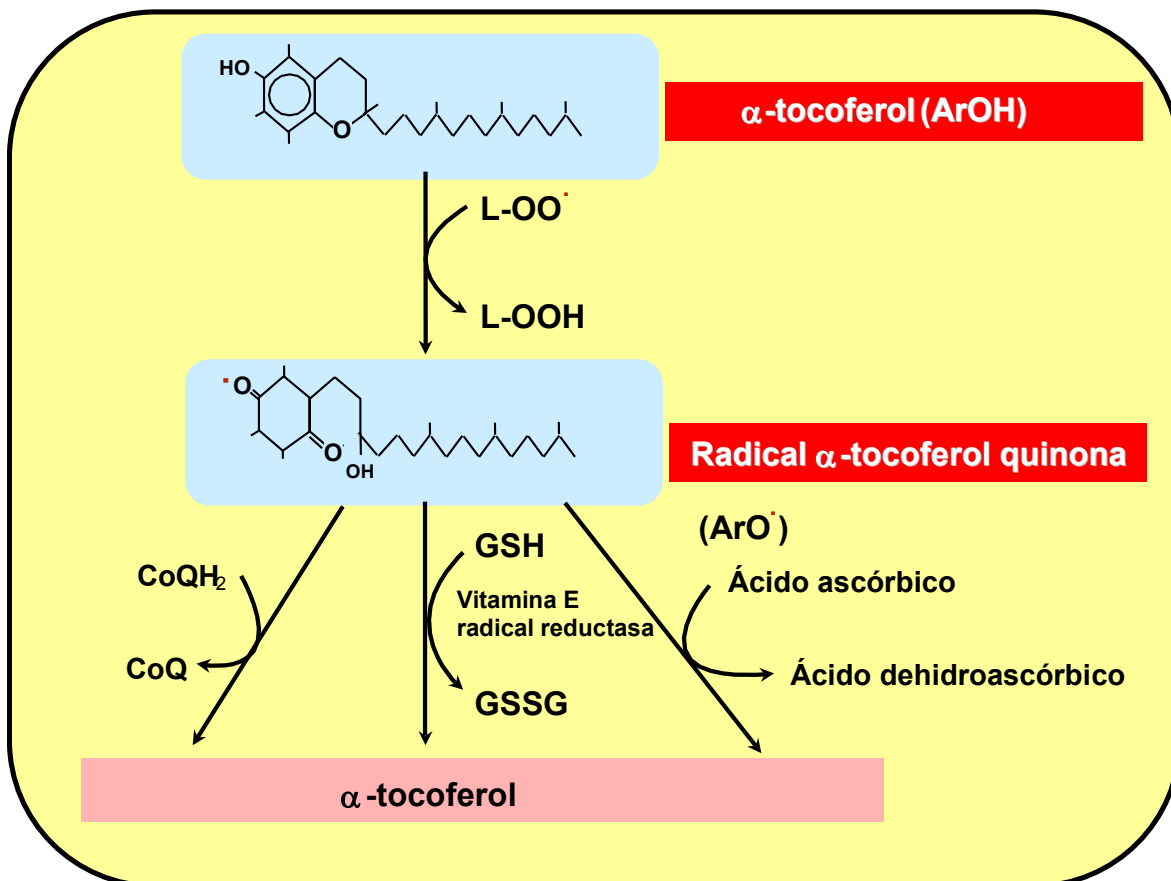


Figura 19.- Mecanismo de acción de vitamina E en la inactivación de radicales libres y sistemas de regeneración del radical de la misma (L-OO^\cdot - Radical peroxilo)

También existen estudios que muestran una cierta capacidad prooxidante de la vitamina E, actuando como un componente en la cadena de propagación, ya que su incorporación en membrana cerca de la superficie facilitaría la captura de radicales de la fase acuosa, pudiendo seguir, el radical tocoferoxilo resultante, la vía de ataque a otros lípidos e iniciando la cadena de oxidación. Parece ser que esta actividad prooxidante *in vivo* no es tan importante, debido a los agentes reductores como ascorbato, ubiquinol y glutatión, que regeneran el α -tocoferol (Nagaoka, S. et al, 1990; Bowry, V.W. et al, 1995). El ascorbato es consumido primero cuando el radical tocoferilo se encuentra en la fase acuosa, mientras que el ubiquinol es consumido primero cuando los radicales son formados en la membrana.

Son muy numerosos los estudios que muestran su relación y actuación en el tratamiento de patologías diversas. Así, se ha observado que deficiencias severas o crónicas pueden dar lugar a un progresivo síndrome neurológico, involucrando a la vitamina E en un óptimo desarrollo y mantenimiento de la función e integración del sistema nervioso y músculo esquelético. Otros estudios evidencian que suplementando la dieta con vitamina E se reduce el riesgo de enfermedades del corazón, e igualmente, se ha observado su acción en cáncer, envejecimiento, contaminación, etc. (*Landvik, S.V. et al, 1995*).

4.2.2.2.- Coenzima Q

Se trata de una benzoquinona que presenta en la posición 6 una cadena lateral constituida por un número variable de unidades isoprenoides. Su función principal es de actuar como transportador móvil en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, transfiriendo electrones desde los complejos tipo deshidrogenasa al complejo III.

Su actividad antioxidante fue observada, en estudios pioneros, por Mellors y Tappel (*Mellors, A. y Tappel A.L., 1966*), los cuales mostraron una eficiente inhibición de la lipoperoxidación por ubiquinol-6.

A partir de este estudio, se realizaron muchos otros en los que se demostró la interacción directa del coenzima Q con radicales libres, disminuyendo así la oxidación de lípidos en liposomas, membranas (mitocondrias, microsomas, etc.), células y lipoproteínas (*Ernster, L. et al, 1992*).

En los estudios iniciales se sugería que tanto la forma oxidada del coenzima Q (ubiquinona) como la reducida (ubiquinol, CoQH_2), ejercían los mismos efectos antioxidantes, aunque en experimentos posteriores se mostró que era requerida una muy alta concentración de ubiquinonas para observar una actividad antioxidante significativa (*Landi, L. et al, 1990*), encontrándose que en diferentes fracciones membranosas la forma reducida o ubiquinol, demostraba una mayor habilidad que la forma oxidada para inhibir la lipoperoxidación inducida por Fe^{2+} -ascorbato (*Kagan, V.E. et al, 1990*).

Igualmente se ha mostrado, *in vitro*, que ubiquinoles con cadenas laterales isoprenoides cortas (Q₁-Q₄) ejercen un efecto inhibitor de la lipoperoxidación más potente que sus homólogos de cadena larga (Q₅-Q₁₀) (Kagan, V.E. *et al*, 1990).

La reactividad de los ubiquinoles con radicales peroxilo no es muy alta, encontrándose para el ubiquinol-9 una constante de interacción de $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, siendo esta constante un orden de magnitud más bajo que la presentada para la vitamina E ($33,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Valerian, E.K. *et al*, 1990).

Se supone que el mecanismo antioxidativo más utilizado o significativo es el del mantenimiento del *pool* de vitamina E a través de la reducción del radical α -tocoferoxilo. Este dato esta reforzado por el hecho de que la constante de interacción ubiquinol-radical tocoferoxilo es de $3,74 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ (a 25°C en benceno), mucho más alta que la constante de reacción con radical peroxilo, por lo que se observa una preferencia por reducir α -tocoferoxilo más que por interactuar con radicales peroxilo (Mukai, K. *et al*, 1993).

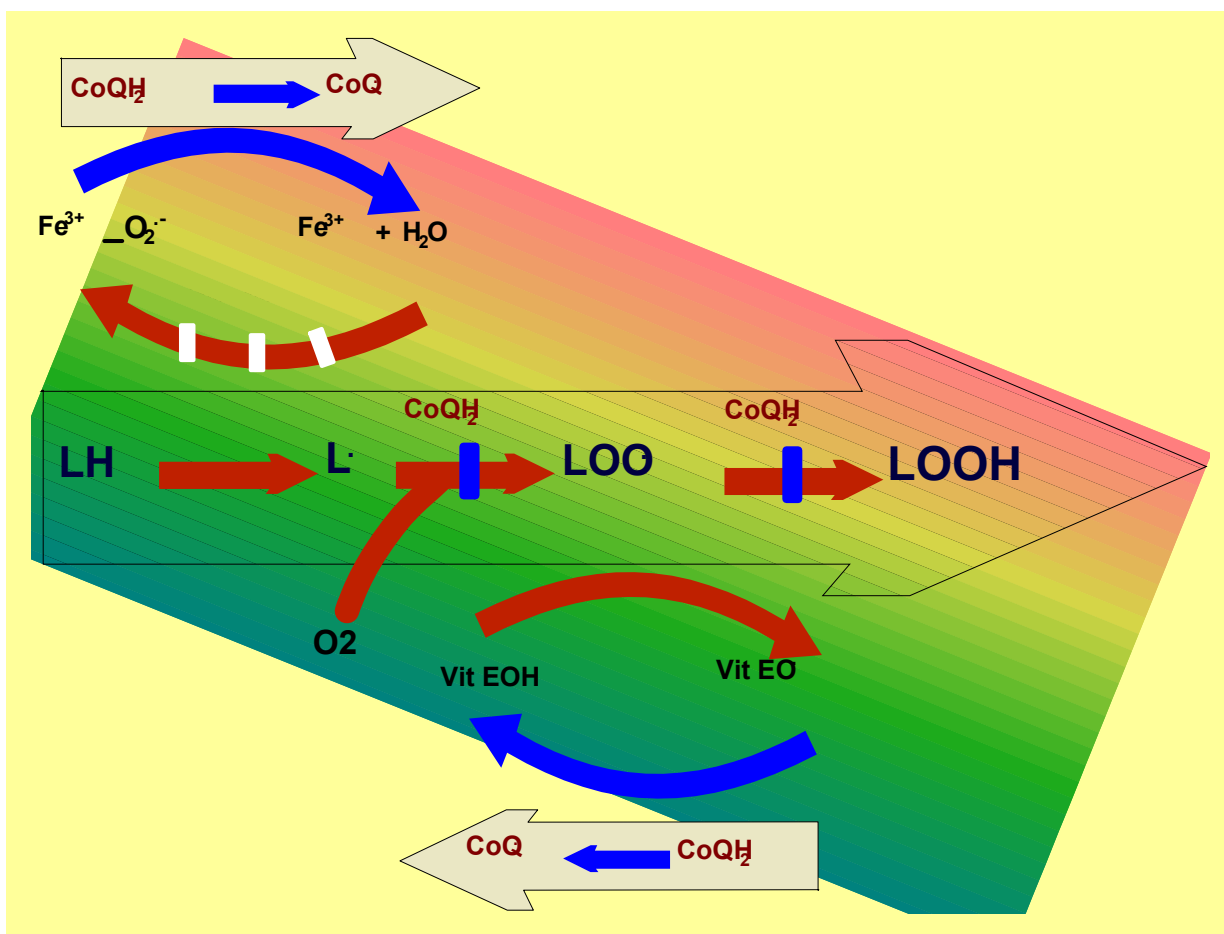
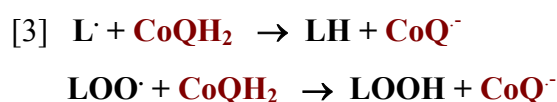
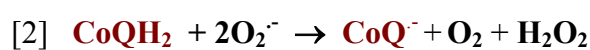
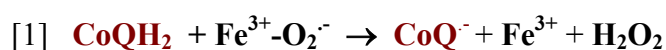
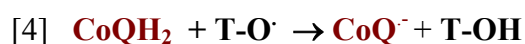


Figura 20.- Mecanismo antioxidante a través del coenzima Q

De los estudios realizados por numerosos grupos de investigación, se extraen varios mecanismos de actuación antioxidativa. Así, uno de los mecanismos es la reducción directa de especies perferrilo ($\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^-$) por CoQH_2 [1], con la consecuente prevención del ataque de estas especies, considerándose este mecanismo como inhibidor de la síntesis de radicales alquilo y peroxilo. Otro mecanismo es la interacción directa con anión superóxido [2] y con radicales alquilo y peroxilo, mediante donación de átomos de hidrógeno a estos radicales [3] (**Figura 20**) (Litarru, G.P., 1994; Kagan, V.E. et al, 1995).



Unos de los mecanismos más significativos, como se ha comentado anteriormente, es la regeneración de α -tocoferol [4].



Otro mecanismo antioxidante, que lo involucra en el daño por isquemia-reperusión, consiste en la actuación del CoQH_2 sobre la formación de ferril mioglobina (forma radical), producto formado en la interacción de mioglobina con H_2O_2 , poderoso agente oxidante capaz de atacar importantes componentes celulares, así, en estudios *in vitro* se muestra que la adición de ubiquinol reduce estos compuestos y por lo tanto su daño, regenerándose además la forma oxidada de CoQ. Este mecanismo presentaría una doble ventaja: disminución de un radical y regeneración de ubiquinona (Litarru, G.P. et al, 1995).

La posible inducción de DT-diaforasa, un enzima que convierte a las quinona en hidroquinonas, más que en semiquinonas, previniendo así su posterior autoxidación, podría convertirse en otro mecanismo antioxidante (Lind, C. et al, 1982).

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación, involucran al CoQ en la modificación de la extensión de la peroxidación lipídica inducida por estrés endógeno o exógeno y/o inducida por manipulación de la grasa alimentaria, demostrando que la inducción de oxidación por un estrés, ya sea exógeno (adriamicina) o endógeno (ejercicio físico) aumenta el contenido de CoQ en membrana, siendo además mayor el efecto cuanto más insaturada es la grasa de la dieta (*Mataix, J. et al, 1997*).

4.2.2.3.- Carotenoides

El término carotenoide se utiliza generalmente para designar a moléculas de 40 átomos de carbono y un extenso sistema de dobles enlaces conjugados (*Handelman, G.J., 1995*). Son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo el carotenoide prototipo el β -caroteno, sobre todo por ser el que mayor actividad vitamina A posee (*Simpson, K.L. y Chichester, C.O., 1981*).

Se ha observado en numerosos estudios su actividad antioxidante, mostrándose su capacidad para reaccionar con oxígeno singlete, radical peroxilo, radical hidroxilo, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas (*Handelman, G.J., 1995*).

De estos estudios se extrae que la capacidad antioxidante de los carotenoides, depende fundamentalmente de la concentración de O_2 existente, la estructura química de los mismos y el efecto acompañante de otros antioxidantes (*Krinsky, N.I., 1993*).

Los carotenos presenta una mayor actividad a bajas presiones de oxígeno, perdiendo efectividad conforme aumenta dicha presión (*Krinsky, N.I., 1993; Handelman, G.J., 1995*). Burton e Ingold incluso observaron una cierta actividad prooxidante de los carotenos, a una presión de 1 atmósfera y con una proporción carotenoide:lípido de 1:300 (*Burton, G.W. y Ingold, K.U., 1984*), aunque esta actividad prooxidante a altas presiones no está del todo confirmada.

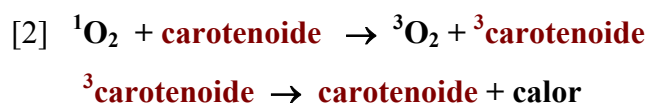
En lo referente a la relación estructura-actividad antioxidante, se ha observado que no todos los carotenoides muestran la misma capacidad antioxidativa. Así, en estudios *in vitro*, se observa que los carotenoides con 8 o más dobles enlaces son 1000 veces más efectivos, a

la hora de reaccionar con oxígeno singlete, que los que presentan 5 o menos (*Handelman, G.J., 1995*). Otros autores han observado que carotenoides con dobles enlaces conjugados adicionales, como licopeno, incrementan su constante de interacción; también la presencia de carbonilo terminal, epóxidos u otros grupos oxigénicos la incrementan (*Hirayana, D. et al, 1994*).

Con respecto al oxígeno singlete, se ha mostrado *in vitro* que una molécula de β -caroteno es capaz de interaccionar con al menos 100.000 moléculas de oxígeno singlete, antes de su total destrucción (*Handelman, G.J., 1995*).

En otros estudios se ha observado que la acción sinérgica de α -tocoferol y β -caroteno aumenta la actividad antioxidante de este último, seguramente mediante la protección por parte del α -tocoferol de la autooxidación de β -caroteno e inhibición de los posibles efectos oxidantes del radical peroxilo de β -caroteno (β -car-oo \cdot), formado durante la acción antioxidante del mismo (*Krinsky, N.I., 1993*).

El mecanismo de acción no es conocido en todos los casos, aunque se ha observado que con el radical peroxilo forma un intermediario radical transitorio [1] y en el caso del oxígeno singlete actúa mediante la transferencia de energía de excitación al β -caroteno, con posterior eliminación de dicha energía como calor [2] (*Handelman, G.J., 1995*).



La mayoría de estos estudios han sido realizados *in vitro*, aunque los estudios realizados *in vivo* refuerzan los datos observados, destacando dos aspectos importantes en la actividad antioxidante de los carotenoides, uno de ellos es la eficiencia en una disminución directa de la peroxidación lipídica y el otro es la habilidad de esta molécula para modular los niveles endógenos de otros antioxidantes (*Krinsky, N.I., 1993*).

4.2.2.4.- Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico, presenta la capacidad de poder sufrir rápidamente dos procesos oxidativos monovalentes consecutivamente con la formación del radical semidihidroascrobato ($\text{Asc}^{\cdot -}$) como intermediario, radical relativamente no reactivo

Estas características hacen a este compuesto un excelente antioxidante hidrosoluble donador (*Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., 1995*).

El ascorbato según algunos autores es el antioxidante plásmatico más eficaz, ya que aunque su contribución a la capacidad antioxidante es de 0-24%, menor que la encontrada para urato (35-65%) o para las proteínas plasmáticas (10-50%) (*Etsuo, N., 1991*), es el primero en ser consumido y por lo tanto en atacar (*Frei, B., 1991*).

Este componente es capaz de interactuar directamente con $\text{O}_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , oxígeno singlete, radicales centrados en el nitrógeno y en el sulfuro y radicales lipídicos (*Stadman, R.E., 1991; Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., 1995*), siendo, por ejemplo, más eficaz en la prevención de la oxidación por NO_2^{\cdot} que la vitamina E (*Sauberlich, H.E., 1994*).

Otro mecanismo antioxidante importante llevado a cabo por la vitamina C, es la regeneración del α -tocoferol por medio de la interacción con el radical tocoferoxilo (*Niki, E., 1991*).

A pesar de que la vitamina C es hidrosoluble y el tocoferol liposoluble, la interacción entre ambas es posible gracias a la disposición del grupo fenol activo del tocoferol en las membranas biológicas, el cual se localiza en la interfase agua-membrana. Así, el α -tocoferol protege a las membranas del daño oxidativo y la vitamina C, además de regenerar el *pool* de tocoferol de membrana, protege a las membranas de las posibles reacciones prooxidantes del radical tocoferoxilo (*Niki, E., 1991; Sauberlich, H.E., 1994*).

Son muy numerosos los estudios en los que se observa el efecto preventivo, en mayor o menor grado, de la ingesta de vitamina C sobre numerosas patologías tales como cataratas, diabetes mellitus, cáncer, enfermedades respiratorias, lipoperoxidación, enfermedades coronarias, etc. (*Frei, B., 1991; Sauberlich, H.E., 1994; Brown, L.A. y Jones, D.P., 1995*). Por ejemplo, se ha observado que una alta ingesta dietética de vitamina C presenta un efecto

protector frente al desarrollo de síntomas crónicos respiratorios, asociándose a una reducción en la peroxidación lipídica (*Schwartz, J. y Weiss, S.T., 1990*).

La regeneración de ascorbato puede ser vía enzimática, mediante la monodihidroascorbato reductasa y la dehidroascorbato reductasa (*Buettner, G.A. y Jurkiewicz, B.A., 1995*). Otras vías son mediante interacciones con otras moléculas como glutatión o por interacción de dos radicales semidihidroascorbato (*Stadtman, E.R., 1991*).

Una cierta actividad prooxidante ha sido observada para la vitamina C, radicando en su capacidad para reducir metales catalíticos de transición como Fe^{3+} o Cu^{2+} a Fe^{2+} o Cu^{+} , con la toxicidad que ello implica, aunque el predominio de una actividad prooxidante o antioxidante, va a depender de las concentraciones relativas de ascorbato y metales de transición libres, mostrándose la prooxidante en condiciones de bajas concentraciones de ascorbato y relativamente altas de metales libres (*Buettner, G.R. y Jurkiewicz, A.B., 1995*). Esta actividad prooxidante se ve disminuida por interacciones con otros antioxidantes, por ejemplo se ha observado que el urato protege de la oxidación por ácido ascórbico mediante el atrapamiento de metales catalíticos (*Sevanian, A. et al, 1991*).

Otro mecanismo de posible actividad prooxidante por parte del ácido ascórbico, radica en su propia autooxidación con producción de anión superóxido, lo cual también requiere la presencia de metales de transición, observándose que el cobre es 80 veces más eficiente que el hierro en esta catálisis (*Buettner, G.R., 1988*).

4.2.2.5.- *Compuestos fenólicos*

Estos compuestos ampliamente presentes en alimentos de origen vegetal como verduras, hortalizas, frutas, vino, té, etc., ascienden en la actualidad a más de cinco mil compuestos. Actúan sobre un gran número de funciones biológicas (permeabilidad capilar, inhibición enzimática, mecanismos de transporte) y son asimismo, eliminadores de radicales.

El compuesto más conocido es la quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona), que tiene más de ciento cuarenta derivados. La quercetina funciona como inhibidor de diversas

enzimas (XO, XDH, citocromo P₄₅₀, proteinquinasa, lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, Ca²⁺-ATPasas, etc.) a través posiblemente de diferentes mecanismos.

La multiplicidad de variedades y funciones de los flavonoides ha sido causa de muchas confusiones al menos en lo que concierne a los estudios *in vitro*. En cualquier caso, los mecanismos celulares de protección frente a RL/ERO, se pueden englobar en los siguientes:

- Capacidad antioxidativa directa, protegiendo la vitamina E o regenerando la vitamina A.
- Efecto inhibidor de lipoxigenasas.

4.2.2.6.- Ácido úrico

El ácido úrico es el producto de la oxidación de la hipoxantina y xantina a través de xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa (XO y XDH). En los tejidos humanos, a causa de la carencia de urato-oxidasa, se acumula como producto final del metabolismo de las purinas. In vitro inhibe la generación de HO[·] dependiente de metales de transición, además es un potente inactivador del oxígeno singlete, y atrapa radicales peroxilos en fase acuosa, de modo más eficaz que el ácido ascórbico. El efecto antioxidante del ácido úrico in vivo depende directamente del nivel de alantoína, uno de los productos de su oxidación.

4.2.2.7.- Otros antioxidantes

En el organismo existen otras muchas moléculas que actúan como antioxidantes, entre ellas se encuentra el **glutati6n**, tripéptido formado por glutamina, cisteína y glicina. Se encuentra en prácticamente todas las células, presentando un importante papel como antioxidante intracelular y en el líquido de recubrimiento epitelial (Ram6n, J.R., 1993).

El sistema glutati6n reducido-oxidado utiliza hidroper6xidos para oxidar el glutati6n reducido, existiendo evidencias crecientes de que es necesario un fino balance entre GSH/GSSG para un adecuado mantenimiento de la salud (Ram6n, J.R., 1993).

Al igual que el glutatión otros aminoácidos presentan una actividad antioxidante, como la **cisteína** y **cisteamina**, que pueden provocar la reducción de diversos compuestos orgánicos por medio de la donación de electrones desde los grupos sulfidrilos o como la **taurina**, que puede reaccionar con el ácido hipocloroso (Romero Alvira, D. et al, 1992).

Existen otras moléculas como la **bilirrubina**, que reacciona con radicales peroxilo y las **glucosa**, la cual presenta una acción eliminadora de radical hidroxilo (Romero Alvira, D. et al, 1992; Ramón, J.R., 1993).

Otro mecanismo de protección contra la oxidación es la quelación o atrapamiento de los metales de transición, así las proteínas transportadoras de hierro como **transferrina**, con dos átomos de hierro unidos, la **ferritina**, que puede transportar hasta 4.500 átomos de hierro, son antioxidantes. La **ceruloplasmina**, es una atrapadora de cobre, observándose que en la enfermedad de Wilson, un desorden metabólico caracterizado por unas bajas concentraciones de ceruloplasmina en sangre, tiene lugar un fuerte ataque de radicales libres estimulados por cobre y el tratamiento con penicilamina, un agente quelador de cobre, la disminuye. La ceruloplasmina también juega un papel en la oxidación de hierro hacia la forma férrica, que como se ha indicado es menos reactiva. (Cheeseman, K.H., 1993; Litarru, G.P., 1994).

4.2.3.- Mecanismos de reparación

Los mecanismos reparativos, eliminan biomoléculas dañadas antes de que su acumulación y/o presencia de lugar a alteraciones en el metabolismo celular o incluso la muerte celular. Así, el daño oxidativo a ácidos nucleicos es reparado por enzimas específicas (Cheeseman, K.H. y Slater, T.F., 1993), como las DNA glicolasas, las cuales pueden ser de dos tipos, unas capaces de hidrolizar enlaces N-glicosílicos entre una dañada o inapropiada base y el azúcar desoxirribosa y otras que además de presentar la función anteriormente mencionada, presentan actividad β -liasa, eliminando los sitios azúcares-fósforo resultantes por β -eliminación. También encontramos endonucleasas de varios tipos (Ramotar, D.y Demple, B., 1993).

Proteínas oxidadas son eliminadas por sistemas proteolíticos y los lípidos de membrana oxidados por peroxidasas, lipasas y aciltransferasas, por ejemplo la fosfolipasa A₂, que se encarga de liberar los ácidos grasos oxidados de los fosfolípidos de membrana, para que puedan actuar sobre ellos los sistemas antioxidantes correspondientes (*Cheeseman, K.H. y Salter, T.F., 1993*), habiéndose observado que su actividad aumenta en la membrana interna mitocondrial y otras membranas en respuesta a condiciones asociadas a un incremento de especies reactivas del oxígeno (*Malis, C.D. et al, 1990; Hatch, G.M. et al, 1993*).

4.2.4.- Mecanismos de adaptación

Los radicales libres formados en el entorno de la célula y las especies reactivas del oxígeno, pueden actuar como señales capaces de inducir la síntesis y el transporte de los apropiados antioxidantes al sitio de acción. Por ejemplo, el ejercicio físico es un estímulo capaz de inducir la síntesis de catalasa, otras peroxidasas y coenzima Q (*Litarru, G.P., 1994*).

Otro ejemplo se encuentra en la activación por especies reactivas del oxígeno de genes reguladores transcripcionales, como es el caso del NF-κB, involucrado en la respuesta inflamatoria en fase aguda (Sies, H., 1993).

4.3.- **El equilibrio oxidación-antioxidación en el proceso de envejecimiento**

La respuesta acerca del estrés oxidativo neto resultante durante el proceso de envejecimiento es controvertida ya que hay estudios que detectan elevaciones en los niveles de diversos marcadores de estrés oxidativo y otros que no detectan tales aumentos. Algunas de las claves para encontrar esta disparidad de resultados pueden hallarse en el tipo de material biológico ensayado o en el parámetro elegido. En relación al material biológico, muchos de los estudios se realizan utilizando homogenados tisulares o células completas, y no se debe olvidar que la mayor proporción del estrés oxidativo celular proviene de la mitocondria. De este modo, la mala elección del material biológico puede dar lugar al enmascaramiento de las diferencias (el ADNmt representa un 5% del ADN nuclear). Además, el estrés oxidativo neto parece ser dependiente del sexo del animal, de la especie, del tejido estudiado, del perfil lipídico de las membranas biológicas, etc. Hechas estas salvedades, se

han hallado aumentos en los niveles de exhalación de etano y pentano debidos a la edad en ratas viejas, mayores niveles de proteínas carbonilo y 8-OHdG en el cerebro y otros tejidos de rata, ratones y humanos (*Sagai, M. y Ichinose, T., 1980; Sohal, R.S. y Dubey, A., 1994; Lee, C.M. et al, 1997*).

Según Halliwell y Gutteridge (*Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., 1999*), el nivel de daño oxidativo en equilibrio (los niveles normales), es el resultado del balance entre los niveles de daño y los niveles de reparación o de sustitución de las moléculas dañadas. De este modo, en términos de balance, un aumento neto del daño oxidativo en el envejecimiento puede ser observado en forma de mayores niveles de daño como tal o como fallos en el sistema de reparación de dicho daño como consecuencia de la edad. En este sentido, se ha observado una correlación positiva entre la eficiencia de los enzimas reparadores del ADN y longevidad de las especies (*Barnett, Y.A. y King, C.M., 1995*). Por otro lado, se sabe que la capacidad de diversas líneas celulares para degradar proteínas anormales y reparar ADN parece disminuir a medida que envejecen. Por tanto, el concepto de estrés oxidativo además de tener en cuenta el grado de producción de ERO y/o disminución en la capacidad antioxidante debe ser ampliado al entramado complejo, y en gran manera desconocido, de los sistemas de reparación del daño (*Bohr, V.A. y Anson, R.M., 1999*).

Con respecto al comportamiento de las defensas antioxidantes durante el envejecimiento, parece que en general la protección no falla con la edad (*Kellog, E.W. y Fridovich, I., 1976*), si bien hay excepciones. No obstante, en el supuesto de que las defensas antioxidantes no fallasen, esto no sería un argumento en contra de la teoría del estrés oxidativo. Esto es así porque la teoría del estrés oxidativo se puede considerar como una ecuación en la que intervienen múltiples factores de entre los cuales los niveles de antioxidantes serían sólo uno de tales factores. En dicha ecuación no se podrían olvidar factores como el grado de expresión y actividad de los enzimas antioxidantes, la eficacia de los sistemas de reparación, la disponibilidad de metales de transición en el medio, los cambios estructurales en el material biológico con la edad, la ingesta o procesamiento de antioxidantes procedentes de la dieta, la producción de radicales libres como tal y el punto en el cual las células oxidativamente dañadas son eliminadas apoptóticamente (*Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., 1999*). Hechas las anteriores salvedades, se puede decir que en general no hay descensos grandes en los niveles de antioxidantes durante el envejecimiento, habiéndose

incluso registrado algunos aumentos (elevación de los niveles de vitamina E o aumento en la actividad SOD).

5.- NUTRICIÓN Y ENVEJECIMIENTO

La influencia que la nutrición tiene sobre el proceso de envejecimiento parece cada día más evidente, lo que acentúa el interés de todo el mundo, desde especialistas a politicosanitarios, en poder llevar los postulados científicos a la correspondiente terapéutica aplicada.

Dicho lo anterior hay que ser cautos a la hora de establecer las verdaderas relaciones entre nutrición y envejecimiento, especialmente aquellas situaciones nutricionales que conducen a enfermedades relacionadas con la edad. Es evidente, por poner un ejemplo concreto, que una alteración crónica en el patrón lipídico de la dieta, puede conducir a una enfermedad cardiovascular y esta a su vez reducir la expectativa de vida. Lo mismo se puede decir cuando diversas transgresiones alimentarias conducen a diabetes mellitus tipo II, a cáncer o cuando el déficit de uno o más micronutrientes dan lugar a enfermedades carenciales que finalmente reducen las expectativas de vida. Pero las enfermedades relacionadas con la edad no son envejecimiento, o dicho de otra manera, el envejecimiento no es una enfermedad, como ya se destacó al comienzo de esta memoria.

Por lo anteriormente comentado hay que intentar separar aquellas condiciones nutricionales que provocando una enfermedad reducen la expectativa de vida y centrarse en aquellas otras que sin mediar enfermedad alguna hacen envejecer más o menos prematuramente.

Hasta este momento, las evidencias más concluyentes, entre nutrición y envejecimiento, están situadas en el mundo del daño oxidativo, pero esto en absoluto descarta, como ya se indicó, que haya otro tipo de agresiones celulares que afecte a la capacidad vital del organismo.

Los estudios nutricionales más prometedores desde el punto de vista de la relación nutrición-envejecimiento, se han conseguido con la restricción calórica. Por otra parte,

también se han realizado numerosos estudios centrados en el papel antioxidante de numerosas sustancias ingeridas en la dieta y en la posible suplementación con dichos antioxidantes.

5.1.- Restricción calórica, suplementación con antioxidantes y retardo del proceso de envejecimiento

El papel de la restricción calórica, o lo que es lo mismo, de la limitación de la ingesta de alimentos, fue descrito por primera vez en 1935 por McCay y colaboradores (*McCay, C.M. et al, 1989*). Desde entonces se ha descrito como la restricción calórica aumenta la vida media en un amplio rango de especies y en roedores además disminuye la velocidad con que determinadas enfermedades relacionadas con la edad aparecen (*Masoro, E.J., 1999; Finkel, T. y Holbrook, N.J., 2000*). Aunque hay varias teorías para explicar el efecto antienvjecimiento de la restricción calórica, la hipótesis más plausible propone que dicho efecto se lleva a cabo a través de una reducción en el estrés oxidativo. Esto se sustenta, entre otras, en la observación de que ratones calóricamente restringidos generan un menor estrés oxidativo que sus homólogos alimentados *ad libitum*, produciendo además un menor índice de oxidación de lípidos, proteínas y ADN (*Masoro, E.J., 1999; Finkel, T. y Holbrook, N.J., 2000*). La restricción calórica además previene muchos de los cambios que tienen lugar a nivel de expresión génica durante el envejecimiento, entre los que se incluyen la elevación en la expresión de las proteínas de *shock* térmico y la atenuación de la expresión de la proteína inducida por estrés Hsp70. Por último, también se ha observado que la restricción calórica provee a roedores de capacidad para soportar mejor un amplio rango de tipos fisiológicos de estrés, de mejora de la termotolerancia y de reducir el daño inducido por calor en ratas viejas (*Finkel, T. y Holbrook, N.J., 2000*). Para finalizar con el estudio de la restricción calórica, conviene decir que aunque se podría tratar de una potente arma terapéutica para luchar contra el envejecimiento, la posible aplicación de la restricción calórica como terapia antienvjecimiento en la población humana acarrea tales dificultades éticas y de tipo práctico que hacen prácticamente inviable su puesta en marcha (*Finkel, T. y Holbrook, N.J., 2000*).

Por otra parte y como se ha puesto de manifiesto en los puntos anteriores, el estrés oxidativo desempeña un papel muy significativo en el proceso global del envejecimiento y por tanto la suplementación con antioxidantes podría ser de utilidad como posible terapia antienvjecimiento.

Entre los primeros estudios caben destacar los de Miquel y Ecónomos (*Miquel, J. y Ecónomos, A.C., 1979*) en relación a la capacidad del carboxilato de tiazolidina de aumentar la vitalidad y prolongar la vida media en ratones. Posteriormente, Furukawa y colaboradores (*Furukawa, T. et al, 1987*), mostraron el papel protector de la administración oral de glutatión frente al declive de la función inmune asociada al envejecimiento. Muchos otros antioxidantes han sido probados en relación al envejecimiento, con resultados más o menos positivos. Entre dichos antioxidantes caben destacar la vitamina E, C, coenzima Q, extractos herbales ricos en flavonoides y polifenoles, y otros (*Halliwel, B. y Gutteridge, J.M.C., 1999; Huertas, J.R. et al, 1999; Sastre, J. et al, 2000*). Si bien los resultados obtenidos con estos antioxidantes han sido exitosos en cuanto a la atenuación del estrés oxidativo mediado por la edad o por enfermedades asociadas a la misma, han tenido poco o ningún éxito con relación al aumento de la longevidad.

5.2.- Grasa dietética y estrés oxidativo mitocondrial. Un abordaje novedoso de la nutrición en el envejecimiento

El tipo de grasa de la dieta condiciona de manera importante numerosos parámetros bioquímicos en la membrana mitocondrial (*Mataix, J. et al, 1998; Quiles, J.L. et al, 1999b*). La importancia del tipo de ácidos grasos de la dieta reside en el hecho de que la membrana mitocondrial (y en general todas las membranas biológicas) es capaz de adaptar la composición de sus fosfolípidos a la grasa ingerida de forma mayoritaria (*Huertas, J.R. et al., 1991b; Quiles, J.L., et al., 1999b; Ochoa-Herrera, J.J., et al., 2001*). De este modo, si un individuo ingiere mayoritariamente grasa de origen animal, sus membranas serán más ricas en grasa saturada que las de otro individuo cuya fuente grasa mayoritaria sea de origen vegetal. Por otro lado, ha sido descrito de forma contundente como se producen adaptaciones del sistema de transporte electrónico mitocondrial en relación al tipo de grasa de la dieta, con mayor o menor repercusión sobre los diversos complejos del sistema (*Huertas, J.R. et al, 1991; Quiles, J.L. et al, 2001; Battino, M. et al, 2002a*). Además, el estrés oxidativo está relacionado con la composición lipídica de las membranas biológicas, de modo que una fuente grasa poliinsaturada (aceite de girasol, por ejemplo) generará membranas más susceptibles al daño oxidativo que una fuente saturada (grasa animal) o monoinsaturada (aceite de oliva), lo cual ha sido ampliamente demostrado en numerosas situaciones fisiológicas y patológicas y empleando numerosos modelos animales y humanos (*Ramírez-*

Tortosa, M.C. et al, 1999; Quiles, J.L. et al, 1999c; Battino, M. et al, 2002b; Quiles, J.L. et al, 2002; Ochoa, J.J. et al, 2002).

Por tanto, el tipo de grasa de la dieta va a condicionar la funcionalidad y la estructura mitocondriales así como la susceptibilidad de las mismas a ser atacadas oxidativamente. De este modo, si fuésemos capaces de construir membranas biológicas “a la carta” en función del tipo de grasa de la dieta seríamos capaces de condicionar positivamente la forma y el grado en que distintos órganos pudieran envejecer. Esta hipótesis de trabajo constituye un novedoso enfoque en la investigación del envejecimiento desde el punto de vista nutricional que podría tener importantes repercusiones en cuanto al tratamiento del fenómeno en sí. Además, podría ayudar a entender las diferencias que en cuanto al fenómeno del envejecimiento se observan entre poblaciones, de similar nivel socioeconómico pero con diferencias marcadas en cuanto a su dieta. Algo similar ha sido ya demostrado en el caso de patologías como el cáncer y la enfermedad cardiovascular. Así, se ha demostrado como poblaciones como la mediterránea, con una ingesta de grasa marcadamente diferente en cuanto a su tipo (aunque a veces incluso superior en cantidad) a la realizada en el norte de Europa o Estados Unidos presenta menores niveles de estas patologías (*Mataix, J., 2001*). Obviamente, otros factores aparte de la fuente grasa de la dieta están implicados en estas diferencias, pero el papel de la grasa es lo suficientemente importante como para ser tenido en cuenta y al igual que podría ocurrir en el caso del envejecimiento, desde el punto de vista de los mecanismos celulares y moleculares nos serviría para encontrar explicación a muchos de los fenómenos observados.

En base a las observaciones anteriores y con objeto de ensayar la hipótesis enunciada, nuestro grupo de investigación viene realizando desde mediados de los años noventa una serie de estudios en ratas basados en la alimentación de las mismas a lo largo de toda su vida con aceite de oliva virgen o aceite de girasol (*Huertas, J.R. et al, 1999; Quiles, J.L. et al, 2002b; Ochoa, J.J. et al, 2003; Quiles, J.L. et al, 2004a; Quiles, J.L. et al, 2004b*) y dentro de los cuales se encuentra esta memoria doctoral. Ambas grasas se usan debido a las diferencias en el perfil lipídico de ambas, así como por tratarse de las dos fuentes grasas mayoritarias en nuestra sociedad y por haber demostrado diferencias marcadas en patologías como las mencionadas en el párrafo anterior. En resumen, lo que se pretende investigar es si el tipo de grasa de la dieta es capaz de modular fenómenos mitocondriales relacionados con el envejecimiento tales como el estrés oxidativo o la alteración de la funcionalidad mitocondrial. Además, debido a que no todos los tejidos del organismo tienen la misma

susceptibilidad al daño oxidativo y parece que se comportan de un modo diferente ante el envejecimiento, realizamos nuestros experimentos en tejidos mitóticos, con capacidad de regeneración, como el hígado, y postmitóticos, sin capacidad de regeneración, como el músculo esquelético o el corazón y en el caso de esta tesis doctoral el tejido cerebral, tejido hasta el momento poco estudiado desde este abordaje nutricional.

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en los estudios anteriores permiten plantear un posible mecanismo causante de un diferente grado de estrés oxidativo durante el envejecimiento en función del tipo de tejido y el papel modulador del tipo de grasa de la dieta. En dicho mecanismo se hallarían implicados el perfil de ácidos grasos de la membrana mitocondrial, aspectos de la bioenergética mitocondrial así como la particular capacidad regenerativa y reparadora de los distintos tejidos (*Ochoa, J.J. et al, 2003*), siendo parte de esta tesis la comprobación de este posible mecanismo en el tejido cerebral.

CAPITULO III



MATERIAL Y MÉTODOS

1.- PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

Los reactivos y solventes empleados para las determinaciones analítica procedieron de los laboratorios Fluka (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany), Sigma (St. Louis, MO, USA), Panreac (Barcelona, España), Molécula Probe (The Netherlands) y Boehringer (Manheim, Germany), siendo todos ellos de la máxima calidad disponible en el mercado.

Los patrones para las determinaciones de vitaminas, proteínas y ácidos grasos fueron suministrados por Sigma y Fluka, los homólogos de CoQ₉ y CoQ₁₀ fueron cortesía de Pharmitalia (Milan, Italy).

Los aceites de oliva virgen y de girasol fueron adquiridos en un supermercado local. El coenzima Q₁₀ fue cortesía de Pharmitalia (Milan, Italia) y los demás componentes empleados en la elaboración de las dietas se adquirieron a través de Musal Chemical (Granada, España).

2.- APARATOS DE USO GENERAL

La conservación de las muestras mitocondriales y citosólicas de cerebro de rata empleadas en las determinaciones analíticas, se llevó a cabo en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, modelo REVCO (VLT-1786-5-VUA) (Revco Scientific, USA). Los tampones y en general las soluciones que debían mantenerse refrigeradas, se guardaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un frigorífico modelo LIEBHERR (Ochsenhausen, Germany).

La pesada de las muestras y de reactivos sólidos se realizó mediante una balanza de precisión SCALTEC, modelo SBA-32 (Denver Instruments, Weda, Holland).

El pH de las soluciones tamponantes se determinó con un electrodo combinado de pH (CRISON Instruments, S.A., Alella, Barcelona). Previo a cada medida, se realizó un calibrado de dicho electrodo, para lo cual se utilizaron dos soluciones de pH conocido (4.00 y 7.02) elaboradas también por CRISON.

La agitación de los tubos empleados en las distintas técnicas analíticas se realizó con un agitador manual modelo STUART SCIENTIFIC, AUTOVORTEX MIXER (Jepson Bolton's products, United Kingdom). Las soluciones reactivas se disolvieron por agitación en un magnetoagitador SELECTA, modelo Agimatic-E (Abrera, Barcelona, España).

Para los ensayos analíticos se utilizaron pipetas automáticas BIOHIT (Biohit Proline Pipette, Helsinki, Finland).

La incubación requerida en algunas determinaciones analíticas se llevó a cabo en un baño de capacidad 12 litros y máximo de temperatura 110 °C, MEMMERT (Schwabach, Germany).

Los aparatos de uso específico empleados se detallarán en cada una de las determinaciones analíticas realizadas.

3.- ANIMALES

Se emplearon 400 ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus*) de un peso inicial de 80-90 g, divididas en cuatro grupos experimentales de 100 ratas cada uno. El cuidado y mantenimiento de los animales se realizó en el Servicio de animales de laboratorio de la Universidad de Granada, dependiente del Centro de Instrumentación Científica de dicha universidad. En este Servicio los animales fueron convenientemente controlados por un veterinario y por personal adecuadamente cualificado, garantizándose así todos los parámetros de higiene, salubridad y habitabilidad de los animales.

Los animales fueron sometidos a un control de peso semanal.

Las jaulas se situaron en una habitación termorregulada a 22 ± 1 °C, con un 60% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12 horas de luz (8.00-20.00h) y 12 horas de oscuridad (20.00-8.00h).

4.- DIETAS

Las dietas semisintéticas empleadas se formularon según los criterios del AIN-93 (Reeves, PG. 1997) ligeramente modificada (la grasa se suministró en un 8%). En las **Tablas 5 y 6** se muestra su composición y la de los correctores utilizados.

Las dietas se prepararon semanalmente y eran almacenadas en oscuridad a 4°C para evitar enranciamientos y contaminaciones ambientales. En la **Tabla 7** se muestra la composición en ácidos grasos de las dietas.

Tabla 5.- Composición de la dieta.

- La grasa varía para cada grupo (aceite de oliva virgen y aceite de girasol).

<i>Componente</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Celulosa</i>	5.0
<i>Caseína</i>	17.5
<i>Almidón</i>	15.0
<i>Sacarosa</i>	47.5
<i>Grasa*</i>	8.0
<i>Corrector Vitamínico</i>	1.0
<i>Corrector Mineral</i>	3.5
<i>Colina</i>	0.2
<i>Metionina</i>	0.3
<i>Leche en polvo</i>	2.0

Tabla 6.- Corrector vitamínico y mineral de la dieta.

<i>Componente Vitamínico</i>	<i>mg/kg</i>	<i>Componente Mineral</i>	<i>mg/kg</i>
Tiamina	0.600	Fosfato cálcico dibásico	500.00
Riboflavina	0.600	Cloruro potásico	74.00
Piridoxina	0.700	Citrato potásico	220.00
A.Nicotínico	3.000	Sulfato potásico	52.00
Pantotenato cálcico	1.600	Óxido de magnesio	24.00
A.Fólico	0.200	Carbonato de manganeso	3.50
Biotina	0.020	Citrato férrico	6.00
Cianocobalamina	0.001	Carbonato de cinc	1.60
Vitaminas A+D	1.000	Carbonato de cobre	0.30
Vitamina E	10.000	Yoduro potásico	0.01
Vitamina K	0.005	Selenito sódico	0.01
Sacarosa	982.274	Sulfato crómico potásico	0.55
		Sacarosa	118.03

Tabla 7.- Contenido en ácidos grasos y α -tocoferol de las dietas experimentales.

	<i>ACEITE DE OLIVA VIRGEN (%)</i>	<i>ACEITE DE GIRASOL (%)</i>
<i>C16:0</i>	8.92	12.6
<i>C16:1n7</i>	1.06	0.2
<i>C18:0</i>	1.97	1.9
<i>C18:1n9</i>	78.73	24.1
<i>C18:2n6</i>	8.36	60.1
<i>C18:3n3</i>	0.96	1
<i>Saturados totales</i>	10.89	14.6
<i>Insaturados totales</i>	89.11	85.4
<i>Monoenos totales</i>	79.79	24.3
<i>Dienos totales</i>	9.32	60.1
<i>Dienos/ Monoenos</i>	0.1	2.4
<i>α-tocoferol (mg/kg)</i>	139.7+346.3*	486

*Se adicionó 346.3 mg/kg de α -tocoferol al aceite de oliva virgen para igualar su contenido al del aceite de girasol y así eliminar el posible efecto de las diferencias en el contenido de vitamina E en ambos aceites.

5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

En la **Figura 21** se muestra un esquema del diseño experimental.

Los animales se distribuyeron al azar en cuatro grupos en base a su dieta. Todas las ratas fueron alimentadas desde el destete y a lo largo del periodo experimental con dietas isoenergéticas preparadas en el Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Granada, variando entre los grupos exclusivamente en la fuente grasa y/ o la presencia del antioxidante coenzima Q. De acuerdo con esto se formaron los siguientes grupos:

- **Grupo aceite de oliva:** ratas alimentadas con una dieta compuesta en su fracción grasa (8% en peso) por aceite de oliva virgen extra.
- **Grupo aceite de girasol:** ratas alimentadas con una dieta compuesta en su fracción grasa (8% en peso) por aceite de girasol.
- **Grupo aceite de oliva + coenzima Q:** grupo similar al de aceite de oliva al que se añade en su dieta el antioxidante coenzima Q₁₀ (0,7 mg/ kg / día).
- **Grupo aceite de girasol + coenzima Q:** grupo similar al de aceite de girasol al que se añade en su dieta el antioxidante coenzima Q₁₀ (0,7 mg/ kg / día).

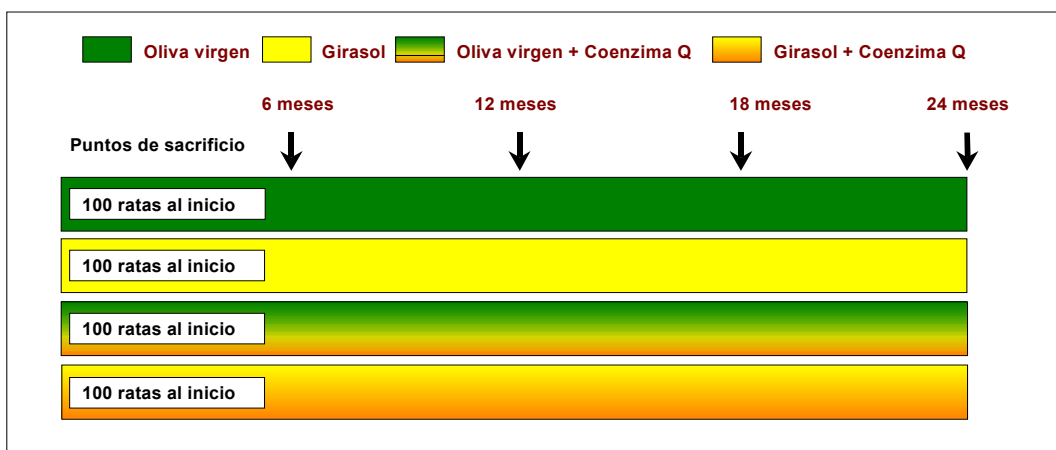


Figura 21.- Diseño experimental.

6.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE LOS ÓRGANOS

Se sacrificaron 8 animales por grupo a los 6, 12, 18 y 24 meses desde el inicio del experimento. El motivo de iniciar el estudio con un exceso de animales con respecto a los requeridos para el sacrificio se basa en la experiencia previa del grupo en referencia a la mortalidad de los mismos. Tras su sacrificio, por desnucación cervical y posterior decapitación por guillotina, se procedió a la obtención del órgano objeto de estudio, cerebro.

El cerebro, una vez extraído, fue lavado con suero fisiológico, secado y pesado, procesándose el mismo día. La homogenización del cerebro para obtención de mitocondrias y citosol se realizó utilizando un homogenizador mecánico, constituido por pistilo de teflón (HEILDOLF RZR1, Colonia, Alemania) y potter-Eveljheim de vidrio (AFORA, España). El cerebro se resuspendió en tampón de sacarosa (sacarosa 0,32M, Tris 10mM, EDTA-Na₂ 1mM) a continuación se homogenizó (Figura 22).



Figura 22.- Homogenado automático de un extracto cerebral. En todo momento las muestras fueron preservadas en hielo y oscuridad.

Posteriormente se centrifugó a 756 x g durante 10 minutos, (a partir de aquí las centrifugaciones se realizan a 4°C) en una centrífuga refrigerada modelo J-21 de BECKMAN (Palo Alto, California, USA). El sobrenadante se filtró con gasa y el filtrado se volvió a centrifugar, esta vez durante 20 minutos a 7740 x g, tras lo cual el precipitado resultante, que ya se trata de mitocondrias, se conservó a 4°C en un baño de hielo picado y en oscuridad.

El sobrenadante fue sometido a una nueva centrifugación a 12100 x g, tras lo cual, el precipitado, también constituido por mitocondrias, se unió al anterior y se volvió a centrifugar a 17400 x g durante 10 minutos. El precipitado obtenido de esta última centrífuga fue resuspendido en tampón sacarosa, repartido en viales eppendorff y congelado a -80°C hasta su análisis. El sobrenadante de la centrifuga a 12100 x g consistente en la fracción citosólica, se guardó en viales a -80°C.

7.- DETERMINACIONES EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO

7.1.- Determinación cuantitativa de proteínas (para mitocondrias y citosol)

Se ha llevado a cabo utilizando la técnica de Lowry et al (1951), basada en dos reacciones complementarias:

- Biuret, característica de grupos NH_3 que da color violeta.
- Folin, propia de grupos fenólicos con OH reductores que da color azul.

El reactivo de Biuret esta constituido por una mezcla 50:1 de solución A (CO_3Na_2 al 2% en una solución de NaOH 0.1 N) y solución B ($\text{SO}_4\text{Cu}.5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% y tartrato sódico al 1%).

Se utilizó un reactivo de Folin comercial, el cual fue diluido a la mitad con agua bidestilada.

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Se utilizaron 10 μl de membrana mitocondrial y 15 μl de citosol.

A la muestra se le adicionó 5ml de reactivo de Biuret, se agitó y esperó 15 minutos, al cabo de los cuales se añadieron 0.5 ml del reactivo de Folin, se agitó y se mantuvo 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Connecticut, USA) a 640 nm con paquete de software diseñado para el análisis espectrofotométrico UV-Winlab.

La concentración en proteínas se calculó mediante la realización de una curva patrón con albúmina sérica bovina.

7.2.- Determinación de la concentración de hidroperóxidos.

La cuantificación de hidroperóxidos en membranas mitocondrias de cerebro ha sido llevada a cabo utilizando el método de *Jiang et al (1992)* con ligeras modificaciones. La técnica está basada en la rápida formación de hidroperóxidos mediado por la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} en medio ácido. El Fe^{3+} forma un cromóforo con el xilenol orange que absorbe a 560 nm.

Se empleó el reactivo de Fox, el cual está compuesto por ácido sulfúrico 25 mM, BHT 4 mM, xilenol orange 100 μ M, sulfato de amonio y hierro (II) hexahidrato 250 μ M y metanol (90% v/v). El reactivo se protege de la luz, almacenándose en una botella oscura.

Se llevaron a cabo dos determinaciones:

a.- Una primera determinación basal (T0), permite conocer el nivel de hidroperóxidos existente en las muestras. Para ello se adicionó a la muestra 0.9 ml de Fox/ml de volumen final, se esperó 60 minutos (manteniendo la muestra en oscuridad) y se lee en espectrofotómetro a 560 nm.

b.- Una segunda determinación (T1) en la cual se induce la peroxidación mediante la adición de 20 μ l de AAPH (2,2'azobis amidinopropano) 2 mM, compuesto hidrosoluble que genera radicales libres a una velocidad constante, para ello se incubó la muestra y el AAPH a 37°C durante 30 minutos, se adicionó el Fox y tras 60 minutos se lee a 560 nm.

La concentración de hidroperóxidos, tanto basales como inducidos, se calculó mediante la aplicación de la ecuación de Lambert Beer, con un coeficiente de extinción molar de $4,7 * 10^4 M^{-1} * cm^{-1}$.

7.3.- Cuantificación de especies reactivas del oxígeno (ERO)

La producción de EROs (incluyendo anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y también hidroperóxidos lipídicos) por la mitocondria, especialmente peróxido de hidrógeno, fue cuantificada mediante el ensayo fluorimétrico de la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), usando la técnica descrita por Degli (2002), con pequeñas modificaciones. Este método está basado en la emisión de un intenso fluorescente verde tras la eliminación del diacetato y posterior oxidación de la DCFH-DA, especialmente por peróxido de hidrógeno. El producto fluorescente, DCF, puede ser cuantificado.

Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Las muestras, aproximadamente 50 µg de proteína, fueron depositadas en microplacas de 96 pocillos y mezcladas con PBS hasta alcanzar un volumen final de 200 µl. Tras agitación, se le adicionó la sonda DCFH-DA, en una concentración en el pocillo de 1 µM y la reacción se inició mediante la adición de un sustrato mitocondrial, el ácido succínico (10 µl de una solución 5 mM). Las muestras se agitaron e incubaron aproximadamente 40 minutos a 37° C. Los cambios de intensidad de fluorescencia fueron leídos en intervalos de 5 minutos durante 30 minutos en un espectrofluorímetro a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión a 520 nm y con un ancho de banda (bandwidths) de 5 nm. El incremento de fluorescencia es expresado en miliunidades arbitrarias de fluorescencia.

7.4.- Perfil lipídico en membranas mitocondriales

Para la determinación de los ácidos grasos se ha empleado la técnica de *Lepage y Roy (1986)*, mediante la cual se puede hacer en un solo paso la metilación y transesterificación de las muestras. Se partió de 100 µl de muestra a la que se adicionó 2 ml de una mezcla de metanol:benceno (4:1) y 200 µl de cloruro de acetilo, se agitó, se cerraron los tubos y se incubaron durante una hora en un baño a 100°C. Al cabo de este tiempo se sacaron los tubos y se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación se adicionaron 2 ml de una disolución de carbonato potásico al 5% que tiene por objeto parar la reacción y neutralizarla, y se centrifugó durante 15 minutos a 2500 x g con el fin de separar las fases. La fase superior bencénica fue retirada con pipeta pasteur y conservada con la fracción lipídica. Posteriormente se evaporó bajo corriente de nitrógeno y los lípidos que quedaron en el fondo del tubo son resuspendidos en 50 µl de hexano para ser analizados en el cromatógrafo de gases modelo HP-5890 Series II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipado con un detector de ionización de llama, inyector automático Hewlett Packard 7673A y un integrador

Hewlett Packard 3393A. Se empleó una columna SPTM 2330 F.S (Supelco Inc. Bellefonte, Palo Alto, CA, USA) de 60 m de longitud, 32 mm de i.d. y un grosor de 20 mm. El método tiene una duración de 40 minutos y la siguiente rampa de temperatura: 5 minutos a 160°C; 6 °C/min hasta alcanzar los 195°C; 4 °C/min hasta los 220°C; 2 °C/min hasta los 230°C; 12 minutos a 230°C y 14 °C/min hasta 160°C. Se ha realizado la determinación cualitativa de los lípidos de membrana, por lo que los resultados han sido expresados como porcentaje el total de ácidos grasos detectados en el cromatograma. En la **Figura 23** se muestra un cromatograma típico de los obtenidos con una muestra de membrana mitocondrial.

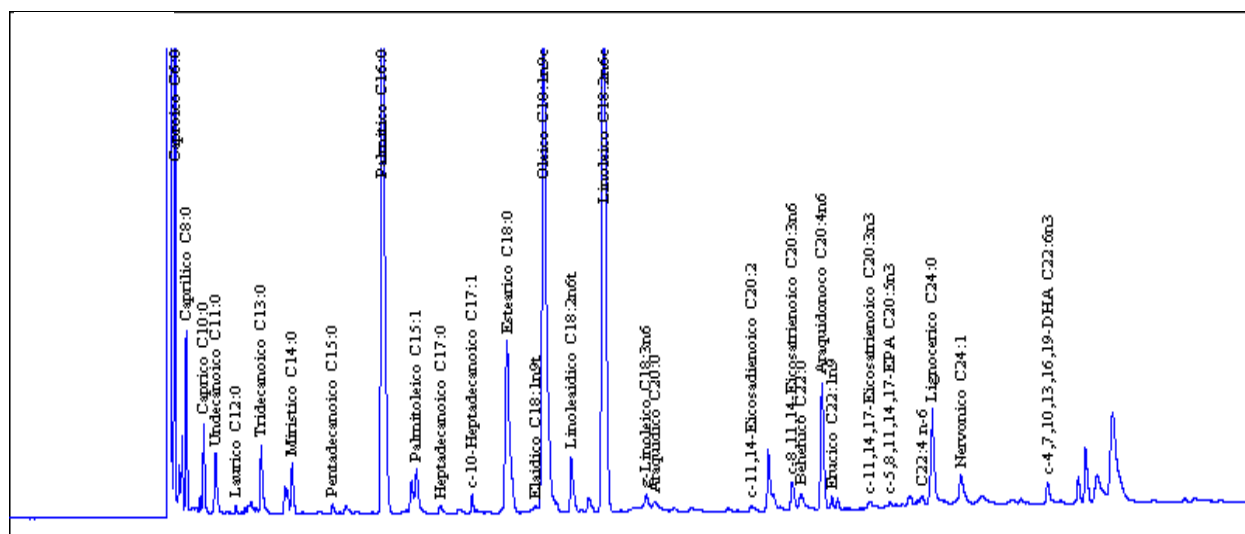


Figura 23.- Cromatograma típico de una muestra de membrana mitocondrial.

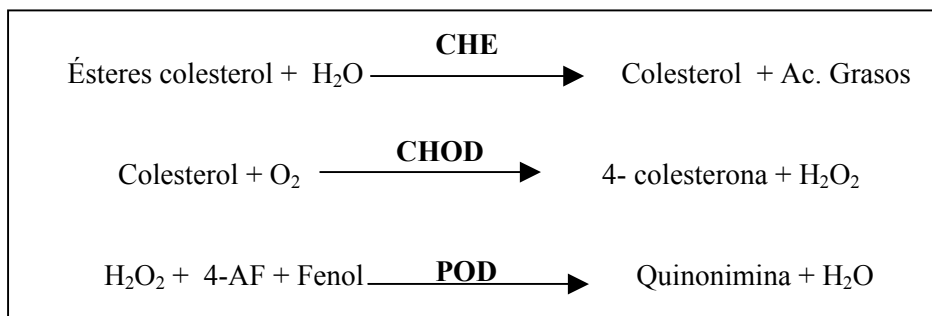
El índice de peroxidación se trata de una simple ecuación que se realiza tras la determinación del contenido en ácidos grasos (Lee *et al*, 1999).

El índice de peroxidabilidad = (% ácidos dienoicos x 1) + (% ácidos trienoicos x 2) + (% ácidos tetraenoicos x 3) + (% ácidos pentaenoicos x 4) + (% ácidos hexaenoicos x 5).

7.5.- Determinación de colesterol en membranas mitocondriales

El colesterol en mitocondrias de cerebro se determinó mediante un kit comercial de Spinreact (Barcelona, España), con pequeñas modificaciones indicadas por la casa comercial.

El kit está basado en reacciones enzimáticas-colorimétricas (CHOD-PAP) según el método descrito por Richmond *et al* (1972) y Fasce *et al* (1982):



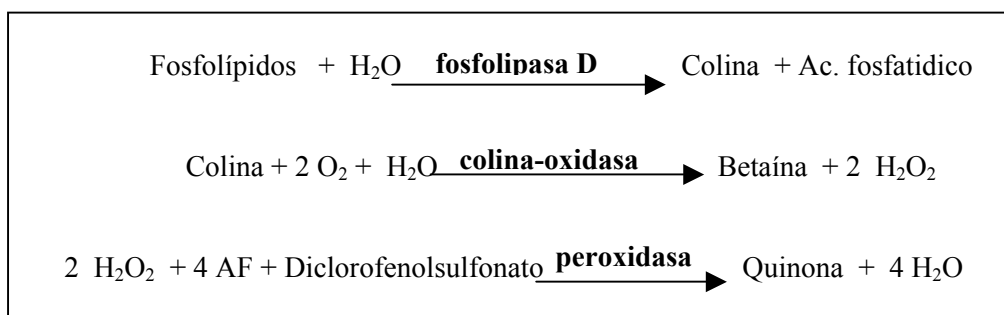
CHE: *coolesterol esterasa*; CHOD: *coolesterol oxidasa*; POD: *peroxidasa*

A la muestra (4 µl) se le adicionaron los reactivos preparados según las indicaciones de la casa comercial y tras una incubación a 37° C durante 5 minutos se procedió a su lectura a una longitud de onda de 505 nm, empleando cubetas de 1 cm de espesor. El equipo se ajustó a cero con el blanco de reactivos.

La concentración de colesterol fue calculada utilizando un estándar de colesterol procedente de la casa comercial.

7.6.- Determinación de fosfolípidos en membranas mitocondriales

El colesterol en mitocondrias de cerebro se determinó mediante un kit comercial enzimático-colorimétrico, según el método descrito por Siedel et al (1983), Kattermann et al (1984) y Trinder (1969) y basado en la siguientes reacciones:



La cantidad de quinona formada es proporcional a la cantidad de fosfolípidos presentes en la muestra.

A la muestra (5 μ l) se le adicionaron los reactivos preparados según las indicaciones de la casa comercial y tras una incubación a 37° C durante 5 minutos se procedió a su lectura a una longitud de onda de 505 nm con una cubeta de 1 cm de espesor, frente al blanco de reactivo.

La concentración de fosfolípidos fue calculada utilizando un estándar de fosfolípidos procedente de la casa comercial.

7.7.- Determinación de fluidez de membrana mitocondrial mediante polarización de fluorescencia

El principio en el cual se basa la polarización de fluorescencia es el de que si una molécula fluorescente es excitada por la luz polarizada, tiene la posibilidad de reorientarse durante el periodo de duración de dicha excitación, siendo la orientación de la luz de fluorescencia emitida dependiente del grado de reajuste molecular.

El conocimiento del grado de polarización de fluorescencia de una molécula nos da información del grado de orden y de movilidad molecular del sistema en el que está insertada. El instrumento que nos permite evaluar este parámetro es un fluorímetro dotado de polarizador.

El instrumento utilizado es un Perkin Elmer LS 50, presentando dos componentes básicos, el componente excitador del polarizador y el de emisión.

La polarización es calculada según la ecuación siguiente:

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VHg}}{I_{VV} + I_{VHg}}$$

donde P es la polarización, I_{VV} es la intensidad de la luz polarizada verticalmente paralela al plano de excitación, I_{VH} es la intensidad de emisión de luz polarizada horizontalmente perpendicular al plano y g es un valor conocido (I_{VH}/I_{VV}) y que nos da el error del aparato.

A mayor polarización menor es la fluidez, es decir, una polarización alta indica un menor grado de incorporación de la sonda a la membrana y por lo tanto una menor fluidez de ésta.

Hay que tener en cuenta dos aspectos:

a.- La polarización no varía con el tiempo, pero si se ve influencia por la temperatura (la lectura se realiza a 371°C).

b.- Las membranas biológicas presentan una fluorescencia intrínseca debida básicamente, a la presencia de aminoácidos del tipo de tirosina, fenilalanina y fundamentalmente triptófano. Para calcular esa fluorescencia propia se hace lo que se denomina Scattering inicial, que nos permite conocer la intensidad de fluorescencia presentada por la muestra antes de adicionar las sondas.

En este estudio se han utilizado dos sondas distintas:

- DPH.- Todo trans 1,6 difenil-1,3,5 hexatrieno
- TMA-DPH.- 1-(4-(trimetil amino fenil)-6)fenil 1,3,5 hexatrieno

Estas sondas se localizan o insertan en lugares distintos de la membrana en base a su carácter más o menos lipofílico (*Figura 24*).

Para nuestras determinaciones se ha partido de 200 µg de proteína, a los que se añade tampón de sacarosa (del empleado para la resuspensión de mitocondrias en su aislamiento inicial) hasta llegar a un volumen de 2 ml. Se agita y se lleva a una cubeta de cuarzo especial para fluorescencia (ninguna de sus paredes es opaca, por lo que la lectura se realiza por todas ellas), y se lee la intensidad inicial (“Scattering inicial”).

A continuación se sacan las cubetas y se añaden 2 µl de la sonda (DPH o TMA-DPH), las cuales se encuentran a una concentración de 1 mM en tetrahidrofurano; se agita y se lee la intensidad con sonda.

Tras la lectura las cubetas son sacadas del fluorímetro, que siempre se mantiene a 370°C y se incuban en oscuridad durante 20 minutos a 251°C, con el fin de que la sonda se incorpore a la membrana. Al cabo del tiempo se lee el valor de P por triplicado.

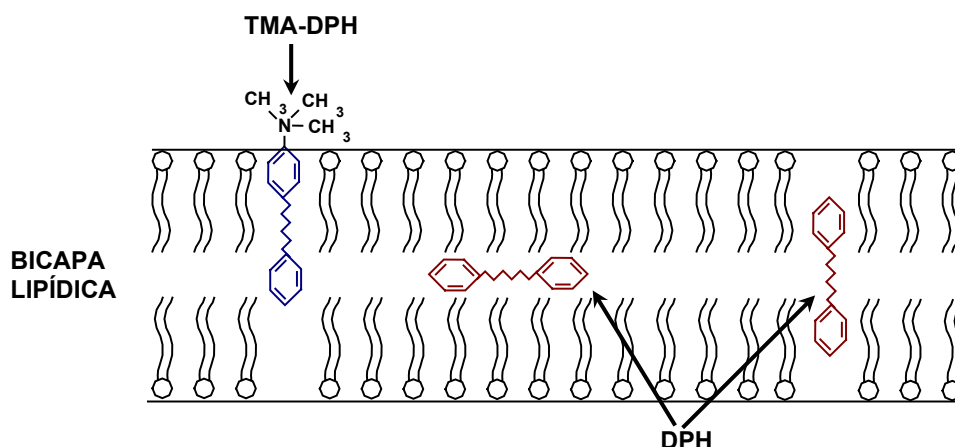


Figura 24.- Esquema de la incorporación de las sondas utilizadas en la membrana.

7.8.- Extracción y determinación de coenzima Q₉, coenzima Q₁₀ y tocoferol por HPLC en mitocondrias de cerebro.

Las ubiquinonas (Q₉ y Q₁₀), han sido extraídas mediante una mezcla de etanol:éter de petróleo (60:40) utilizando el método de Kroger (1978) y analizadas en HPLC según la técnica descrita por Battino et al (2001); paralelamente con esta misma extracción se ha podido identificar el α-tocoferol de las mitocondrias de rata.

Para la extracción se partió de 0,8 mg de proteína de membrana, que se llevó a 0,5 ml con agua bidestilada y se adicionaron 2,5 ml de la mezcla antes descrita de etanol: éter de petróleo. Tras la agitación intensa en vortex, se centrifugaron a 2500 x g durante 5 minutos (a 4°C de temperatura) en una centrifuga de brazos oscilantes Beckman GS-6R (BECKMAN, Fullerton, CA, USA) con el fin de que las fases quedaran perfectamente definidas. Posteriormente se tomó la fase superior etérea y se pasó a otro tubo que se guarda a 4°C, se añade 1 ml de éter de petróleo al tubo primitivo, se centrifugó de nuevo y se recogió otra vez la fase superior. Una vez unidas las dos

extracciones se cerraron los tubos perfectamente y se guardan a -20°C hasta su análisis.

Todas las extracciones de un mismo grupo se realizaron el mismo día utilizando siempre hielo picado y preservando de la luz en cada paso. El día de la analítica se secaron bajo corriente de nitrógeno y resuspendieron en $100\ \mu\text{l}$ de fase móvil.

La separación cromatográfica se realizó por HPLC, en fase reversa, utilizando una columna SPHERISORB S5 ODS I de $18\times 0,46\ \text{cm}$ (BECKMAN, Palo Alto, California, USA) con una precolumna del mismo relleno que la columna principal. El instrumento utilizado ha sido un BECKMAN SYSTEM GOLD equipado con un detector Diode Array 168 y un horno de columna (BECKMAN) para garantizar que todos los análisis se realicen a 22°C . La fase móvil utilizada se ha preparado con etanol para HPLC y agua bidestilada en proporción 97:3. La velocidad de flujo empleada fue de $1\ \text{ml}/\text{minuto}$ utilizando un inyector automático WatersTM 717 plus Autosampler (GenTech Scientific, NY, USA).

Las determinaciones tanto de CoQ como de α -tocoferol se han calibrado con estándares puros de cada compuesto mediante la lectura en espectrofotómetro de las diluciones de esos patrones en solución etanólica y su posterior inyección de forma seriada en el HPLC. De este modo se construyeron curvas patrón de las respectivas moléculas (Figura 25).

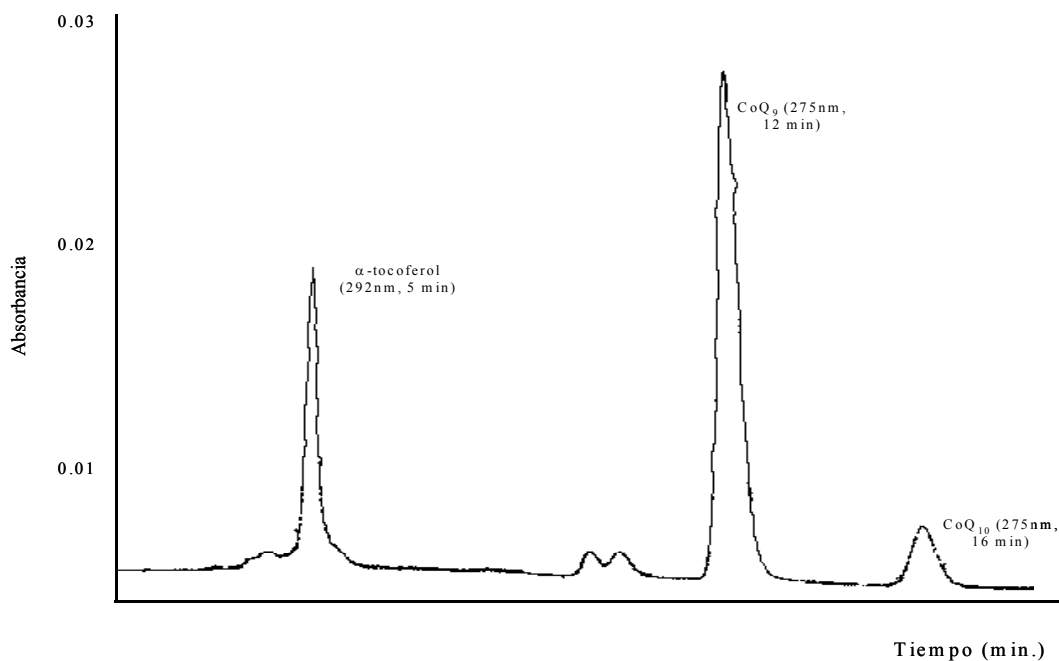
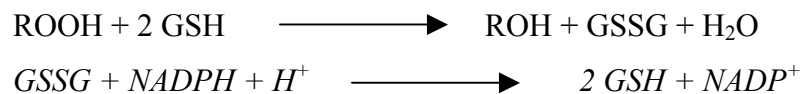


Figura 25.- Curva patrón de α -tocoferol, CoQ_9 y CoQ_{10} en HPLC.

8.- DETERMINACIONES EN CITOSOL DE CEREBRO

8.1.- *Determinación de la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa*

Se ha seguido la técnica descrita por *Flohe y Wolfgang (1984)*. El método se fundamenta en la formación instantánea de glutatión oxidado durante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa que continuamente es reducido por un exceso de glutatión reductasa activa y NADPH presentes en la cubeta. La consecuente oxidación de NADPH a $NADP^+$ es monitorizada fotométricamente a 340 nm y a 37° C.



La reacción que interesa es la parte enzimática (interviene la glutatión peroxidasa) dependiente de hidroperóxidos, por lo que hay que eliminar la independiente de hidroperóxidos y la reacción no enzimática (no interviene la glutatión peroxidasa).

Para la citada determinación se mezclan 700 µl de tampón fosfato potásico 0.1 M a pH 7.0 (al tampón se le adicionó EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM), 100 µl de glutatión reductasa (2.4 U/ml en tampón sin azida), 100 µl de NADPH 10 mM en una solución de NaHCO_3 al 0.1% , 100 µl de glutatión reducido 10 mM en tampón sin azida y 5 µl de una dilución 90:10 (agua:citosol) de citosol de hígado o 20 µl de citosol de corazón.

Se incuba a 37° C durante 3 minutos, tras los cuales se trasladan a una cubeta de 1 ml y se adicionan 100 µl de H_2O_2 12 mM, que dispara la reacción, monitorizando el descenso de NADPH a 340 nm durante 5 minutos en presencia de un blanco con igual contenido salvo el H_2O_2 .

El descenso no enzimático se elimina haciendo otra lectura en la que la muestra es reemplazada por tampón y la lectura se realiza frente a un blanco sin muestra ni H_2O_2 , monitorizándose igual que en el caso anterior. El valor obtenido en esta determinación se resta al obtenido en la determinación anterior obteniéndose así el descenso enzimático dependiente de peróxido que es el que interesa. El resultado se expresa en unidades de actividad/ mg de proteína según la ecuación:

$$A = ((\Delta \log [\text{GSH}]/t \times (\Delta[\text{NADPH}]/[\text{GSH}]_0 \times t)) \times (V_i/V_f))$$

8.2.- Determinación de la actividad de la catalasa

La técnica utilizada sigue el método descrito por *Hugo Aebi (1974)*. Este método se basa en un seguimiento de la descomposición de H_2O_2 para dar H_2O y O_2 mediante espectrofotometría a 240 nm como consecuencia de la actividad catalítica de la catalasa.

Para esta determinación en una cubeta de cuarzo de 3 ml se adicionan 200 μ l de una dilución del citosol en agua bidestilada (50:950), a los que se añaden 1800 μ l de tampón fosfato 50 mM (compuesto por KH_2PO_4 50 mM y $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 50 mM a pH 7.0). Se adicionan 1000 μ l de H_2O_2 30 mM, se agita rápidamente y se observa el descenso de absorbancia de H_2O_2 a 240 nm durante un minuto a 20°C, frente a un blanco con 2800 μ l de tampón fosfato y 200 μ l de la dilución de citosol.

Para el cálculo de las unidades se recomienda el uso de una constante de reacción de 1^{er} orden (K) ya que este es el tipo de reacción seguida por la descomposición del H_2O_2 , con concentraciones relativamente bajas de sustrato. Esto se debe a que no se puede medir la actividad enzimática a través de la saturación, debido a la formación de complejos inactivos a las concentraciones de H_2O_2 de saturación.

La constante (K) para toda la reacción viene determinada a través de la ecuación:

$$K = (2.3/\Delta t) (\log A_1/A_2) (\text{seg}^{-1})$$

En la cual $\Delta t = t_2 - t_1$ intervalo de tiempo y donde A_1 y A_2 = Absorbancia en el tiempo 1 y 2.

Para expresar las unidades en términos de actividad específica se usa el valor K/ml citosol o K/mg proteína.

8.3.- Determinación de la actividad superóxido dismutasa

Se ha utilizado la técnica de *Fridovich et al, (1975)* ligeramente modificada. El método está basado en la inhibición que ejerce la SOD sobre la reducción del citocromo C medida espectrofotométricamente a 550 nm.

El citocromo C se reduce en presencia de anión superóxido, por lo cual se crea *in vitro* un sistema productor de anión superóxido, el sistema xantina-xantina oxidasa, y se observa como la SOD compite con el citocromo c por este anión superóxido a través de un descenso en la producción de citocromo c reducido.

Las lecturas se realizaron a 25° C, monitorizando la formación de citocromo c reducido durante un periodo de 2 minutos a 550 nm.

Lo primero es crear un patrón de reducción del citocromo c, para lo cual en una cubeta de 1 ml se mezclan 100 µl de solución de citocromo c 0.1 M en tampón sin azida, 100 µl de xantina 0.0005 M en tampón sin azida y 650 µl de tampón carbonato/bicarbonato (compuesto por Na₂CO₃ 0.02 M y NaHCO₃ 0.02M ajustado a pH 10. A continuación se le añade EDTA 0.001M y azida sódica 0.1 mM (con el fin de inhibir peroxidasa, sin que se afecte la SOD)), y posteriormente se adiciona una cantidad de xantina-oxidasa suficiente para obtener una reducción de citocromo c de 0.025 a 0.05 unidades de absorbancia por minuto.

Una vez determinada la cantidad de xantina-oxidasa necesaria, se procedió a la determinación de la actividad SOD de las muestras, para lo cual en una cubeta de 1 ml se adicionan 100 µl de solución de citocromo c, 100 µl de solución de xantina, 650 µl de tampón carbonato/bicarbonato y 10 µl de citosol. La reacción se dispara con la adición de la cantidad de xantina-oxidasa determinada anteriormente. Se monitoriza el descenso en la absorbancia de citocromo c reducido a 550 nm durante 2 minutos.

Los resultados se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Una unidad de actividad corresponde a una inhibición del 50% de la reducción del citocromo c.

9.- Expresión de los resultados y tratamiento estadístico realizado

Las determinaciones, en general, han sido realizadas por duplicado, dando como valor la media de las dos determinaciones. A su vez se ha realizado un tratamiento estadístico básico en cada uno de los dos grupos y parámetros, por lo que los resultados se expresan como media ± error estándar de la media para cada grupo y parámetro estudiado.

Para averiguar la existencia o no de diferencias significativas entre grupos se le ha aplicado un análisis de la varianza (ONE WAY), conjuntamente con un test *post ho*, el test de Duncan, con un grado de significación del 95%.

Todo el tratamiento estadístico se ha realizado con el paquete informático SPSS/PC para windows, versión 12.0 en español.

La significación de la simbología estadística es la siguiente:

a = Diferencias significativas dentro de un mismo grupo de grasa entre 12, 18 y 24 meses con respecto a los 6 meses

b = 18 y 24 meses con respecto a los 12 meses

c = 24 contra 18 meses

* = Diferencias significativas para un mismo tiempo entre Oliva + Q, Girasol y Girasol + Q respecto a Oliva

▲ = Girasol y Girasol + Q con respecto a oliva

■ = Girasol contra Girasol + Q

CAPITULO IV

RESULTADOS

1.- PESO DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS

Como se observa en la *Figura 26* hallamos un incremento del peso para todos los grupos a lo largo del tiempo, encontrándose algunas diferencias significativas entre ellos.

Los animales alimentados con aceite de oliva virgen suplementado con coenzima Q₁₀ (VQ) y los alimentados con aceite de girasol sin suplementar (G) fueron los únicos en mostrar diferencias significativas a los 12 meses con respecto a los 6 meses de edad (418 ± 13 g vs. 341 ± 12 g y 432 ± 21 g vs. 356 ± 26 g, respectivamente). A lo 18 meses todos los grupos objeto de estudio mostraron un peso superior al encontrado a los 6 meses, siendo los grupos girasol (G) y girasol suplementado con coenzima Q₁₀ (GQ) los únicos en mostrar en este periodo de tiempo un peso mayor que el observado a los 12 meses (562 ± 26 g vs. 432 ± 21 g y 475 ± 14 g vs. 404 ± 18 g, respectivamente). A los 24 meses de edad se observó en todos los grupos de animales un mayor peso que el encontrado a los 6 y 12 meses e incluso mayor que a los 18 meses para los dos grupos suplementados con coenzima Q₁₀ (VQ y GQ) (533 ± 24 vs. 462 ± 19 g y 561 ± 32 g vs. 475 ± 14 g, respectivamente)

Para cada periodo de tiempo estudiado se observaron diferencias significativas entre algunos de los grupos de estudio.

A los 6 meses de edad el grupo VQ mostró menor peso que los grupos de ratas alimentados con aceite de oliva virgen sin suplementar (V) y aceite de girasol suplementado con coenzima Q₁₀ (GQ) (341 ± 12 g vs. 401 ± 21 g y 396 ± 11 g, respectivamente). A los 18 meses fue el grupo G el que mostró mayor peso que los grupos VQ y GQ (562 ± 26 g vs. 462 ± 19 g y 475 ± 14 g, respectivamente). A los 12 y 24 meses de edad todos los grupos mostraron un peso similar.

2.- PESO DE LOS CEREBROS

Respecto al peso del cerebro (*Figura 26*), no se observó la existencia de diferencias significativas ni a lo largo del tiempo, ni entre los distintos grupos de animales alimentados con las dietas experimentales utilizadas.

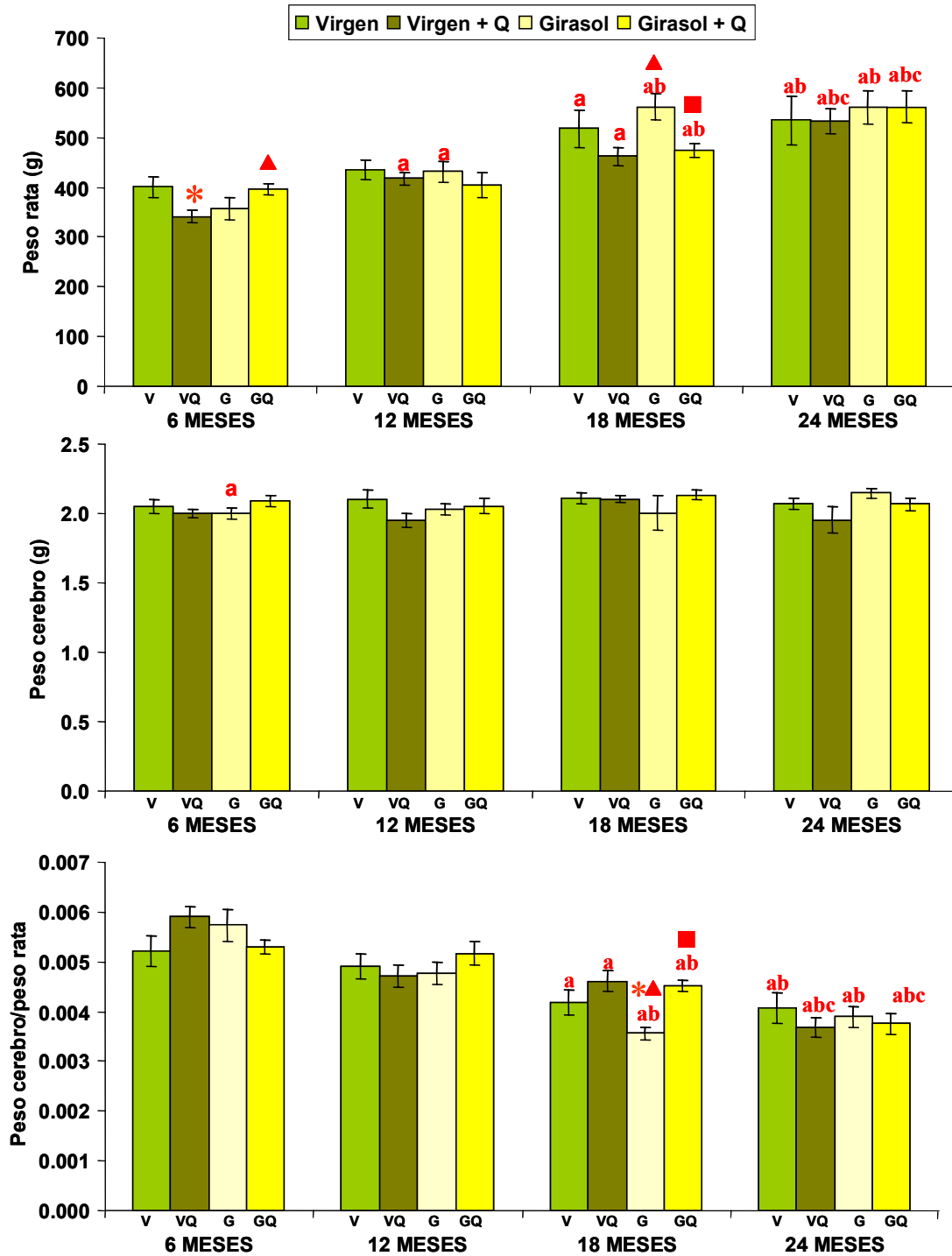


Figura 26.- Evolución del peso de los animales de experimentación, del peso cerebral de los mismos y relación peso de cerebro/peso de la rata

Un parámetro interesante a considerar es la relación peso cerebro/ peso de la rata. En este sentido, la **Figura 26** muestra el valor obtenido para la citada relación. De forma global, se observó una disminución de este valor a lo largo del tiempo de estudio, aunque con diferencias significativas dentro de cada grupo.

A los 24 meses de edad todos los grupos presentaron un valor para este parámetro inferior al observado a los 6 y 12 meses, siendo incluso para los animales suplementados con coenzima Q₁₀ (VQ y GQ) inferior al encontrado a los 18 meses de edad (0.004 ± 0.0002 g vs. 0.005 ± 0.0002 g y 0.004 ± 0.0002 g vs. 0.005 ± 0.0001 g, respectivamente). Al igual que a los 24 meses de edad, a los 18 meses todos los grupos mostraron un menor valor que el encontrado a los 6 meses, siendo en este periodo de tiempo los grupos alimentados con el fuente grasa girasol (G y GQ) los que mostraron un coeficiente menor que el encontrado a los 12 meses. Finalmente, a los 12 meses solo los grupos VQ y G mostraron diferencias significativas con respecto a los 6 meses (0.005 ± 0.0002 g vs. 0.006 ± 0.0002 g y 0.005 ± 0.0002 g vs. 0.006 ± 0.0003 , respectivamente)

Para un mismo periodo de tiempo también se observaron algunas diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio. Así, a los 18 meses el grupo de animales alimentados con aceite de girasol sin suplementar mostró un menor valor para este parámetro que los encontrados en los grupos V, VQ y GQ. No habiéndose observado más diferencias entre los grupos para un mismo periodo de tiempo ni al inicio ni al final del estudio.

3.- NIVELES DE HIDROPERÓXIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

3.1.- NIVELES DE HIDROPERÓXIDOS BASALES (T0)

Como se muestra en la **Figura 27** se encontró un incremento en los niveles de hidroperóxidos basales para todos los grupos de estudio a lo largo del tiempo, aunque con diferencias significativas entre ellos.

Todos los grupos mostraron a los 12, 18 y 24 meses un contenido en hidroperóxidos basales superior al observado a los 6 meses de edad. A los 18 meses, se observó un descenso de este parámetro en los dos grupos de aceites no suplementados, V y G, respecto al periodo anterior, 12 meses ($29,0 \pm 1.6$ nmoles/mg vs. $35.8 \pm$

1.3nmoles/mg y 37.7 ± 1.4 nmoles/mg vs. 40.7 ± 0.7 nmoles/mg, respectivamente). A los 24 meses, el aumento es significativo en todos los grupos frente a cada uno de los diferentes periodos de estudio, es decir, frente a los 6, 12 y 18 meses.

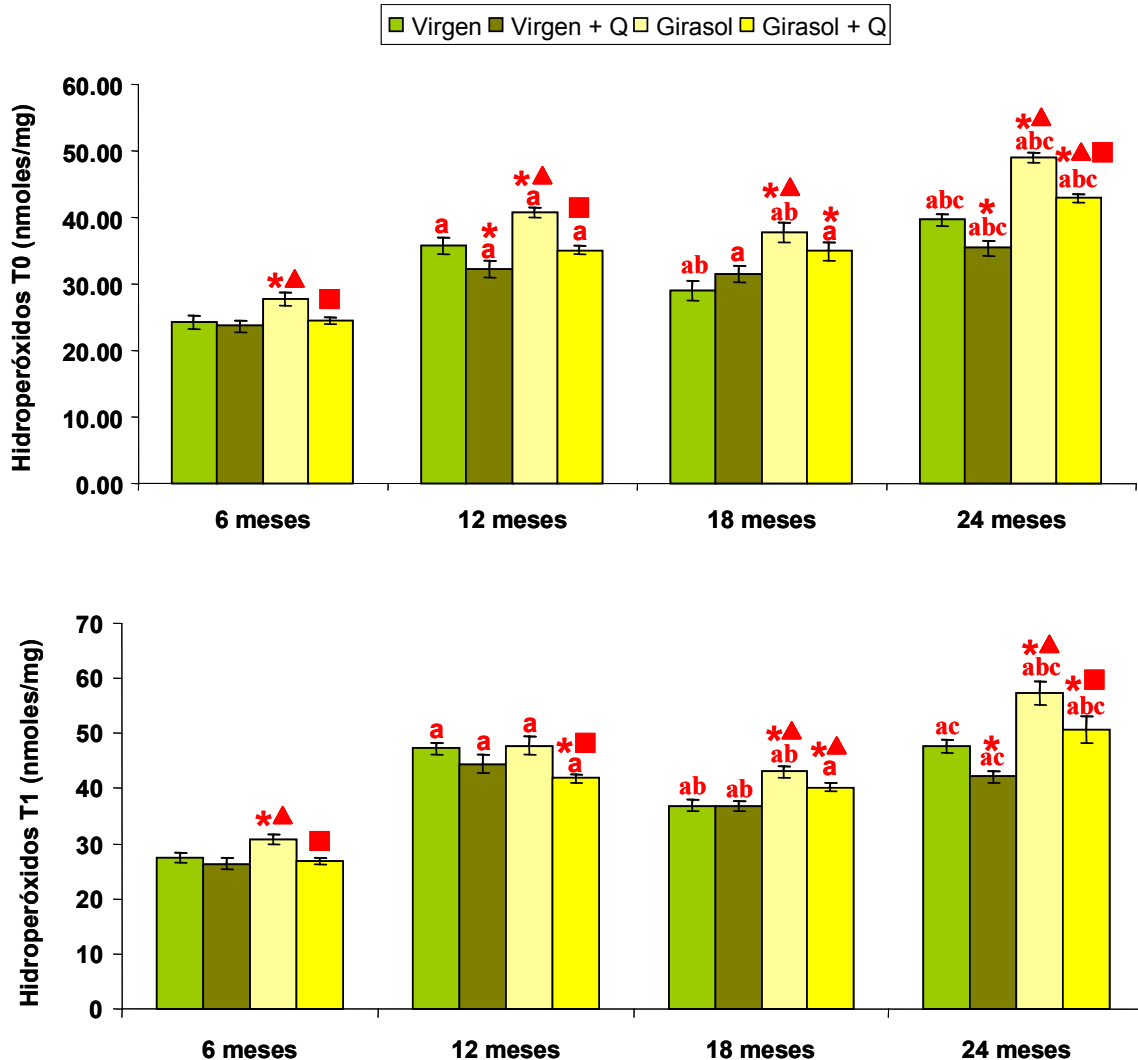


Figura 27.- Niveles de hidroperóxidos basales (T0) e inducidos (T1) en membranas mitocondriales de cerebro

Con respecto a las diferencias significativas entre grupos para cada periodo de estudio se observó que a los 6, 12 y 24 meses de edad, el grupo de ratas alimentado con aceite de girasol sin suplementar mostró niveles de hidroperóxidos superiores a los observados en los tres grupos restantes, siendo estas diferencias también significativas a los 18 meses con respecto a los grupos V y VQ. El grupo VQ mostró, además, valores inferiores a los encontrados en el grupo V a los 12 y 24 meses (32.2 ± 1.2 nmoles/mg

vs. 35.8 ± 1.3 nmoles/mg y 35.4 ± 1.1 nmoles/mg vs. 39.7 ± 0.9 nmoles/mg, respectivamente) y a los encontrados en el grupo GQ a los 24 meses de edad (35.4 ± 1.1 nmoles/mg vs. 42.9 ± 0.7 nmoles/mg). Finalmente, el grupo V mostró a los 18 y 24 meses de edad un menor contenido en hidroperóxidos basales que el mostrado por el grupo GQ (29.0 ± 1.6 nmoles/mg vs. 34.9 ± 1.3 nmoles/mg y 39.7 ± 0.9 nmoles/mg vs. 42.9 ± 0.7 nmoles/mg, respectivamente).

3.2.- NIVELES DE HIDROPERÓXIDOS INDUCIDOS (T1)

El contenido de hidroperóxidos obtenido tras la inducción *in vitro* de daño oxidativo mediante la adición de AAPH (**Figura 27**) mostró un incremento asociado al tiempo, comportamiento por lo tanto similar al observado para los hidroperóxidos basales.

Todos los grupos de animales mostraron a los 12, 18 y 24 meses de edad un aumento significativo en el nivel de hidroperóxidos inducidos frente a los niveles encontrados a los 6 meses. A los 18 meses los grupos V, VQ y G mostraron una disminución en los niveles de este parámetro con respecto a los 12 meses, aumentando a los 24 meses en todos los grupos con diferencias significativas respecto a los 18 meses, aunque sin diferenciarse con respecto a los valores encontrados a los 12 meses salvo para los grupos de animales alimentados con aceite de girasol (G y GQ).

En todos los periodos de tiempo se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de animales alimentados con las diferentes dietas objeto de estudio. Estas diferencias vuelven a ser similares a las encontradas en el contenido en hidroperóxidos basales.

El grupo de animales alimentados con aceite de girasol sin suplementar mostró mayores valores de hidroperóxidos tras la inducción que los encontrados en los grupos Vy VQ a los 6, 18 y 24 meses y que los encontrados en el grupo GQ a los 12 y 24 meses de edad. Las ratas alimentadas con aceite de girasol suplementado con coenzima Q₁₀ mostraron mayores valores que el grupo V a los 12 y 18 meses (41.9 ± 0.8 nmoles/mg vs. 47.3 ± 1.0 nmoles/mg y 40.2 ± 0.9 nmoles/mg vs. 36.9 ± 1.0 nmoles/mg, respectivamente) y que el grupo VQ a los 18 y 24 meses de edad (40.2 ± 0.9 nmoles/mg vs. 36.9 ± 1.0 nmoles/mg y 50.7 ± 2.3 vs. 42.2 ± 1.1 nmoles/mg, respectivamente). Finalmente, el grupo de animales alimentado con aceite de oliva suplementado mostró unos menores niveles de hidroperóxidos inducidos que el grupo alimentado con la

misma fuente grasa sin suplementar a los 24 meses de edad (42.2 ± 1.1 nmoles/mg vs. 47.7 ± 1.1 nmoles/mg)

4.- CONTENIDO EN α -TOCOFEROL EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

La **Figura 28** representa la evolución de este importante antioxidante liposoluble, mostrando un incremento en los niveles del mismo en los diferentes grupos experimentales con respecto a los 6 meses de vida. Las diferencias significativas halladas se comentan a continuación.

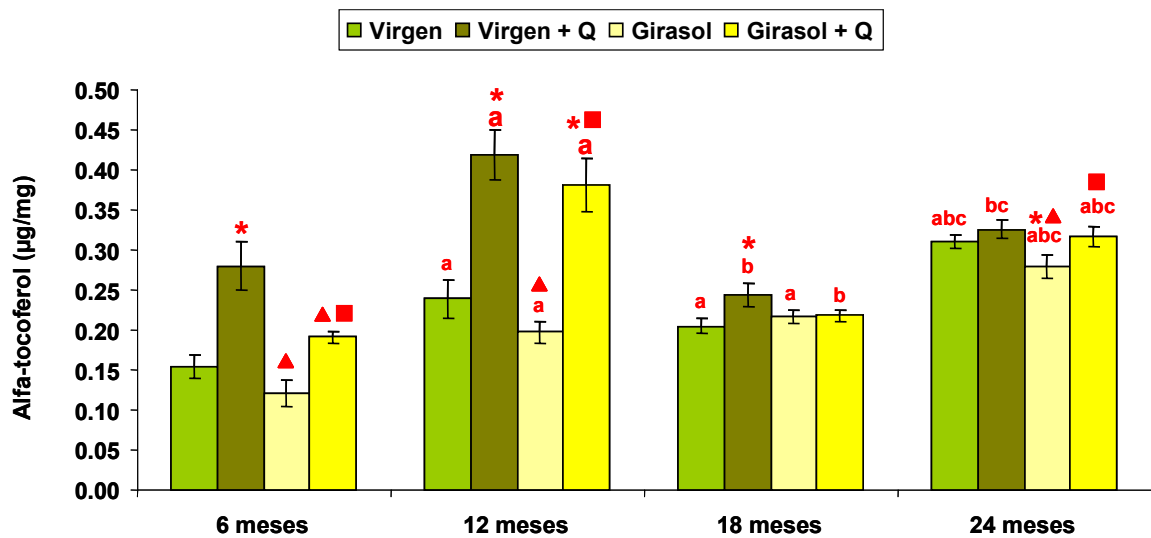


Figura 28.- Contenido en α -tocoferol en membranas mitocondriales cerebrales

En todos los grupos objeto de estudio se observó a los 12 meses un incremento en los niveles de α -tocoferol con respecto a los encontrados a los 6 meses. A los 18 meses se observó una disminución en el contenido de este antioxidante en los grupos suplementados con coenzima Q_{10} , alcanzándose valores similares a los encontrados a los 6 meses y un aumento en los niveles de los grupos sin suplementar con respecto a los 6 meses. Finalmente, a los 24 meses los grupos V, G y GQ mostraron un aumento en la concentración de α -tocoferol con respecto a los 6 meses (0.31 ± 0.01 µg/mg vs. 0.15 ± 0.01 µg/mg, 0.28 ± 0.01 µg/mg vs. 0.12 ± 0.02 µg/mg y 0.32 ± 0.01 µg/mg vs. 0.19 ± 0.01 µg/mg, respectivamente), los grupos V y G un aumento con respecto a los 12

meses ($0.31 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $0.24 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $0.28 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $0.20 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente), los grupos VQ y GQ un descenso con respecto a los 12 meses ($0.32 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $0.42 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $0.32 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $0.38 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente) y todos los grupos un aumento con respecto a los 18 meses.

Igualmente, se observaron diferencias significativas para este parámetro entre los diversos grupos de estudio para un mismo periodo de tiempo.

A los 6 y 12 meses, los grupos suplementados presentaron mayor concentración de α -tocoferol que los grupos no suplementados. A los 18 meses tan solo se observaron diferencias entre el grupo de aceite de oliva virgen suplementado y el grupo de animales que se alimentó con la misma fuente grasa sin suplementar ($0.24 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $0.20 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$). A los 24 meses fue el grupo de animales alimentado con aceite de girasol sin suplementar el que mostró un menor valor que los tres grupos restantes (V, VQ y GQ) ($0.28 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $0.31 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$, $0.33 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $0.31 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente).

5.- CONTENIDO EN COENZIMA Q EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

5.1.- CONTENIDO EN COENZIMA Q₉

La **Figura 29** muestra el contenido en coenzima Q₉ (CoQ₉) hallados en mitocondrias de cerebro. Se observó un aumento significativo en los niveles de esta molécula en todos los grupos en los distintos periodos de estudio con respecto a los encontrados a los 6 meses. A los 18 meses tan solo el grupo GQ mostró un incremento con respecto a los 12 meses ($587.5 \pm 48.7 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $485.7 \pm 11.0 \text{ ng}/\text{mg}$). A los 24 meses el grupo de animales alimentado con aceite de oliva mostró un descenso con respecto a los 12 meses ($392.2 \pm 13.6 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $467.2 \pm 13.9 \text{ ng}/\text{mg}$) y los grupos girasol y girasol suplementado con coenzima Q₁₀ un descenso con respecto a los 18 meses ($424.8 \pm 20.2 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $481.8 \pm 24.3 \text{ ng}/\text{mg}$ y $493.7 \pm 26.7 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $587.5 \pm 48.7 \text{ ng}/\text{mg}$, respectivamente).

Con respecto a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo se observó que a los 6, 18 y 24 meses los animales alimentados con aceites suplementados con coenzima Q₁₀ mostraron mayores concentraciones en CoQ₉ que los animales alimentados con las mismas fuentes grasas sin suplementar. A los 12 meses es el grupo

VQ el que mayor concentración presentó con diferencias significativas con respecto a los tres grupos restantes (V, G y GQ) (569.5 ± 14.7 ng/mg vs. 467.2 ± 13.9 ng/mg, 461.4 ± 13.4 ng/mg y 485.7 ± 11.0 ng/mg, respectivamente).

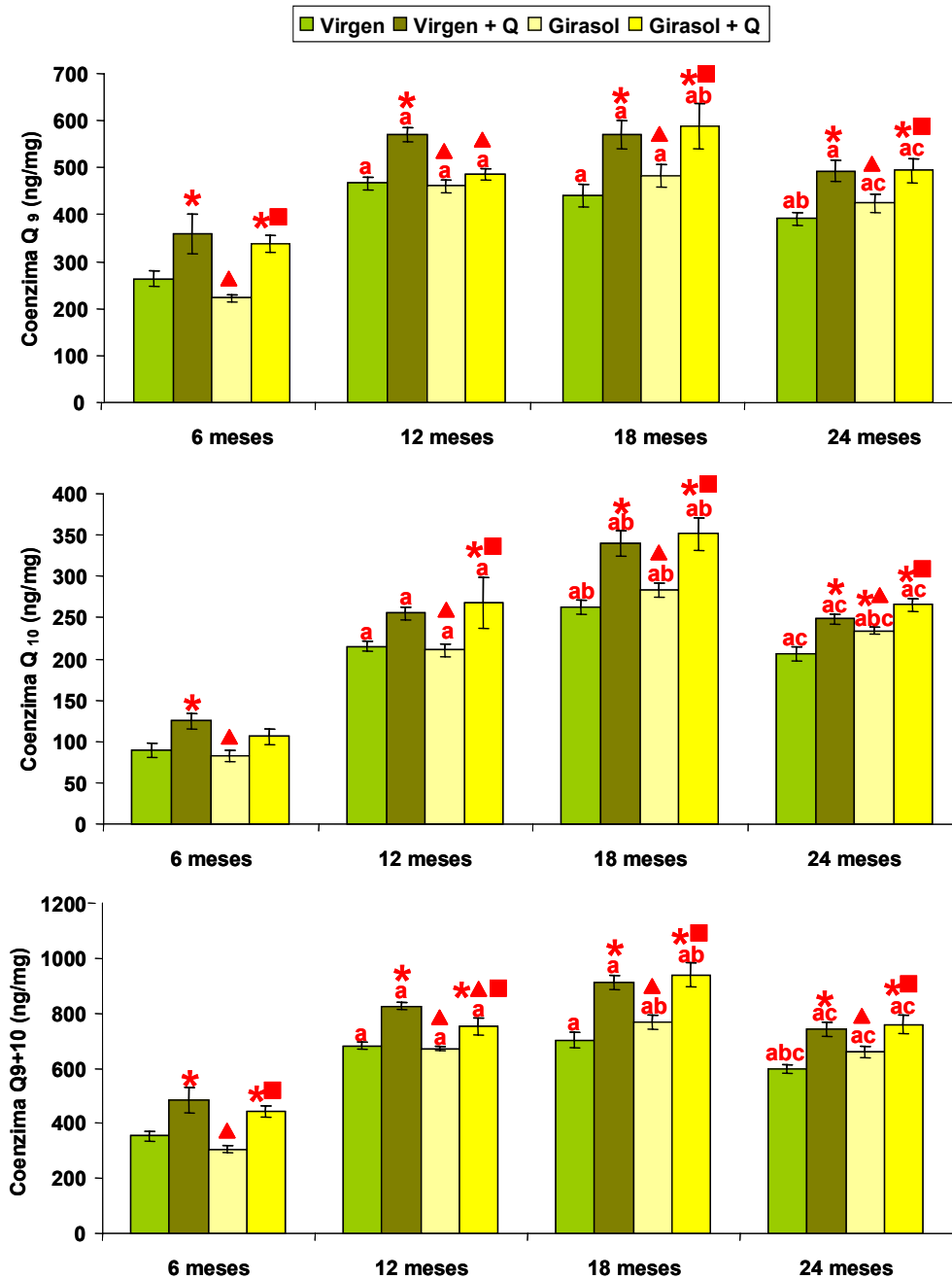


Figura 29 .- Contenido en coenzima Q₉ o Coenzima Q₁₀ separadamente y conjuntamente en membranas mitocondriales de cerebro

5.2.- CONTENIDO EN COENZIMA Q₁₀

La **Figura 29** muestra los niveles de coenzima Q₁₀ en los distintos grupos objeto de estudio. El comportamiento de este coenzima es similar al mostrado por su homólogo, el coenzima Q₉.

En lo que respecta a la evolución en cada grupo a lo largo del tiempo, se observó en todos los periodos del estudio un aumento significativo de los niveles frente a los encontrados al inicio del estudio. A los 18 meses los valores de coenzima Q₁₀ siguieron incrementando con respecto a los encontrados a los 12 meses. A los 24 meses se produjo una disminución significativa en los niveles de esta molécula con respecto a los valores encontrados a los 18 meses, siendo similares a los encontrados a los 12 meses, salvo para el grupo de animales alimentados con aceite de girasol sin suplementar, en el que fueron mayores (233.7 ± 4.0 ng/mg vs. 210.4 ± 8.5 ng/mg).

En lo que respecta a las diferencias entre grupos para cada periodo de tiempo, se observó a los 6 meses diferencias entre el grupo VQ y los grupos V y G (124.6 ± 8.7 ng/mg vs. 89.6 ± 8.1 ng/mg y 82.5 ± 6.3 ng/mg, respectivamente). A los 12, 18 y 24 meses, se observó un mayor contenido en coenzima Q₁₀ en los grupos suplementados con coenzima que en los no suplementados. A los 24 meses también se observó una mayor concentración de esta molécula en el grupo alimentado con aceite de girasol que en el grupo alimentado con aceite de oliva virgen (233.7 ± 4.0 ng/mg vs. 206.0 ± 8.3 ng/mg).

5.3.- CONTENIDO EN COENZIMA Q (Q₉ + Q₁₀)

El análisis de la suma de ambos coenzimas (**Figura 29**) muestra un comportamiento similar al mostrado por ambos coenzimas de manera separada, aunque con pequeñas diferencias. Con respecto a los 6 meses todos los grupos mostraron un incremento asociado al tiempo. A los 18 meses, solo los grupos alimentados con aceite de girasol (G y GQ) mostraron un mayor valor que el encontrado a los 12 meses (765.4 ± 25.5 ng/mg vs. 671.8 ± 10.0 ng/mg y 939.0 ± 45.1 vs. 753.6 ± 31.6 ng/mg, respectivamente). A los 24 meses todos los grupos mostraron un descenso en el contenido en coenzima Q con respecto a los 18 meses e incluso para el grupo alimentado con aceite de oliva con respecto a los 12 meses (598.2 ± 14.3 ng/mg vs. 682.3 ± 13.3 ng/mg).

Las diferencias entre grupos para cada periodo de tiempo son las mismas que las encontradas para el coenzima Q₉, salvo por el hecho de que a los 12 meses, el grupo de animales alimentados con aceite de girasol suplementado con coenzima Q₁₀ mostró diferencias significativas con respecto a los tres grupos restantes (V, VQ y G) (753.6 ± 31.6 ng/mg vs. 682.3 ± 13.3 ng/mg, 825.0 ± 13.4 ng/mg y 671.8 ± 10.0 ng/mg, respectivamente).

6.- ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN CITOSOL

Al igual que sucedió con otros sistemas antioxidantes, la actividad de esta enzima (**Figura 30**) incrementó con la edad, mostrando valores a los 12, 18 y 24 meses superiores a los encontrados a los 6 meses de edad. A los 18 meses, se encontró un descenso en su actividad con respecto a los 12 meses para los grupos alimentados con aceite de oliva virgen (V y VQ) (393.4 ± 21.3 U/mg vs. 455.3 ± 18.6 U/mg y 360.5 ± 20.2 U/mg vs. 449.1 ± 18.7 U/mg, respectivamente) y un ascenso en el grupo de animales alimentado con aceite de girasol (465.3 ± 31.2 U/mg vs. 384.9 ± 26.9 U/mg). A los 24 meses se mantuvieron los valores y diferencias observadas a los 18 meses.

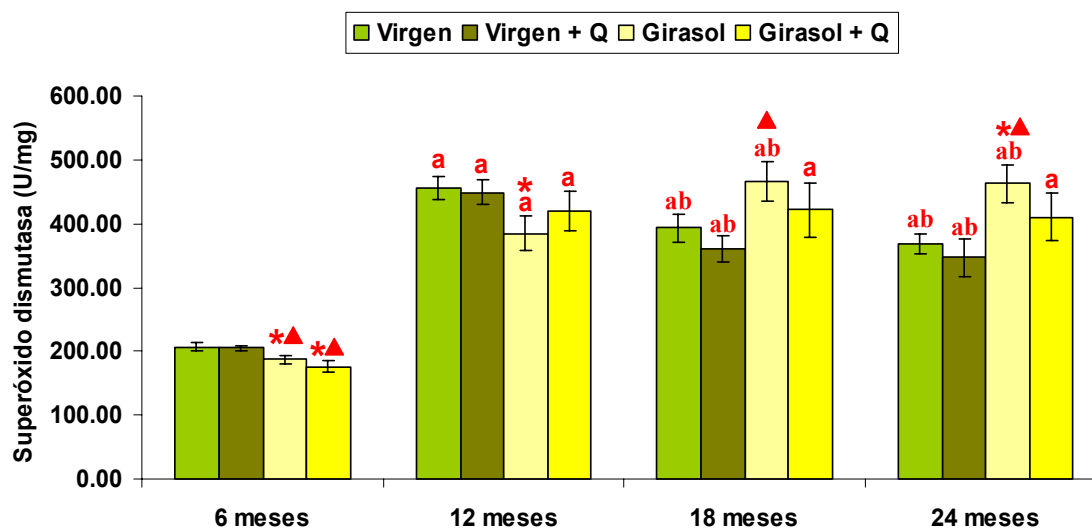


Figura 30.- Actividad superóxido dismutasa en citosol de células neuronales ; encontradas en los animales de los distintos grupos en cada periodo se observó que al girasol (G y GQ) fueron inferiores a los encontrados en los grupos alimentados con aceite de oliva virgen (V y VQ). A los 12 meses solo se observaron diferencias entre el

grupo G y V (384.9 ± 26.9 U/mg vs. 455.3 ± 18.6 U/mg) y a los 18 meses entre G y VQ (465.3 ± 31.2 U/mg vs. 360.5 ± 20.2 U/mg). A los 24 meses, es de nuevo el grupo alimentado con aceite de girasol sin suplementar el que presentó mayores valores que los encontrados en los grupos alimentados con aceite de oliva virgen (V y VQ) (462.8 ± 28.9 U/mg vs. 367.9 ± 14.9 U/mg y 346.4 ± 29.2 U/mg, respectivamente).

7.- ACTIVIDAD DE LA CATALASA EN CITOSOL

Para esta enzima antioxidante (**Figura 31**), se observó valores semejantes a los 6 y 12 meses y un incremento significativo en todos los grupos a los 18 meses de edad. A los 24 meses, el grupo V mantuvo los valores observados a los 18 meses, el grupo VQ mostró un descenso en estos valores, aunque por encima de los encontrados a los 6 meses; el grupo G, al igual que el grupo VQ, mostró un descenso en la actividad de esta enzima antioxidante, aunque por encima de los encontrados a los 6 y 12 meses y el grupo GQ no mostró diferencias significativas con ninguno de los otros periodos de estudio.

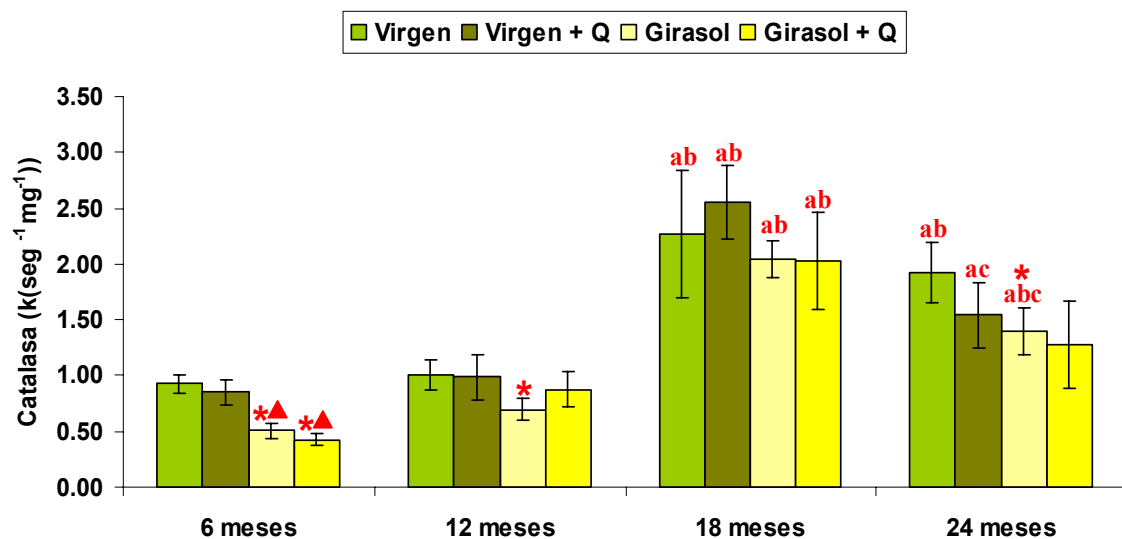


Figura 31 .- Actividad catalasa en citosol de células neuronales

En lo que respecta a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó a los 6 meses, al igual que con la actividad superóxido dismutasa, una menor actividad en los grupos alimentados con aceite de girasol que en los grupos alimentados con aceite de oliva virgen. A los 12 y 24 meses tan solo se encontraron diferencias significativas entre los grupos V y G ($1.0 \pm 0.1 \text{ seg}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ vs. $0.7 \pm 0.1 \text{ seg}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ y $1.9 \pm 0.3 \text{ seg}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ vs. $1.4 \pm 0.2 \text{ seg}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente).

8.- ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA EN CITOSOL

La actividad de esta enzima antioxidante (*Figura 32*), al contrario de la catalasa y superóxido dismutasa, no mostró grandes variaciones entre el periodo inicial y final de este estudio, aunque si se observaron en las etapas intermedias. A los 12 y 18 meses, se observó un incremento en la actividad de la enzima glutacion peroxidasa con respecto a la actividad encontrada a los 6 y 24 meses en todos los grupos de estudio, salvo en el alimentado con el aceite de girasol a los 24 meses, el cual solo mostró diferencias con respecto a los 12 meses de edad ($10.6 \pm 0.9 \text{ U/mg}$ vs. $23.4 \pm 5.2 \text{ U/mg}$).

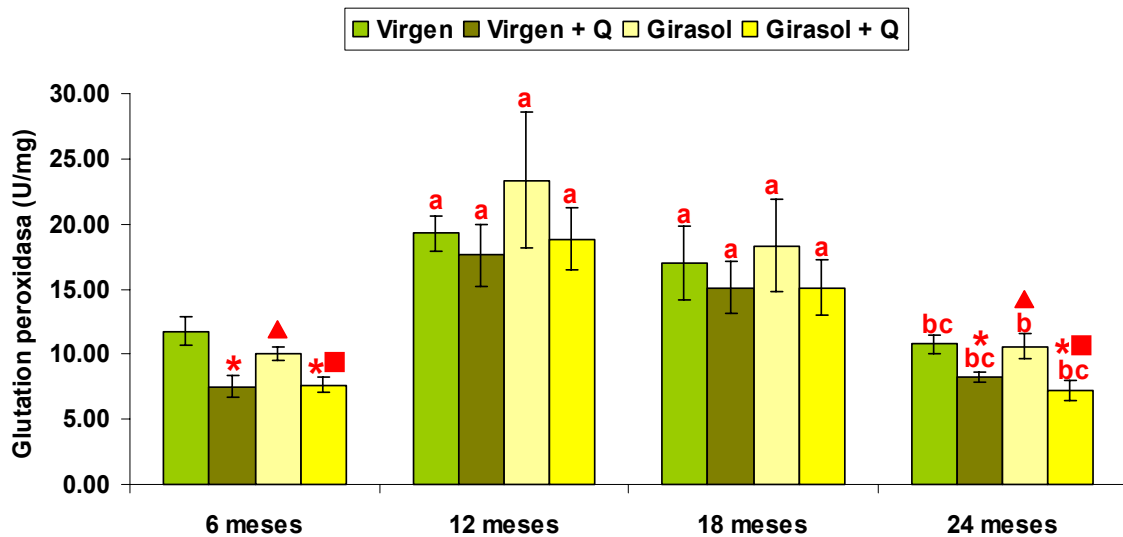


Figura 32 .- Actividad glutacion peroxidasa en citosol de células neuronales

Para cada periodo de tiempo las diferencias significativas encontradas entre los diferentes grupos de este estudio se limitan, por el contrario a los periodos de inicio (6 meses) y final (24 meses) del estudio. En ambos periodos se observó una mayor actividad de esta enzima en los grupos alimentados con los aceites no suplementados con coenzima Q₁₀.

9.- NIVELES DE COLESTEROL Y FOSFOLÍPIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

9.1.- NIVELES DE COLESTEROL

La **Figura 33** muestra las variaciones en los niveles de colesterol en las membranas mitocondriales de cerebro de rata. A los 12 meses de edad, se observó una disminución en los niveles de colesterol en los grupos alimentados con aceite de girasol (G y GQ) con respecto a los 6 meses ($95.8 \pm 7.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $132.4 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $75.4 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $103.1 \pm 10.2 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente). A los 18 meses, se observó un incremento, con respecto a los 6 y 12 meses de edad, en los niveles de colesterol en las membranas mitocondriales de los grupos alimentados con aceite de oliva virgen (V y VQ), un descenso con respecto a los 6 meses en el grupo alimentado con aceite de girasol sin suplementar y un incremento con respecto a los 12 meses en el grupo GQ. Finalmente, a los 24 meses, las membranas de los grupos alimentados con aceite de oliva virgen mostraron un descenso en su contenido en colesterol con respecto a los 18 meses de edad, asemejándose a los valores encontrados a los 6 y 12 meses, las membranas del grupo alimentado con aceite de girasol sin suplementar sigue mostrando valores inferiores a los observados a los 6 meses y las del grupo alimentado con aceite de girasol suplementado con coenzima Q inferiores a los 6 y 18 meses de edad.

En lo que respecta a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó a los 6 meses un mayor contenido en colesterol en las membranas mitocondriales de los cerebros de las ratas alimentados con aceite de girasol, existiendo además en este periodo de tiempo diferencias entre los grupos G y GQ ($132.4 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $103.1 \pm 10.2 \mu\text{g}/\text{mg}$). A los 12 meses de edad, las ratas alimentadas con aceite de girasol sin suplementar mostraron mayores valores que las ratas suplementadas con coenzima Q₁₀ (VQ y GQ) ($95.8 \pm 7.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $70.5 \pm 4.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $75.4 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente). A los 24 meses, es de nuevo el grupo alimentado

con aceite de girasol el que presentó mayores niveles de colesterol en sus membranas con respecto a los tres grupos restantes, V, VQ y GQ ($91.7 \pm 4.9 \mu\text{g/mg}$ vs. $75.0 \pm 4.9 \mu\text{g/mg}$, $76.0 \pm 2.1 \mu\text{g/mg}$ y $77.3 \pm 4.2 \mu\text{g/mg}$, respectivamente).

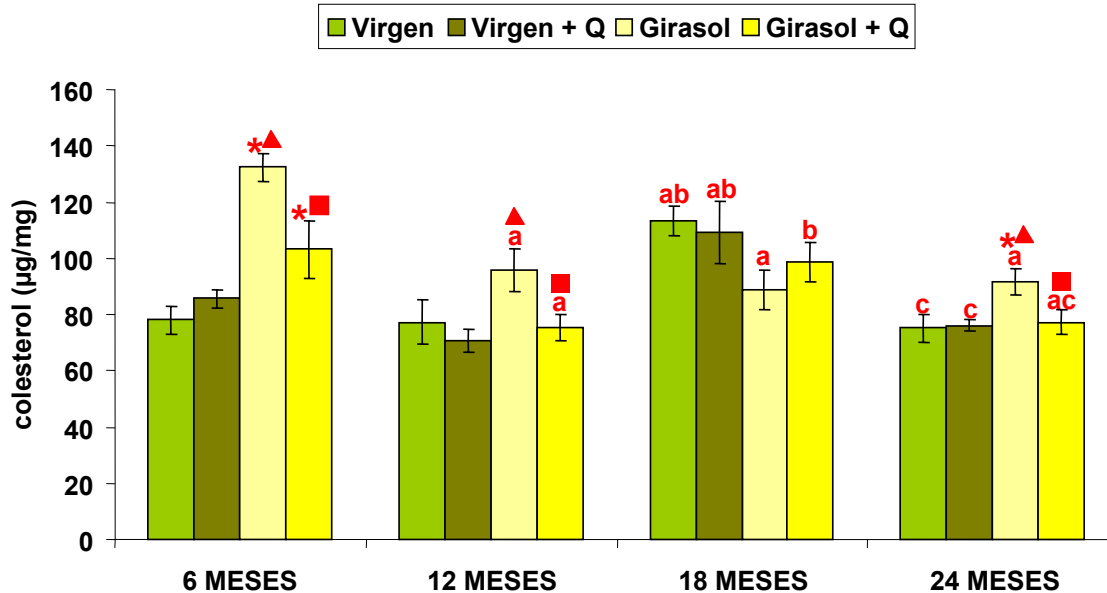


Figura 33 .- Contenido en colesterol en membranas mitocondriales del cerebro

9.2.- NIVELES DE FOSFOLÍPIDOS

La **Figura 34** muestra el contenido en fosfolípidos de las membranas mitocondriales objeto de estudio. Como se observa en la Figura no se encontraron grandes diferencias entre los grupos, ni para los diferentes periodos de tiempo ni para un mismo periodo. En lo que respecta a la evolución en el tiempo, se observó un incremento en los niveles de fosfolípidos en el grupo VQ a los 12, 18 y 24 meses con respecto a los 6 meses ($166.4 \pm 11.8 \mu\text{g/mg}$, $204.4 \pm 5.5 \mu\text{g/mg}$ y $184.4 \pm 7.9 \mu\text{g/mg}$ vs. $136.1 \pm 6.4 \mu\text{g/mg}$, respectivamente). A los 24 meses se observó también un descenso en los niveles de fosfolípidos en los grupos G y GQ con respecto a los 6 meses de edad ($163.5 \pm 16.1 \mu\text{g/mg}$ vs. $219.5 \pm 13.2 \mu\text{g/mg}$ y $153.3 \pm 8.9 \mu\text{g/mg}$ vs. $203.4 \pm 22.4 \mu\text{g/mg}$, respectivamente).

A los 6 meses, se observó un mayor contenido en fosfolípidos en los grupos alimentados con aceite de girasol con respecto a los valores encontrados en los grupos alimentados con aceite de oliva virgen. En el resto de periodos de tiempo estudiados, tan solo se observa un menor contenido en fosfolípidos en el grupo GQ con respecto al grupo VQ a los 18 meses de edad.

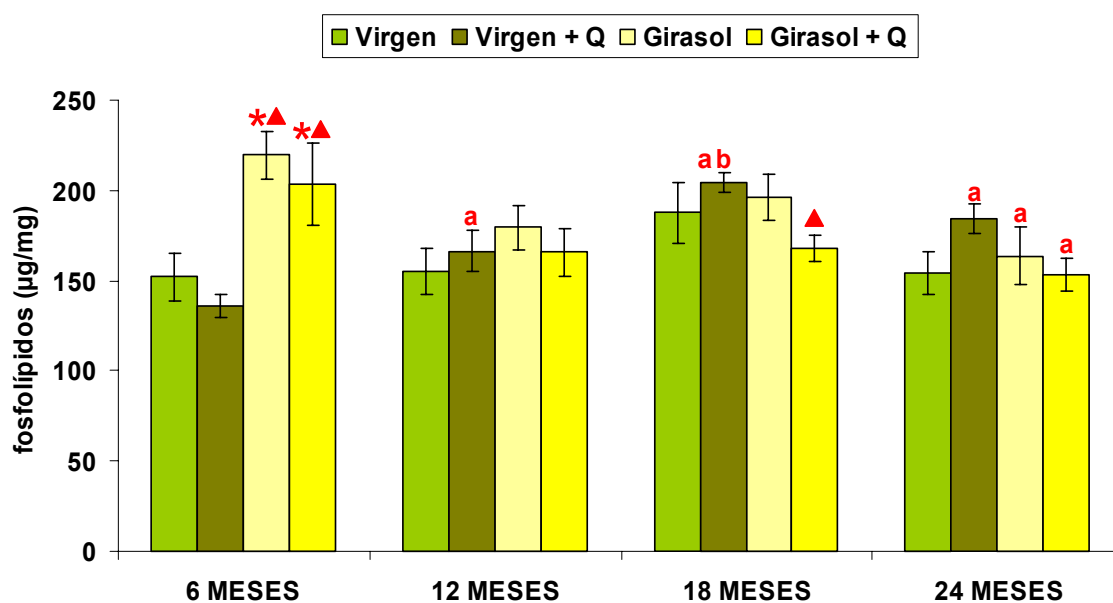


Figura 34 .- Contenido en fosfolípidos en membranas mitocondriales cerebrales

9.3.- RELACIÓN COLESTEROL/FOSFOLÍPIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

La relación colesterol/fosfolípidos se muestra en la **Figura 35**. En lo que respecta a la evolución de los grupos objeto de estudio en el tiempo, se observó a los 12 meses valores similares a los encontrados a los 6 meses, salvo para el grupo de animales alimentados con aceite de oliva virgen suplementado con coenzima Q₁₀, el cual mostró un descenso significativo (0.43 ± 0.02 vs. 0.63 ± 0.01). A los 18 meses, existe un incremento en esta relación en los grupos alimentados con aceite de oliva virgen con respecto a los valores encontrados a los 6 y 12 meses para estos grupos. El grupo G mostró un descenso con respecto a los valores encontrados a los 6 meses (0.45 ± 0.02

vs. 0.61 ± 0.04) y el grupo GQ mostró en este periodo un aumento con respecto a los 12 meses (0.59 ± 0.03 vs. 0.46 ± 0.01). A los 24 meses, se observó en todos los grupos un descenso con respecto a los valores encontrados a los 18 meses e incluso en el grupo VQ con respecto a los valores encontrados a los 6 meses de edad.

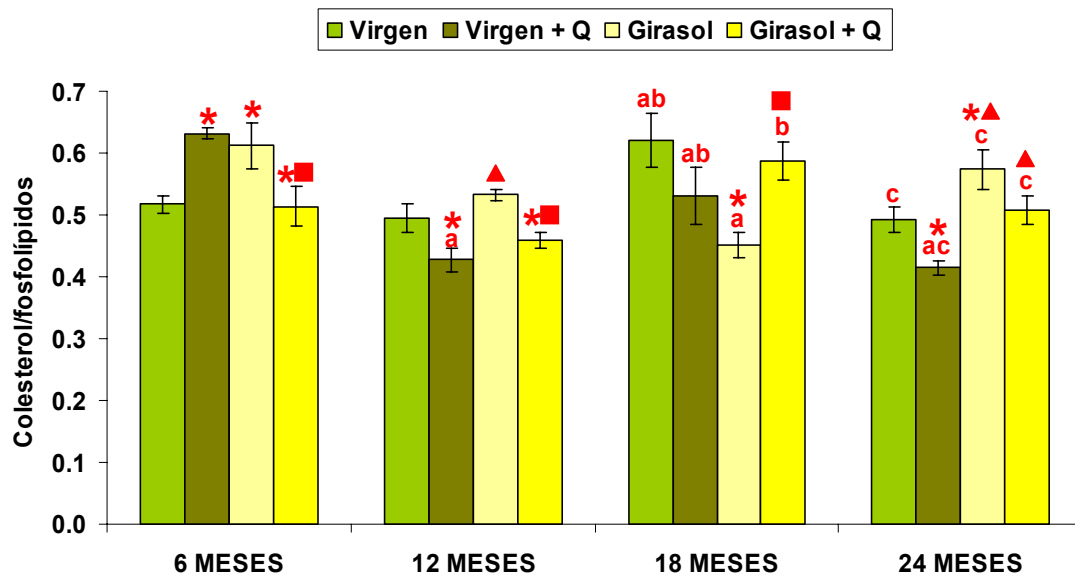


Figura 35 .- Relación colesterol/fosfolípidos en membranas mitocondriales de cerebro

En esta Figura también se muestran las diferencias encontradas entre las dietas utilizadas en este estudio para cada periodo de tiempo. A los 6 meses, se observó un mayor valor en la relación colesterol/fosfolípidos en los grupos VQ y G con respecto a los grupos V y GQ. A los 12 meses, se observaron menores valores en los grupos suplementados con coenzima Q₁₀ que en los no suplementados. A los 18 meses, fue el grupo alimentado con aceite de girasol sin suplementar el que mostró menor valor, con diferencias significativas con respecto a los valores encontrados en los grupos V y GQ (0.45 ± 0.02 vs. 0.62 ± 0.04 y 0.59 ± 0.03 , respectivamente). A los 24 meses, el grupo de ratas alimentado con aceite de oliva virgen mostró un mayor valor en esta relación que la encontrada en el grupo VQ (0.49 ± 0.02 vs. 0.41 ± 0.01) y menor que la encontrada en el grupo G (0.49 ± 0.02 vs. 0.57 ± 0.03), este último grupo, junto con el grupo GQ, también mostró una valor mayor que el encontrado en el grupo VQ (0.57 ± 0.03 vs. 0.41 ± 0.01 y 0.51 ± 0.02 vs. 0.41 ± 0.01 , respectivamente).

10.- PRODUCCIÓN DE DICLOROFLUORESCÉINA DIACETATO EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO

La **Figura 36** muestra los valores obtenidos para la diclorofluoresceína diacetato en membrana mitocondriales de cerebro. La evolución en el tiempo de este parámetro para cada grupo mostró un aumento en los grupos V y GQ a los 12 meses con respecto a los valores obtenidos a los 6 meses: a los 18 meses se observó un descenso en los grupos V, G y GQ con respecto a los 12 meses e incluso con respecto a los 6 meses en el grupo G, finalmente, a los 24 meses se observó en todos los grupos objeto de estudio un aumento en los valores de este parámetro con respecto a los valores obtenidos a los 6 y 18 meses.

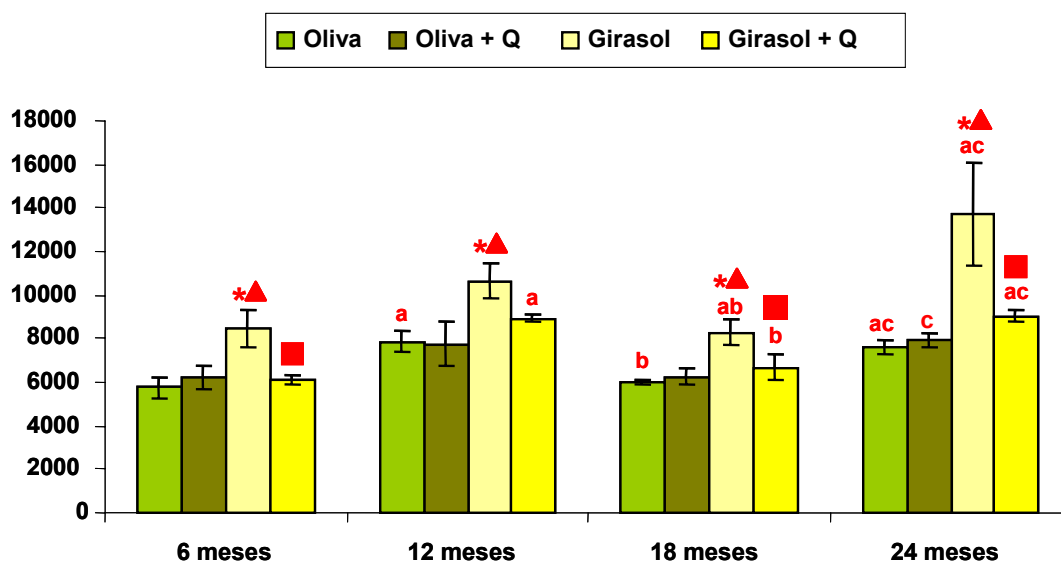


Figura 36.- Diclorofluoresceína diacetato en membranas mitocondriales del cerebro

En lo que respecta a las diferencias entre grupos para un periodo de tiempo determinado, se observó que a los 6, 18 y 24 meses de edad, el grupo de ratas alimentadas con aceite de girasol sin suplementar mostró una mayor producción de esta molécula que los tres grupos restantes. A los 12 meses, se observó el mismo comportamiento para este grupo, aunque tan solo con diferencias significativas con los grupos V y VQ

11.- POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

Para la sonda DPH, como se muestra en la *Figura 37*, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos objeto de estudio entre el inicio y el final de este estudio. Por otra parte, a los 6 meses de edad se encontró un mayor valor para este parámetro en el grupo de ratas alimentadas con aceite de girasol sin suplementar con respecto al obtenido en los tres grupos restantes (V, VQ y GQ) (0.285 ± 0.002 vs. 0.279 ± 0.003 , 0.277 ± 0.002 y 0.277 ± 0.002 , respectivamente). A los 24 meses estos valores se mantuvieron en el grupo G, aunque tan solo con diferencias significativas con respecto a los grupos VQ y GQ (0.284 ± 0.002 vs. 0.278 ± 0.002 y 0.275 ± 0.02 , respectivamente).

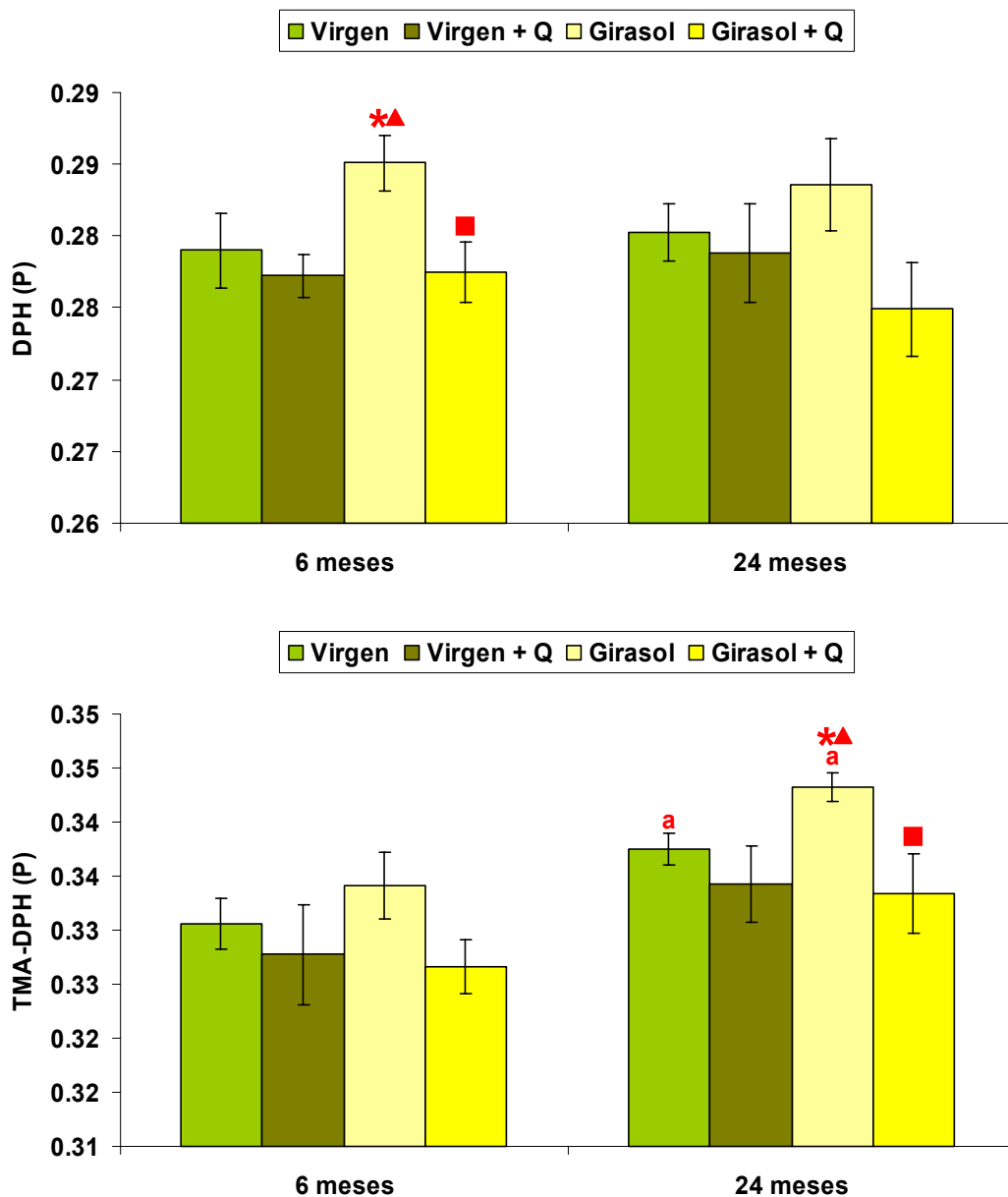


Figura 37.- Polarización de fluorescencia en membranas mitocondriales de cerebro

Esta misma Figura muestra los resultados obtenidos para la sonda TMA-DPH. En lo que respecta a la evolución en el tiempo, se observó un incremento significativo en el valor obtenido para esta sonda a los 24 meses con respecto a los 6 meses en los grupos alimentados con las fuentes grasas utilizadas sin suplementar (0.337 ± 0.001 vs. 0.331 ± 0.002 para el grupo V y 0.343 ± 0.001 vs. 0.334 ± 0.003 para el grupo G). En lo que respecta a las diferencias significativas entre grupos para un periodo de tiempo concreto, se observaron diferencias significativas tan solo a los 24 meses de edad entre el grupo de ratas alimentado con aceite de girasol sin suplementar y los tres grupos restantes (V, VQ y GQ) (0.343 ± 0.001 vs. 0.337 ± 0.001 , 0.334 ± 0.004 y 0.333 ± 0.004 , respectivamente).

12.- PERFIL LIPÍDICO EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO

12.1.- Ácidos grasos saturados

La **Figura 38.b** muestra el porcentaje de ácidos grasos saturados totales. En lo que respecta a la evolución de estos ácidos grasos en el tiempo, se observó para el grupo de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen sin suplementar un aumento en su porcentaje a los 24 meses de edad con diferencias significativas respecto a los porcentajes encontrados a los 6 y 12 meses (51.5 ± 1.2 % vs. 48.3 ± 0.6 % y 48.3 ± 0.6 %, respectivamente) y para el grupo de ratas alimentadas con aceite de girasol sin suplementar, un aumento a los 12 meses con respecto a los 6 meses de edad (48.1 ± 1.0 % vs. 44.3 ± 0.9 %) y a los 18 y 24 meses con respecto a los 6 y 12 meses de edad. En lo que respecta a los grupos suplementados con coenzima Q₁₀, se observó en ambos grupos (VQ y GQ) un comportamiento similar a los 12 y 18 meses con porcentajes superiores a los encontrados a los 6 meses. Sin embargo, a los 24 meses el grupo VQ mantuvo valores superiores a los encontrados a los 6 meses (53.9 ± 1.4 % vs. 45.9 ± 0.5 %) mientras que el grupo GQ mostró una disminución en el porcentaje de ácidos grasos saturados totales con diferencias significativas respecto a los porcentajes encontrados a los 12 y 18 meses de edad (49.1 ± 1.6 % vs. 54.6 ± 0.8 % y 54.3 ± 0.6 %, respectivamente).

Respecto a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó a los 6 meses de edad un menor porcentaje de ácidos grasos saturados totales en

los grupos VQ y G. A los 12 meses, fueron los grupos suplementados con coenzima Q los que mayor porcentaje mostraron con diferencias significativas respecto a los otros dos grupos de estudio. A los 18 meses, los animales alimentados con aceite de girasol (G y GQ) mostraron un mayor porcentaje en ácidos grasos saturados que los alimentados con aceite de oliva (V y VQ) y a los 24 meses, solo se observaron diferencias entre el grupo GQ y los grupos VQ y G ($49.1 \pm 1.6\%$ vs. $53.9 \pm 1.4\%$ y $55.5 \pm 1.2\%$, respectivamente).

A continuación vamos a describir el comportamiento de algunos ácidos grasos saturados de manera independiente.

12.1.1.- Ácido Mirístico (C14:0)

El comportamiento de este ácido graso saturado se muestra en la **Figura 38.a**. Se observó en todos los grupos objeto de estudio un aumento en el porcentaje de ácido mirístico a los 12 y 18 meses respecto a los porcentajes encontrados a los 6 meses. El grupo de ratas alimentado con aceite de girasol sin suplementar mostró además a los 18 meses un mayor porcentaje que a los 12 meses. A los 24 meses, los grupos V, VQ y G mostraron mayores porcentajes que los observados a los 6, 12 y 18 meses de edad. Por el contrario, el grupo GQ mostró un descenso en el porcentaje de este ácido graso para este último periodo de tiempo con diferencias significativas respecto a los porcentajes encontrados a los 12 y 18 meses.

Respecto al comportamiento de los diferentes grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó que a los 6 meses de edad el grupo de ratas alimentadas con aceite de girasol sin suplementar (G) mostró un menor porcentaje en ácido mirístico que los tres grupos restantes. A los 12 meses, el grupo G mostró menor porcentaje que el grupo VQ, mientras que el grupo de ratas alimentadas con la misma fuente grasa suplementada con coenzima Q₁₀ mostró un mayor porcentaje que los tres grupos restantes. A los 18 meses de edad fue el grupo de animales alimentados con aceite de oliva virgen sin suplementar el que menor porcentaje en ácido mirístico presentó, mientras que a los 24 meses este comportamiento fue el mostrado por el grupo de animales alimentados con aceite de girasol suplementado con coenzima Q₁₀.

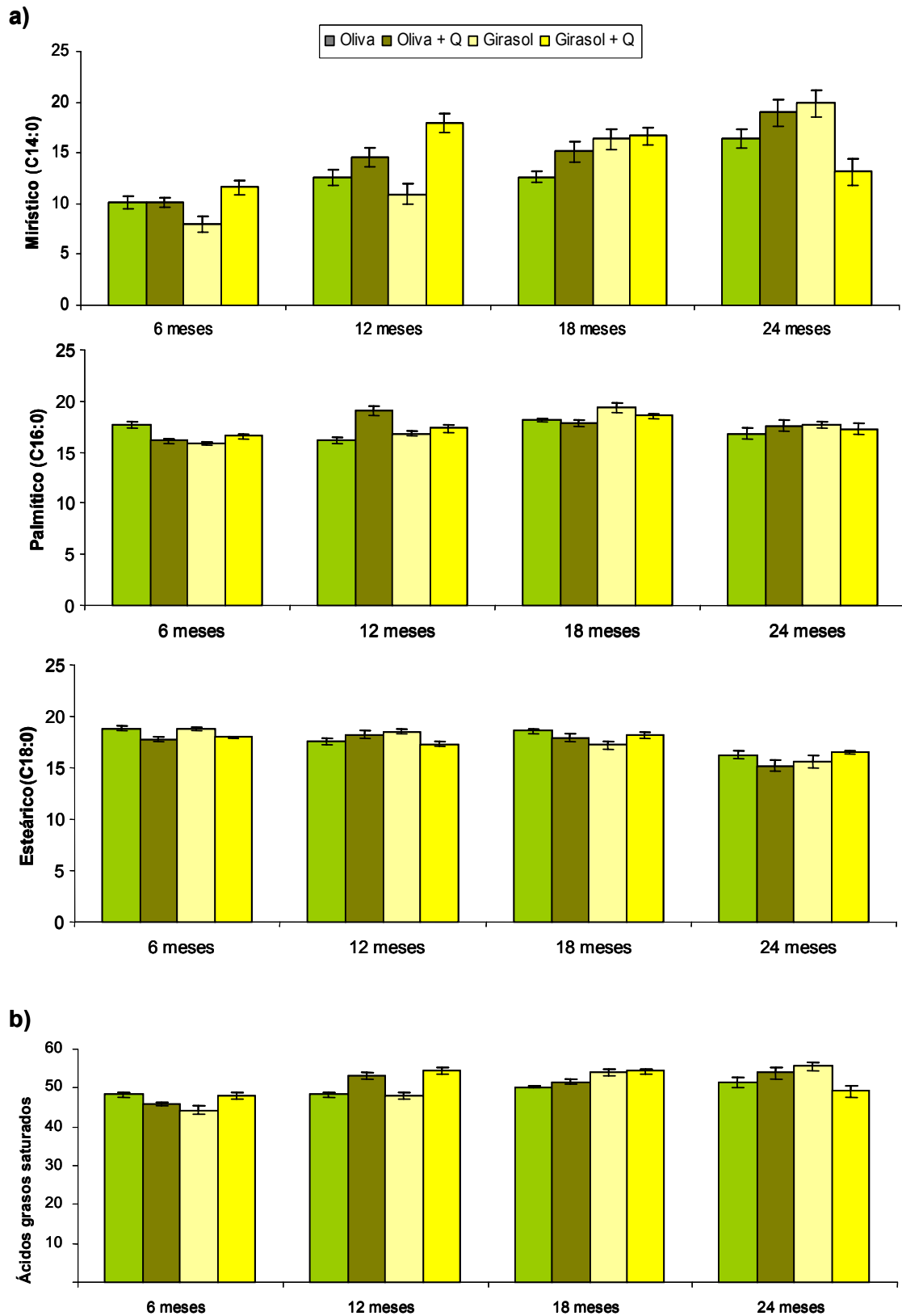


Figura 38.- Niveles de ácidos grasos saturados en mitocondrias cerebrales procedentes de ratas alimentadas con dietas en las que se modificó la calidad de la grasa alimentaria (se expresan en porcentaje del total de ácidos grasos) a) Ácidos grasos individuales b) Ácidos grasos totales

12.1.2.- Ácido palmítico (C16:0)

El grupo de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen sin suplementar (V) mostró para este ácido graso saturado (*Figura 38.a*) una disminución en su porcentaje a los 12 meses respecto a los 6 meses, un aumento a los 18 meses respecto a los 12 meses y un nuevo descenso a los 24 meses respecto a los 18 meses de edad. El grupo alimentado con aceite de oliva virgen suplementado mostró a los 12 meses un mayor porcentaje en ácido palmítico que el encontrado a los 6 meses, a los 18 y 24 meses mantiene ese mayor porcentaje respecto a los 6 meses, aunque menor que el encontrado a los 12 meses. El grupo G mostró a los 12 meses un mayor porcentaje de este ácido graso que el encontrado a los 6 meses, a los 18 meses el porcentaje fue mayor que el encontrado a los 12 meses y a los 24 meses este grupo siguió manteniendo un mayor porcentaje que el encontrado a los 6 y 12 meses, aunque menor que el observado a los 18 meses. Finalmente, el grupo GQ mostró un aumento a los 18 meses respecto a los 6 y 12 meses, aunque a los 24 meses de edad este porcentaje descendió a los valores observados a los 6 y 12 meses.

Respecto a las diferencias entre grupos para este ácido graso en cada periodo de tiempo, se observó a los 6 meses porcentajes en los grupos VQ, G y GQ menores que el encontrado en el grupo V, además el grupo GQ mostró un mayor porcentaje que el grupo G. a los 12 meses, el grupo VQ mostró un porcentaje en ácido palmítico mayor que el encontrado en los grupos V, G y GQ, mostrando además este último grupo un mayor porcentaje que el encontrado en el grupo V. A los 18 meses, el grupo de ratas alimentadas con aceite de girasol sin suplementar mostró un mayor porcentaje que los grupos alimentados con aceite de oliva virgen.

12.1.3.- Ácido esteárico (C18:0)

A los 12 meses de edad solo se observó un descenso en el porcentaje de este ácido graso saturado en el grupo de ratas alimentado con aceite de oliva virgen sin suplementar (*Figura 38.a*). A los 18 meses, este grupo aumentó el porcentaje de ácido esteárico respecto al observado a los 12 meses, el grupo G disminuyó su porcentaje respecto a los 6 y 12 meses y el grupo GQ lo incrementó respecto a los 12 meses. A los

24 meses todos los grupo mostraron para este ácido graso el mismo comportamiento, consistente en una disminución en su porcentaje respecto a los valores obtenidos a lo 6, 12 y 18 meses de edad.

El estudio del comportamiento entre los grupos en un mismo periodo de tiempo, mostró que a los 6 meses de edad los grupos suplementados con coenzima Q₁₀ presentaban menor porcentaje en ácido esteárico que lo grupos no suplementados. A los 12 meses, el mayor porcentaje para este ácido graso fue el encontrado en el grupo G con diferencia significativas respecto a los grupos V y GQ. A los 18 meses, el grupo G mostró un porcentaje menor que el encontrado en el grupo V.

12.2.- Ácidos grasos monoinsaturados

La **Figura 39.b** muestra el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados totales. En lo que respecta a la evolución de estos ácidos grasos en el tiempo, se observó para el grupo de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen sin suplementar una disminución en este porcentaje a los 18 meses respecto a los valores encontrados a los 6 y 12 meses de edad ($26.2 \pm 0.2 \%$ vs. $29.6 \pm 0.5 \%$ y $29.9 \pm 0.6 \%$, respectivamente), disminución que se incrementó a los 24 meses, con diferencias significativas respecto al porcentaje observado a los 18 meses ($22.3 \pm 0.6 \%$ vs. $26.2 \pm 0.2 \%$). El grupo alimentado con la otra fuente grasa sin suplementar (G) mostró un descenso a los 12 meses respecto al porcentaje encontrado a los 6 meses ($31.8 \pm 0.6\%$ vs. $35.1 \pm 0.9 \%$), descenso que se incrementó a los 18 meses con diferencias respecto a los 12 meses ($25.7 \pm 1.4 \%$ vs. $31.8 \pm 0.6 \%$) y a los 24 meses con diferencias respecto a los 18 meses de edad ($21.9 \pm 1.5 \%$ vs. $25.7 \pm 1.4 \%$).

Respecto a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó a los 6 meses de edad el menor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados totales en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva virgen, con diferencias significativas respecto a los tres grupos restantes (VQ, G y GQ) ($29.6 \pm 0.5 \%$ vs. $32.1 \pm 0.5 \%$, $35.1 \pm 0.9 \%$ y $32.7 \pm 0.5 \%$, respectivamente), además, en este periodo de tiempo, el grupo G mostró un porcentaje mayor que los encontrados en los grupos suplementados con coenzima Q₁₀. A los 12 meses los grupos alimentados con las fuentes grasas suplementadas (VQ y GQ) mostraron un porcentaje menor en ácidos grasos monoinsaturados que los grupos alimentados con las mismas fuentes grasas sin

suplementar (V y G) ($24,3 \pm 0.6 \%$ y $26.9 \pm 0.6 \%$ vs. $29.9 \pm 0.6 \%$ y $31.8 \pm 0.6 \%$, respectivamente), además se observó en este periodo de tiempo un mayor porcentaje en el grupo G que en el grupo V y en el grupo GQ que en el grupo VQ. A los 24 meses, el mayor porcentaje fue el mostrado por el grupo GQ con diferencias significativas respecto a los grupos restantes (V, VQ y G) ($25.8 \pm 0.8 \%$ vs. $22.3 \pm 0.6 \%$, $21.4 \pm 0.7 \%$ y $21.9 \pm 0.5 \%$, respectivamente).

A continuación vamos a describir el comportamiento de algunos ácidos grasos monoinsaturados de manera independiente.

12.2.1.- Ácido palmitoleico (C16:1 n-9)

El comportamiento de este ácido graso saturado se muestra en la **Figura 39.a**. En lo que respecta a la evolución en el tiempo para este ácido graso monoinsaturado, se observó un incremento a los 18 meses respecto a los 6 y 12 meses, en el grupo V con posterior descenso a los 24 meses. En este periodo de tiempo final también se observó un incremento en el grupo GQ respecto a los porcentajes encontrados para este grupo a los 6, 12 y 18 meses de edad.

Respecto a las variaciones entre grupos en el porcentaje de ácido palmitoleico en los distintos periodos de tiempo estudiados, se observó a los 6 meses un menor porcentaje en el grupo GQ aunque tan solo mostró diferencias con el grupo V. A los 18 meses el grupo V mostró un mayor porcentaje que los tres grupos restantes. A los 24 meses, el mayor porcentaje en ácido palmitoleico fue el mostrado por el grupo de ratas alimentadas con aceite de girasol suplementado con coenzima Q₁₀.

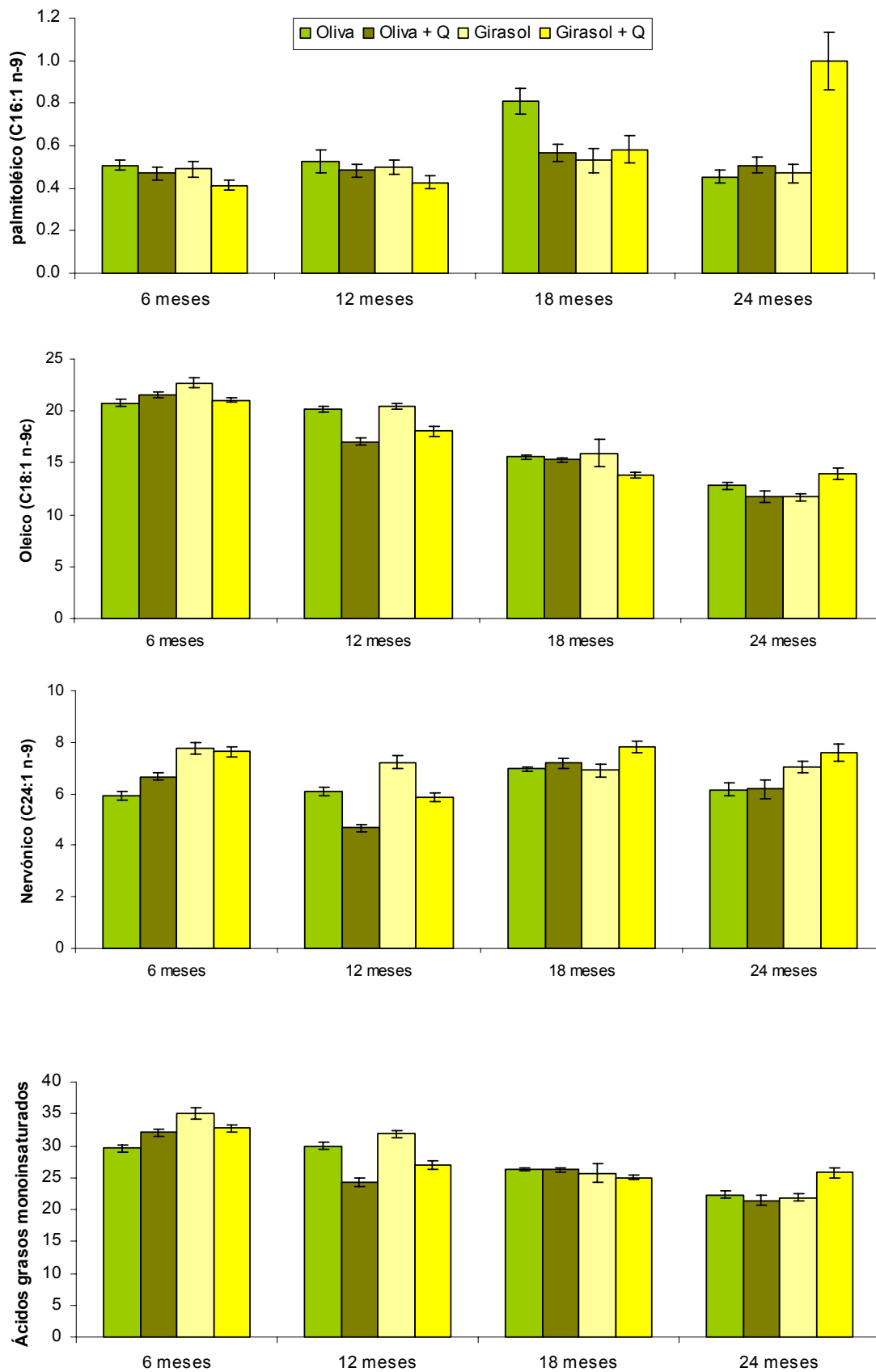


Figura 39 .- Niveles de ácidos grasos monoinsaturados ω -9 en mitocondrias cerebrales procedentes de ratas alimentadas con dietas donde se modificó la calidad de la grasa alimentaria (se expresa en porcentaje del total ácidos grasos).

a) AG monoinsaturados ω -9 individuales b) AG monoinsaturados totales

12.2.2.- Ácido oleico (C18:1 n-9)

A los 12 meses de edad se observó una disminución en el porcentaje de este ácido graso en los grupos VQ, G y GQ (*Figura 39.a*). Esta disminución se incrementó a los 18 meses, con diferencias significativas en todos los grupos respecto al porcentaje encontrado a los 6 y 12 meses. A los 24 meses, el porcentaje ácido oleico siguió disminuyendo en los grupos V, VQ y G, mostrando diferencias con los 18 meses.

En lo que respecta a las diferencias entre grupos para cada periodo de tiempo, se observó a los 6 meses el mayor porcentaje en el grupo de ratas alimentado con el aceite de girasol sin suplementar, con diferencias significativas respecto a los tres grupos restantes. A los 12 meses, el comportamiento mostrado por los grupos fue el mismo que el encontrado en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados totales, salvo por la ausencia de diferencias entre los grupos V y G. A los 18 meses, el grupo G mostró el menor valor, aunque con diferencias tan solo respecto al grupo V. A los 24 meses, el grupo G es el que mostró el mayor porcentaje, con diferencias respecto a los grupos VQ y G.

12.2.3.- Ácido nervónico (C24:1 n-9)

El grupo de ratas alimentado con aceite de oliva virgen sin suplementar mostró un aumento en el porcentaje de ácido nervónico a los 18 meses de edad (*Figura 39.a*), con diferencias significativas respecto a los porcentajes encontrados a los 6 y 12 meses y un posterior descenso a los 24 meses, con diferencias significativas respecto al porcentaje encontrado a los 18 meses. Por su parte, el grupo de ratas alimentado con la otra fuente grasa sin suplementar mostró únicamente un descenso a los 18 meses con respecto al porcentaje encontrado a los 6 meses. En lo que respecta a los grupos suplementados (VQ y GQ) mostraron a los 12 y 18 meses un comportamiento similar, consistente en un descenso a los 12 meses y posterior ascenso a los 18 meses. A los 24 meses estos dos últimos grupos se comportaron de manera distinta, el grupo VQ mostró un incremento en el porcentaje de ácido nervónico con respecto a los 12 meses, aunque un descenso con respecto a los 18 meses y el grupo GQ mantuvo el porcentaje observado a los 18 meses con diferencias significativas respecto a los 12 meses.

A los 6 meses de edad se encontraron para este ácido graso diferencias entre los grupos alimentados con aceite de oliva virgen y los alimentados con aceite de girasol, con un mayor porcentaje en estos dos últimos grupos. Además, el grupo alimentado con aceite de oliva virgen suplementado mostró un mayor porcentaje que el grupo alimentado con la misma fuente grasa sin suplementar. A los 12 meses, el mayor porcentaje en ácido nervónico fue el mostrado por el grupo G, con diferencias significativas respecto a los tres grupos restantes. Además, se observó en este periodo de tiempo un porcentaje mayor en los grupos V y GQ con respecto al hallado en el grupo VQ. A los 18 y 24 meses el mayor porcentaje es el mostrado por el grupo GQ, con diferencias significativas respecto a los grupos V, VQ y G a los 18 meses y los grupos V y VQ a los 24 meses.

12.3.- Ácidos grasos poliinsaturados

La **Figura 40** muestra el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados totales. En lo que respecta a la evolución de estos ácidos grasos en el tiempo se observó a los 18 meses un aumento en el porcentaje de estos ácidos grasos en los grupos V y GQ respecto a los porcentajes encontrados a los 12 meses (23.4 ± 0.1 % vs. 21.7 ± 0.3 % y 20.7 ± 0.4 % vs. 18.5 ± 0.4 %, respectivamente). A los 24 meses, todos los grupos mostraron el mismo comportamiento para el total de ácidos grasos poliinsaturados, consistente en un aumento con respecto a los porcentajes encontrados a los 6, 12 y 18 meses de edad.

Respecto a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó a los 6 meses de edad los menores porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados totales en los grupos de animales alimentados con aceite de girasol, con diferencias significativas respecto a los grupos alimentados con aceite de oliva virgen. Además, se observó en este periodo de tiempo diferencias entre los grupos G y GQ (20.6 ± 0.2 % vs. 19.2 ± 0.3 %). A los 12 y 18 meses, se repitió el comportamiento observado por los distintos grupos de estudio a los 6 meses de edad, salvo por la ausencia de diferencias significativas entre los grupos G y GQ a los 18 meses. A los 24 meses solamente se observó diferencias entre los grupos V y G (26.2 ± 1.0 % vs. 22.6 ± 0.9 %).

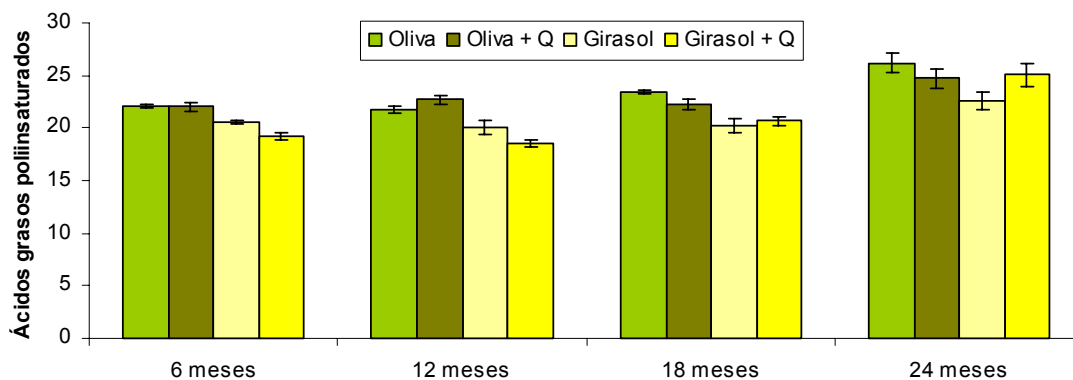


Figura 40 .- Niveles de ácidos grasos poliinsaturados totales (ω -6+ ω -3) en mitocondrias cerebrales procedentes de ratas alimentadas con dietas donde se modificó la calidad de la grasa alimentaria (se expresa en porcentaje del total ácidos grasos).

12.4.- Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6

La **Figura 41.b** muestra el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6. En lo que respecta a la evolución de estos ácidos grasos en el tiempo se observaron tan solo diferencias en los grupos suplementados con coenzima Q₁₀.

En el grupo VQ hubo a los 12 y 18 meses un descenso con respecto al porcentaje en estos ácidos grasos hallado a los 6 meses ($11.2 \pm 0.2 \%$ y $11.7 \pm 0.4 \%$ vs. $13.0 \pm 0.3 \%$), mientras que a los 24 meses mostró un ligero aumento presentando tan solo diferencias con respecto al porcentaje hallado a los 12 meses ($12.5 \pm 0.3 \%$ vs. $11.2 \pm 0.2 \%$). Por su parte, el grupo GQ mostró a los 18 meses un aumento en el porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 respecto al encontrado a los 12 meses ($14.1 \pm 0.3 \%$ vs. $12.3 \pm 0.3 \%$) y a los 24 respecto a los porcentajes hallados a los 6 y 12 meses ($15.1 \pm 0.6 \%$ vs. $14.1 \pm 0.3 \%$ y $12.3 \pm 0.3 \%$, respectivamente).

Respecto a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó a los 6 meses de edad el mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 en el grupo de animales alimentados con aceite de girasol sin suplementar, con diferencias significativas respecto a los tres grupos restantes (V, VQ y GQ) ($14.3 \pm 0.1 \%$ vs. $12.4 \pm 0.2 \%$, $13.0 \pm 0.3 \%$ y $13.2 \pm 0.2 \%$, respectivamente). Además se

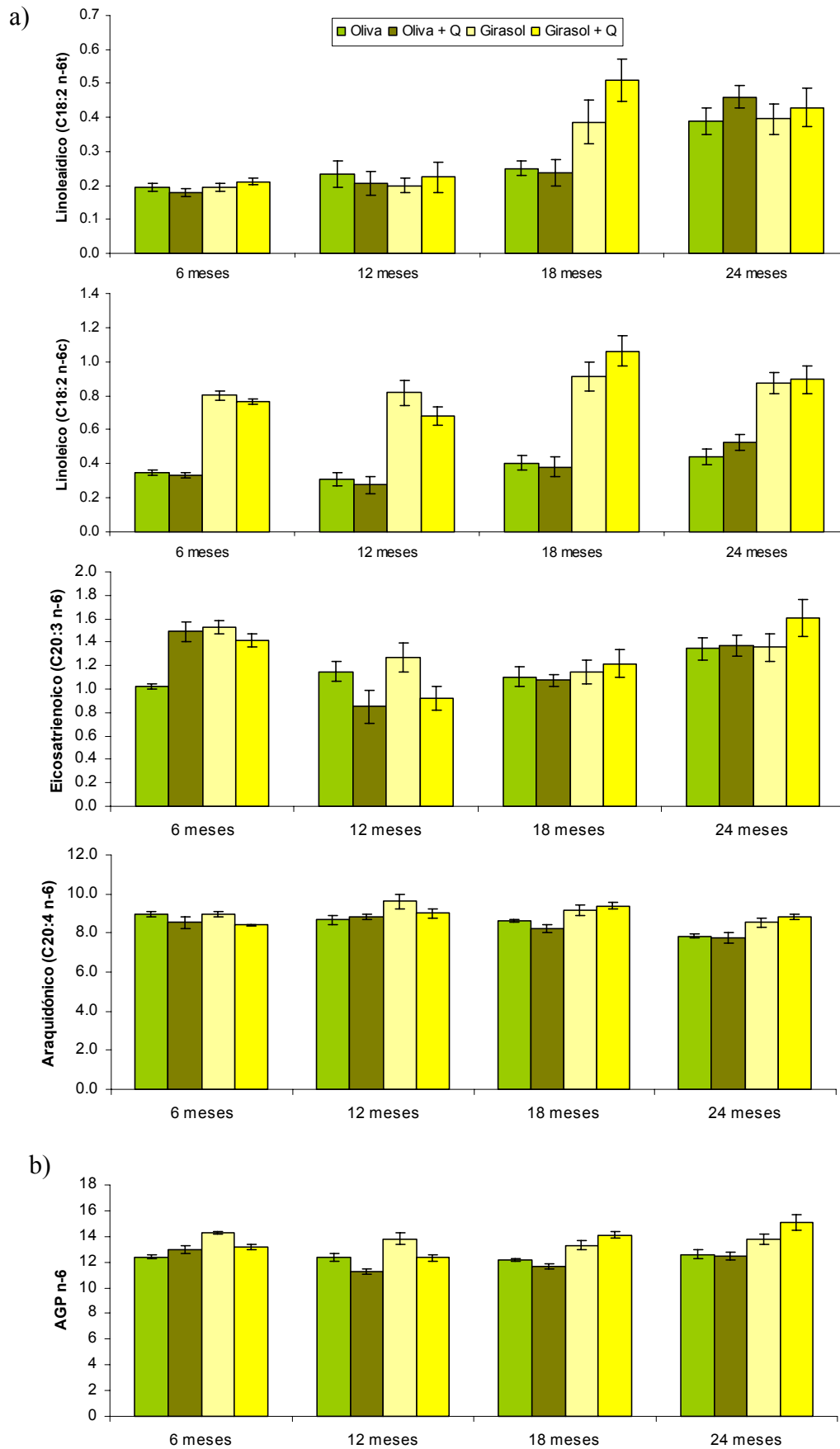


Figura 41 .- Niveles de ácidos grasos poliinsaturados n-6 en mitocondrias cerebrales procedentes de ratas alimentadas con dietas donde se modificó la calidad de la grasa alimentaria (se expresa en porcentaje del total ácidos grasos).

a) AG insaturados n-6 individuales

b) AG poliinsaturados totales

observaron diferencias significativas entre los grupos GQ y V. A los 12 meses se mantuvieron las diferencias entre el grupo G y los tres grupos restantes, encontrándose además diferencias significativas entre el grupo VQ y los grupos V y GQ ($11.2 \pm 0.2 \%$ vs. $12.3 \pm 0.3 \%$ y $12.3 \pm 0.3 \%$, respectivamente). A los 18 y 24 meses, los grupos alimentados con aceite de girasol mostraron un mayor porcentaje en estos ácidos grasos que los hallados en los grupos alimentados con aceite de oliva virgen, hallándose además diferencias significativas entre los grupos G y GQ ($13.3 \pm 0.3\%$ vs. $14.1 \pm 0.3\%$ a los 18 meses y $15.1 \pm 0.6 \%$ vs. $13.8 \pm 0.4 \%$ a los 24 meses).

A continuación se describe el comportamiento de algunos ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 de manera independiente.

12.4.1.- Ácido linoleico (C18:2 n-6)

Los grupos de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen mostraron un incremento en el porcentaje de ácido linoleico a los 24 meses de edad, con diferencias significativas respecto a los valores encontrados a los 6 y 12 meses para el grupo V y a los 6, 12 y 18 meses en el grupo VQ (*Figura 41.a*). Por su parte, los grupos alimentados con aceite de girasol solo mostraron diferencias en el caso del grupo alimentado con esta fuente grasa y suplementado con coenzima Q₁₀, con un incremento a los 18 meses (con diferencias significativas respecto a los 6 y 12 meses) y un mantenimiento a los 24 meses (solo mostró diferencias significativas respecto a los 12 meses).

Respecto a las diferencias entre grupos para cada periodo de tiempo, se observó siempre el mismo comportamiento, consistente en un mayor porcentaje de ácido linoleico en los grupos alimentados con aceite de girasol (G y GQ).

12.4.2.- Ácido eicosatrienoico (C20:3 n-6)

El comportamiento de este ácido graso en base a la dieta y la edad es mostrado en la *Figura 41.a*. Respecto a la edad, se observa a los 12 meses una disminución en los porcentajes encontrados en los grupos suplementados con coenzima Q₁₀ respecto a los encontrados a los 6 meses, a los 18 meses se observa un descenso en los grupos V, G y GQ respecto a los valores hallados a los 6 meses y finalmente, a los 24 meses se

observó un incremento en el porcentaje de ácido eicosatrienoico en el grupo V (con diferencias respecto a los valores hallados a los 6 y 18 meses), en el grupo VQ (con diferencias respecto a los valores hallados a los 12 y 18 meses) y en el grupo GQ (con diferencias respecto a los valores hallados a los 12 y 18 meses).

Respecto a la grasa, a los 6 meses se observó en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva virgen sin suplementar un porcentaje menor que el encontrado en los tres grupos restantes. A los 12 meses, tan solo se hallaron diferencias entre los grupos G y VQ, con un menor porcentaje en este último. A los 18 y 24 meses no se hallaron diferencias significativas entre los grupos objeto de estudio.

12.4.3.- Ácido araquidónico (C20:4 n-6)

Respecto a la evolución de este ácido graso en el tiempo (*Figura 41.a*), a los 12 y 18 meses solo se observó un mayor porcentaje en el grupo GQ respecto a los valores hallados a los 6 meses. Las mayores diferencias fueron encontradas a los 24 meses de edad. En este periodo de tiempo, el grupo V mostró una disminución en el porcentaje de ácido araquidónico respecto a los valores encontrados a los 6, 12 y 18 meses, el grupo VQ respecto a los encontrados a los 6 y 12 meses, el grupo G respecto a los 12 meses y el grupo GQ respecto a los 18 meses.

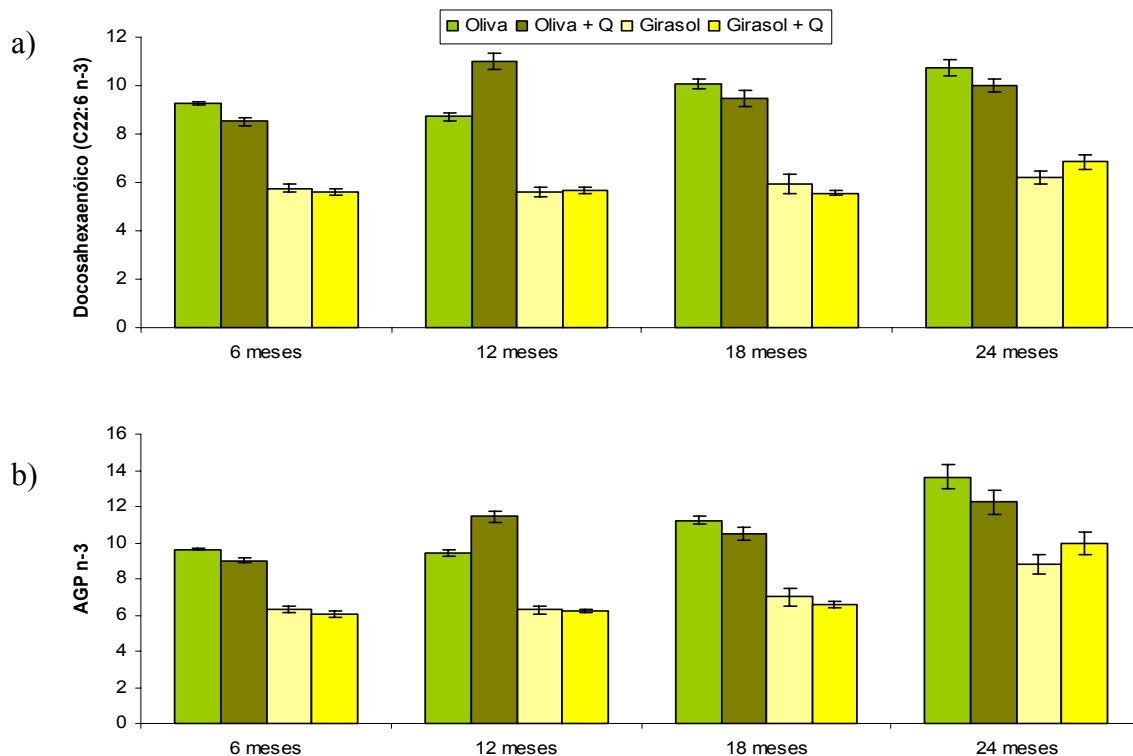
Respecto a las diferencias entre grupos para cada periodo de tiempo, se observó a los 6 meses un menor porcentaje de ácido araquidónico en el grupo GQ, aunque solo diferente al encontrado en el grupo V. A los 12 meses, el grupo G mostró un mayor porcentaje en este ácido graso poliinsaturado que los animales de los grupos alimentados con aceite de oliva virgen. A los 18 y 24 meses, los animales de los grupos alimentados con aceite de girasol mostraron mayores porcentajes que los alimentados con aceite de oliva virgen.

12.5.- **Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3**

La *Figura 42.b* muestra el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3. En lo que respecta a la evolución de estos ácidos grasos en el tiempo se observaron a los 12 y 18 meses de edad tan solo diferencias en los grupos alimentados con aceite de

oliva virgen. A los 12 y 18 meses en grupo VQ mostró un incremento en el porcentaje de estos ácidos grasos respecto al valor encontrado a los 6 meses de edad ($11.4 \pm 0.3 \%$ y $10.5 \pm 0.3 \%$ vs. $9.0 \pm 0.2 \%$) y a los 18 meses el grupo V mostró un incremento respecto a los valores hallados a los 6 y 12 meses ($11.2 \pm 0.2 \%$ vs. $9.6 \pm 0.1 \%$ y $9.4 \pm 0.2 \%$, respectivamente). A los 24 meses los grupos V, G y GQ mostraron un porcentaje en estos ácidos grasos poliinsaturados mayor que los encontrados a los 6, 12 y 18 meses y el grupo VQ mayor que a los 6 y 18 meses de edad.

Respecto a las diferencias entre grupos para un mismo periodo de tiempo, se observó en todos los periodos de tiempo estudiados (6, 12, 18 y 24 meses) un menor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 en los grupos alimentados con aceite de girasol respecto a los encontrados en los grupos alimentados con aceite de oliva virgen. Además a los 6 y 12 meses se observaron diferencias entre los grupo V y VQ ($9.6 \pm 0.1 \%$ vs. $9.0 \pm 0.2 \%$ a los 6 meses y $9.4 \pm 0.2 \%$ vs. $11.4 \pm 0.3 \%$ a los 12 meses).



12.5.1.- Ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3)

Las diferencias observadas para este ácido graso poliinsaturado de la serie n-3 son las mismas que las descritas para el total de ácidos grasos poliinsaturados de esta serie, tanto en lo referente al tiempo como a la dieta (*Figura 42.a*).

12.6.- **Relación ácido oleico/ácido linoleico**

La relación de estos dos ácidos grasos se muestra en la *Figura 43.a*. Se observó en todos los grupos objeto de estudio una disminución en esta relación a los 18 meses respecto a los valores encontrados para la misma a los 6 y 12 meses de edad. A los 24 meses se mantuvieron los valores encontrados a los 18 meses en los grupos de animales alimentados con aceite de girasol y se redujo en los alimentados con aceite de oliva virgen, con diferencias significativas respecto a los encontrados a los 18 meses de edad.

Respecto a las diferencias entre grupos para cada periodo de tiempo, se observó que en todos los periodos estudiados los grupos alimentados con aceite de girasol mostraron una menor relación oleico/linoleico que los alimentados con aceite de oliva virgen.

12.7.- **Relación ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos poliinsaturados (AGM/AGP)**

Respecto a la evolución en el tiempo (*Figura 43.b*) se observó a los 12 meses un descenso en esta relación en los grupos suplementados respecto a los valores obtenidos a los 6 meses ($1.07 \pm 0.0 \%$ vs. $1.5 \pm 0.0 \%$ para el grupo VQ y $1.4 \pm 0.0 \%$ vs. $1.7 \pm 0.0 \%$ para el grupo GQ). A los 18 meses todos los grupos mostraron un descenso en esta relación respecto a los valores hallados a los 6 y 12 meses, salvo el grupo VQ que mostró un ascenso respecto al valor hallado a los 12 meses. Finalmente, a los 24 meses se observó en todos los grupos un descenso en el valor de la relación AGM/AGP en todos los grupos objeto de estudio respecto a los valores hallados a los 6, 12 y 18 meses de edad.

Respecto a las diferencias entre grupos, se observó a los 6 meses un mayor valor para esta relación en los grupos alimentados con aceite de girasol que en los alimentados con aceite de oliva virgen, además se observó un mayor valor en el grupo

VQ que el hallado en el grupo V (1.5 ± 0.0 % vs. $1.3 \pm 0.0\%$). A los 12 meses se mantuvieron las diferencias entre los grupos alimentados con aciete de girasol y los alimentados con aciete de oliva virge, sin embargo, el grupo VQ presentó en este periodo un menor valor para la relación AGM/AGP que el grupo V (1.1 ± 0.0 % vs. 1.4 ± 0.0 %). A los 18 meses se observaron diferencias entre los grupo G y V (1.3 ± 0.1 % vs. 1.1 ± 0.0 %). A los 24 meses de edad fue el grupo GQ el que mostró un mayor valor para esta relación, con diferencias significativas respecto a los grupos V y VQ (1.0 ± 0.1 % vs. 0.9 ± 0.0 % y $0.9 \pm 0.0\%$, respectivamente).

12.8.- Relación ácido araquidónico/ácido docosaheanoico (ARA/DHA)

Respecto a la evolución en el tiempo, las diferencias se observaron a los 18 y 24 meses (**Figura 43.c**). El grupo V mostró a los 18 meses un menor valor para esta relación que la encontrada a los 6 y 12 meses y a los 24 menor que la encontrada a los 6, 12 y 18 meses (0.7 ± 0.0 vs. 1.0 ± 0.0 , 1.0 ± 0.0 y 0.9 ± 0.0 , respectivamente), el grupo VQ a los 18 meses menor que la encontrada a los 6 meses y a los 24 menor que a los 6 y 18 meses (0.8 ± 0.0 vs. 1.0 ± 0.0 y 0.9 ± 0.0 , respectivamente). El grupo G mostró únicamente un descenso en el valor de esta relación a los 24 meses respecto a los 12 meses de edad (1.4 ± 0.1 vs. 1.7 ± 0.0) y el grupo GQ un incremento a los 18 meses respecto a los 6 y un descenso a los 24 meses respecto a los 6, 12 y 18 meses de edad (1.3 ± 0.1 vs. 1.5 ± 0.0 , 1.6 ± 0.0 y 1.7 ± 0.0 , respectivamente).

Los grupos de animales alimentados con aceite de girasol mostraron en todos los periodos de tiempo estudiados (6, 12, 18 y 24 meses de edad) un mayor valor para la relación ARA/DHA que la encontrada en los grupos alimentados con aceite de oliva. Además, se observó a los 12 meses un menor valor en el grupo VQ respecto al grupo V (0.8 ± 0.0 vs. 1.0 ± 0.0) y en el grupo GQ respecto al grupo G (1.6 ± 0.0 vs. 1.7 ± 0.0)

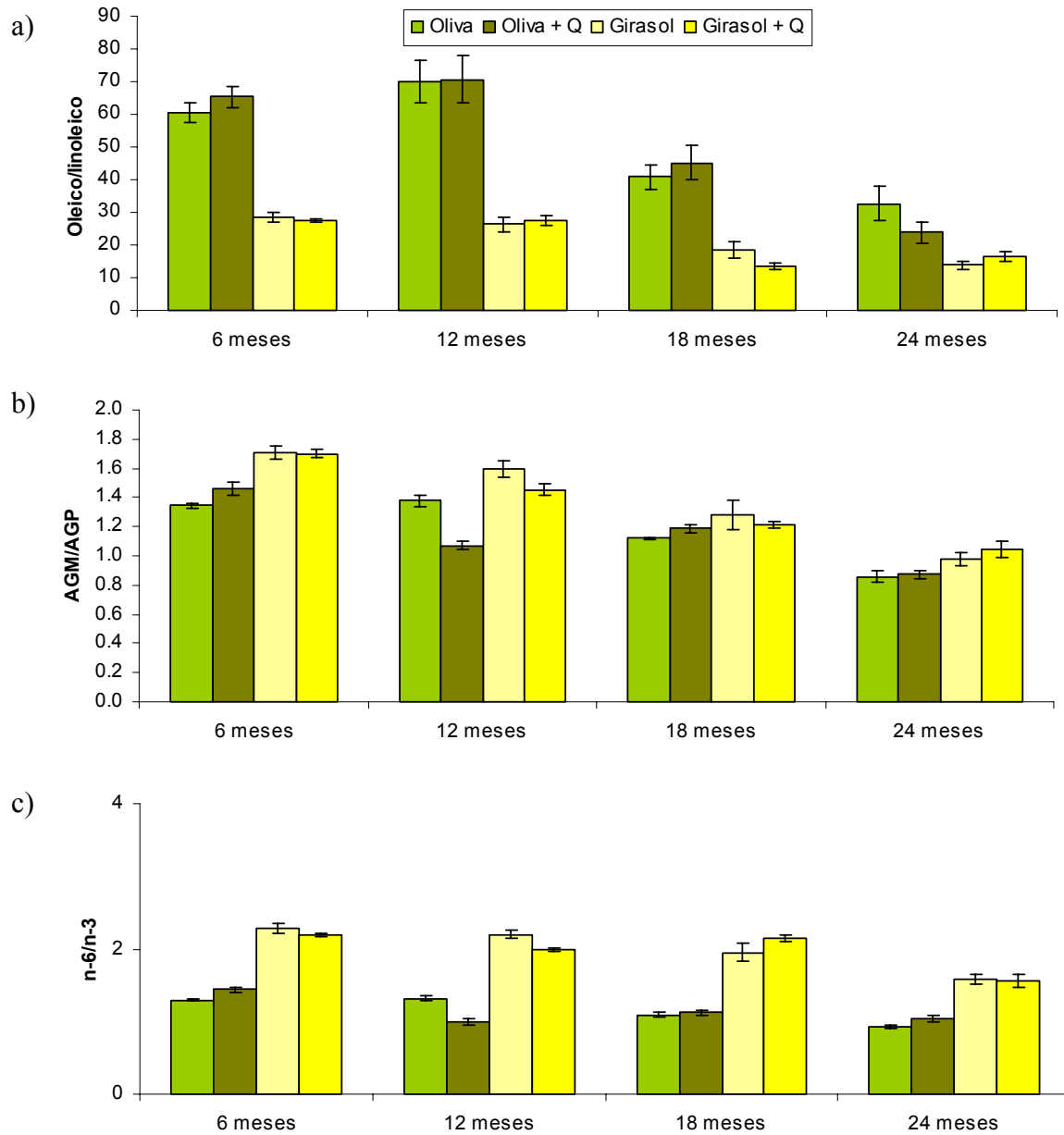


Figura 43 .- Relaciones diversas entre ácidos grasos insaturados (ω -9, ω -6, y ω -3) de mitocondrias cerebrales procedentes de ratas alimentadas con dietas donde se modificó la calidad de la grasa alimentaria.

12.9.- Índice de insaturación

El grupo de animales alimentado con aceite de oliva virgen sin suplementar no mostró diferencias respecto al tiempo para este índice (*Figura 44.a*); por el contrario en el grupo alimentado con la misma fuente grasa suplementada con coenzima Q aparece un descenso en este índice a los 12, 18 y 24 meses respecto al valor hallado a los 6

meses de edad (2.5 ± 0.1 , 2.5 ± 0.1 y 2.5 ± 0.1 vs. 2.9 ± 0.1). El grupo alimentado con aceite de girasol sin suplementar mostró a los 12 meses un descenso en esta relación respecto a los 6 meses (2.5 ± 0.1 vs. 2.8 ± 0.1) y a los 18 y 24 meses respecto a los 6 y 12 meses. Por el contrario, en el grupo alimentado con la misma fuente grasa suplementada se puede comprobar un descenso a los 12 y 18 meses respecto a los 6 meses, aunque a los 24 meses hubo un ascenso en el índice de insaturación respecto a los valores hallados a los 6, 12 y 18 meses (2.7 ± 0.2 vs. 2.4 ± 0.1 , 2.0 ± 0.1 y 2.1 ± 0.1 , respectivamente).

Respecto a las diferencias entre grupos, se observó a los 6 y 12 meses de edad un menor valor para este índice en el grupo de animales alimentados con aceite de girasol suplementado, con diferencias significativas respecto a los tres grupos restantes. A los 18 meses, los grupos alimentados con aceite de oliva mostraron un mayor valor para este índice que los alimentados con aceite de girasol, y además se observaron diferencias entre los grupos V y VQ (2.7 ± 0.0 vs. 2.5 ± 0.1). Finalmente, a los 24 meses el mínimo valor fue el obtenido por el grupo G, con diferencias significativas respecto a los grupos V y GQ (2.2 ± 0.1 vs. 2.8 ± 0.1 y 2.7 ± 0.2 , respectivamente); por el contrario el máximo valor fue el encontrado por el grupo GQ, con diferencias significativas respecto a los tres grupos restantes.

12.10.- Índice de peroxidación

A los 12 meses el grupo VQ mostró un aumento en este índice respecto a los 6 meses (87.7 ± 1.8 vs. 79.9 ± 1.5) (**Figura 44.b**) y a los 18 meses el grupo V respecto a los 12 meses (86.8 ± 0.7 vs. 79.7 ± 1.5). A los 24 meses, el grupo V y GQ mostró un ascenso en el valor de este índice respecto a los 6, 12 y 18 meses, el grupo VQ respecto a los 6 y 18 meses (89.8 ± 2.9 vs. 79.9 ± 1.5 y 82.2 ± 2.1) y el grupo G respecto a los 12 meses (74.7 ± 2.9 vs. 67.2 ± 2.3).

Respecto a las diferencias entre grupos, se observó en todos los periodos de tiempo un menor valor para este índice en los grupos alimentados con aceite de girasol que en los alimentados con aceite de oliva virgen. Además, se observó a los 6 meses un menor valor en el grupo GQ que en el grupo G (64.6 ± 1.1 vs. 68.7 ± 0.8) y a los 12 meses un mayor valor en el grupo VQ que en el grupo V (87.7 ± 1.8 vs. 79.7 ± 1.5).

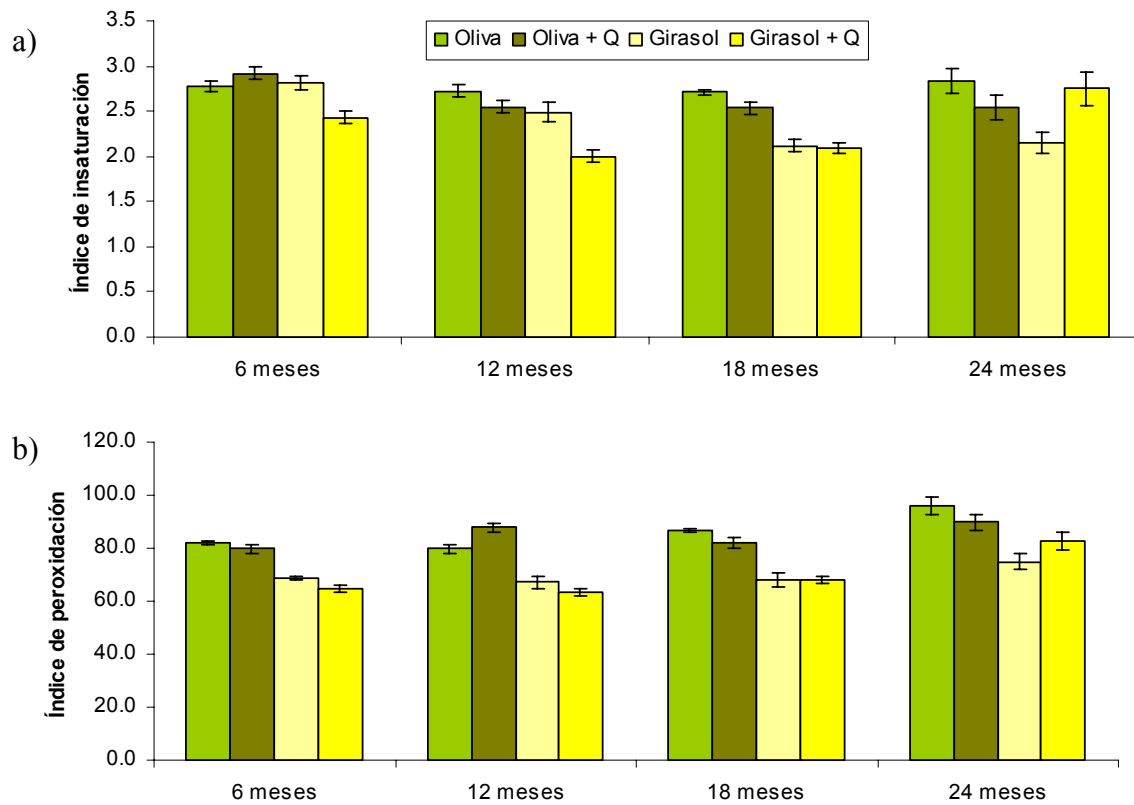


Figura 44 .- Índice de insaturación (a) y de peroxidación (b) en mitocondrias cerebrales procedentes de ratas alimentadas con dietas donde se modificó la calidad de la grasa alimentaria.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1.-RESPECTO DE LOS PESOS DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS

En la **Figura 26** se muestra la evolución de los pesos de los animales de los cuatro grupos considerados. Tal como se puso de manifiesto en el apartado correspondiente de resultados (apartado 1), los animales evolucionaron desde un punto de vista ponderal de una manera que se puede considerar normal, ganando peso de manera gradual desde el comienzo del estudio hasta el momento del sacrificio a los veinticuatro meses.

En el mismo sentido, los valores de los pesos de los animales de los cuatro grupos experimentales se puede considerar que están dentro de la normalidad en relación a la raza, edad y sexo de las ratas y concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios, incluidos los nuestros (*Hubert, M.F. et al, 2000; Quiles, J.L. et al, 2004a; Quiles, J.L. et al, 2004b*). Además, estudios realizados en relación al peso medio de ratas viejas corroboran que este parámetro es inversamente proporcional a la tasa de supervivencia del animal (*Laroque, P. et al, 1997*).

Lo acabado de expresar parece lo suficientemente concluyente a pesar de que existieran algunas diferencias estadísticamente significativas especialmente cuando se consideran edades distintas. No obstante a los 24 meses todos los animales mostraron unos pesos muy similares entre los cuatro grupos experimentales.

Las diferencias poco acusadas y la heterogeneidad del hecho, unido a la evolución general de los pesos, nos hace concluir que la variabilidad citada no es la expresión de un efecto graso ni del coenzima Q, sino algo que debe aceptarse como variabilidad fisiológica.

2.- RESPECTO DEL PESO CEREBRAL

En cuanto al peso del cerebro de los animales experimentales no existe, tal como se muestra en **Figura 26**, ninguna diferencia ni entre edades ni entre grupos. A los seis meses los animales de los cuatro grupos ya presentaron el mismo peso cerebral que al

final del periodo experimental, hecho que corresponde a la normalidad fisiológica puesto que las ratas al nacer ya presentan un cerebro casi completamente desarrollado y a los seis meses muestran un órgano prácticamente maduro.

Con respecto a la relación peso/cerebro de la rata se encuentra, como era previsible dado el aumento del peso, que a medida que envejecen los animales aparece una disminución de la misma, hecho que se puede considerar absolutamente normal en el crecimiento y desarrollo de los animales experimentales.

No hubo diferencias entre los cuatro grupos experimentales en cualquier edad o periodo analizado, tan sólo a los 18 meses de edad en el grupo donde la grasa alimentaria fue girasol la relación disminuyó, lo que se explica por el mayor aumento de peso en ese grupo y a esa edad. Dada esa circunstancia concreta y la falta de diferencias al final del periodo experimental, las diferencias significativas que se encuentran entre algunos grupos de animales no permiten concluir que pueda existir algún efecto de la grasa alimentaria con presencia o no del coenzima Q.

En definitiva y tal y como se ha comentado anteriormente, habrá que entender pues, que ni los pesos de los animales, ni el peso de sus estructuras cerebrales se ven afectados por la calidad de la grasa.

3.- RESPECTO DE LOS NIVELES DE HIDROPERÓXIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

3.1.- Niveles de hidroperóxidos basales

Los niveles de hidroperóxidos de las membranas basales del cerebro es una medida suficientemente fiable del grado de estrés oxidativo que existe en las citadas estructuras cerebrales.

El aspecto global más evidente a destacar, es que en la edad avanzada de los 24 meses, las ratas muestran un grado de daño oxidativo medido por los niveles de hidroperóxidos superior a cualquiera de las edades más tempranas consideradas. Así mismo esto ocurre a los 12 y 18 meses al comparar con valores iniciales de 6 meses.

(**Figura 27**). Este hecho estaría de acuerdo con todo que se ha postulado sobre el envejecimiento y el estrés oxidativo (*Harman 1956; Miquel, 1980*), así como con lo observado por otros autores, aunque utilizando otros marcadores de daño oxidativo (*Mecocci, P. et al, 1993; Ames, B.N. et al, 1993*)

El otro aspecto importante es lo que ocurre cuando se comparan dentro de un mismo momento estudiado, los valores obtenidos con los grupos cuya grasa alimentaria fueron aceites distintos suplementados o no con coenzima Q. Existe una evidencia muy palpable, y es que los niveles de hidroperóxidos en las membranas mitocondriales de los animales alimentados con aceite de girasol eran en todos los casos superiores a aquellos correspondientes a aceite de oliva virgen. Esto concuerda con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en ratas alimentadas a lo largo de su vida con aceites con distinto grado de insaturación, aunque en otros órganos postmitóticos (corazón y músculo) (*Ochoa, J.J. et al, 2003*).

La explicación obligada de este menor daño oxidativo de las membranas mitocondriales de los grupos alimentados con aceite de oliva virgen, reside en el hecho de que las membranas mitocondriales (y en general todas las membranas biológicas) son capaces de adaptar la composición de sus fosfolípidos a la grasa ingerida de forma mayoritaria (*Huertas, J.R. et al., 1991b; Quiles, J.L., et al, 1999b; Ochoa-Herrera, J.J., et al, 2201; Ochoa. J.J., et al, 2003; Quiles, J.L., et al, 2005*). De este modo, si un individuo ingiere mayoritariamente grasa de origen animal, sus membranas serán más ricas en grasa saturada que las de otro individuo cuya fuente grasa mayoritaria sea de origen vegetal. Además, el estrés oxidativo está enormemente relacionado con la composición lipídica de las membranas biológicas, de modo que una fuente grasa poliinsaturada (aceite de girasol, por ejemplo) generará membranas más susceptibles al daño oxidativo que una fuente grasa monoinsaturada (aceite de oliva, por ejemplo), lo cual ha sido ampliamente demostrado en numerosas situaciones fisiológicas y patológicas y empleando modelos animales y humanos (*Ramírez-tortosa, M.C. et al, 1999; Quiles, J.L., et al, 1999c; Quiles, J.L. et al, 2002; Ochoa, J.J. et al, 2002; Ochoa, J.J. et al, 2003; Quiles, J.L. et al, 2005*). Este aspecto será confirmado y discutido de modo detallado más adelante.

Un tercer aspecto es lo que ocurre cuando se comparan los valores correspondientes a un mismo aceite pero con suplementación con coenzima Q y sin ella.

En este caso cuando la grasa fue aceite de oliva sólo se percibió un menor índice de daño oxidativo con suplementación en dos de los periodos estudiados (12 y 24 meses). Cuando la grasa alimentaria fue aceite de girasol la suplementación con coenzima Q mostró una mayor protección antioxidativa en todos los casos, lo cual concuerda con datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación aunque en un órgano postmitótico diferente, el corazón (*Ochoa, J.J., et al, 2005*). Este hecho lo diferencia, aunque no sea fuertemente, del aceite de oliva, lo que puede interpretarse como que este último alcanza por sí sólo una mayor protección de la que sucede con el aceite de girasol y por lo tanto es menos necesaria una suplementación con antioxidantes. Además, esto en parte se confirma con el hecho de que el efecto de la suplementación con coenzima Q sobre los hidroperóxidos en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva tan solo se ve de manera significativa en los dos periodos de tiempo en los que los niveles de hidroperóxidos son más elevados, es decir, a los 12 y 24 meses de vida.

3.2.- Niveles de hidroperóxidos inducidos

Cuando se indujo una agresión oxidativa con AAPH, compuesto capaz de generar radicales libres, maniobra que tiene por objeto visualizar mejor el fenómeno de la defensa oxidativa, los resultados encontrados difieren poco en términos cualitativos de los que se aparece en el caso de los niveles basales de hidroperóxidos.

Así, al final del periodo estudiado se encuentran los mayores valores de hidroperóxidos y en todos los casos estos fueron mayores que los hallados inicialmente a los 6 meses.

Cuando se comparan los valores obtenidos con los animales alimentados con aceite de oliva respecto a los que tomaron girasol en iguales condiciones se encuentran diferencias en tres de los cuatro periodos estudiados (6, 18 y 24 meses), hecho que también ocurre cuando el aceite de oliva estaba suplementado con coenzima Q. Parece claro, a pesar de la falta de diferencia a los 12 meses, que el aceite de oliva condiciona a lo largo de la vida del animal una mayor protección oxidativa que el de girasol incluso cuando teóricamente está protegido por un antioxidante. Como hemos comentado anteriormente, esta mayor protección antioxidativa del aceite de oliva virgen con

respecto al aceite de girasol durante el envejecimiento ha sido observada previamente por nuestro grupo de investigación tanto en plasma como en otros órganos de rata (Ochoa et al, 2003; Quiles, J.L. et al, 2004a).

En relación a lo que sucede cuando se comparan animales alimentados con un mismo aceite suplementado o no con coenzima Q, con respecto al grupo alimentado con aceite de oliva virgen, parece existir un patrón semejante al observado en los hidroperóxidos basales, aunque tan solo es significativo a los 24 meses de vida. Con respecto al grupo girasol, la protección es evidente prácticamente en todos los periodos estudiados, lo cual como se ha comentado anteriormente puede ser debido a la mayor agresión oxidativa que sufre este grupo como consecuencia de la fuente grasa poliinsaturada y por lo tanto la mayor necesidad de una suplementación con este antioxidante. Lo que si se muestra de manera clara es que en ambos grupos de grasas, el coenzima Q muestra una mayor protección oxidativa al final de la vida (24 meses de edad), periodo en el cual el daño por estrés oxidativo es más perjudicial para el organismo en general. Es decir, los datos obtenidos con este parámetro parecen mostrar que las membranas mitocondriales viejas provenientes de los animales suplementados, podrían estar mejor preparadas para resistir el daño oxidativo que las provenientes de animales no suplementados. Este dato es de gran importancia ya que uno de los problemas de las mitocondrias envejecidas es que son más susceptibles al daño oxidativo y por lo tanto predisponen al órgano a un mayor daño durante la agresión oxidativa (Lesnefsky, E.J., et al, 2001; Ochoa, J.J. et al, 2005).

4.- RESPECTO DE LA PRODUCCIÓN DE DICLOFLUORESCEINA OXIDADA

Otra forma de valorar el daño oxidativo existente en las mitocondrias cerebrales es a través de la cuantificación de especies reactivas de oxígeno mediante la utilización del ensayo fluorimétrico de la sonda de diclorofluoresceína diacetato, cuyos resultados se indican en la **Figura 36**.

La consideración evolutiva del parámetro considerado permite concluir cuando se contempla el fenómeno de una manera global, que hay un aumento a lo largo de la vida del animal, lo cual estaría de acuerdo con el hecho evidenciado en muchos

estudios, incluidos los nuestros, del grado de estrés oxidativo (*Huertas, J.R. et al, 1999; Ochoa, J.J. et al, 2003; Quiles, J.L. et al, 2004a; Quiles J. L. et al, 2005*).

Dentro de esa visión del problema de lo que ocurre en el periodo final respecto al inicial, están los valores intermedios a los 12 y 18 meses en donde se ve una caída en este último periodo respecto al anterior. Esta situación, es similar a la observada con el otro indicador de daño oxidativo estudiado, siendo difícil de interpretar desde una perspectiva fisiológica. Se podría relacionar con el mayor contenido y/o actividad observado en este periodo de tiempo de algunos antioxidantes como el coenzima Q10 y la catalasa, aunque esto requiere de una mayor investigación y por lo tanto no es posible concluir que estos antioxidantes muestren un mayor efecto en este periodo de tiempo. Por lo que tan solo se puede mostrar que es lo que ocurre con este parámetro en nuestras condiciones experimentales.

Cuando se consideran comparativamente los valores obtenidos a partir de animales de los distintos grupos dentro de cada periodo considerado, se pueden concluir ciertos aspectos sobresalientes. El primero es que los máximos valores de diclorofluoresceína oxidada lo presentan los animales que tomaron como grasa alimentaria aceite de girasol, y por tanto indica que en estos grupos es donde más especies reactivas se producen. Este hecho está de acuerdo con unas membranas mitocondriales más sensibles al daño oxidativo, como se ha comentado anteriormente.

Un segundo hecho destacable es que los valores correspondientes a los dos grupos de aceite de oliva son iguales cuando se comparan para un mismo periodo de tiempo, aunque en lo que respecta a la evolución con la edad, si se observa que el grupo suplementado alimentado con aceite de girasol sin suplementar muestra un mayor valor en la producción de especies reactivas a los 24 meses con respecto a los 6 meses, efecto no observado en el grupo suplementado. Este efecto, junto al efecto más claro observado en el grupo alimentado con aceite de girasol, muestra una protección del coenzima Q sobre la producción de especies reactivas del oxígeno y concuerda con lo observado anteriormente por nuestro grupo y otros grupos de investigación acerca de la protección oxidativa del coenzima Q durante el envejecimiento (*Quiles, J.L. et al, 2004b; Ochoa, J.J., et al, 2005; Lee, C. K., 2004; Linnae, A. W., 2002*).

5.- RESPECTO DEL CONTENIDO DE α -TOCOFEROL EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

Tal como se expresó en la *Figura 28*, existe un primer hecho que llama la atención y es el gran aumento de alfa-tocoferol que existe en los dos grupos de animales en que el aceite de la dieta se suplemento con coenzima Q a los 6 y 12 meses de edad, especialmente en este último caso. Nuestro grupo, así como otros grupos de investigación han mostrado que la suplementación con coenzima Q, a corto plazo y altas dosis y/o a largo plazo y bajas dosis, incrementa en la membrana los niveles de alfa-tocoferol (*Ochoa J. J. et al, 2005; Kwong L. K., et al, 2002; Lass, A. et al, 1999*). Sin embargo, el porqué este incremento se observa de manera clara tan solo en los dos primeros periodos de vida del animal es difícil de interpretar con tan solo nuestros datos y por lo tanto tan solo se puede sugerir como una posible explicación, la necesidad de la membrana de buscar una relación adecuada de este antioxidante con los niveles de coenzima Q junto al aparente menor daño oxidativo en las membranas mitocondriales a los 6 y 12 meses de vida, que permitiría mantener unos mayores niveles de este antioxidante debido a su menor gasto. Aunque también se puede considerar el hecho de que el efecto del coenzima Q sobre los niveles de α -tocoferol en mitocondrias de cerebro sea tan solo significativo en los primeros meses de vida y que posteriormente no ejerza este efecto de manera tan fuerte, como ha sido observado en mitocondrias de corazón de ratas envejecidas y suplementadas a lo largo de su vida con este antioxidante (*Ochoa, J.J. et al, 2005*). En definitiva, es necesaria una investigación más profunda de este aspecto.

Teniendo incluso en cuenta el hecho comentado, se observa de una manera global que a lo largo de la vida aumentan los niveles de α -tocoferol en las membranas mitocondriales de cerebro, manteniendo similares contenidos a los 12 y 18 meses de edad, que se pueden considerar como un periodo de madurez o mantenimiento fisiológico. Una posible explicación a este hecho es un intento de la mitocondria de mantener una eficaz defensa antioxidante en el último periodo de la vida donde el daño oxidativo es mayor y por tanto más nocivo.

En los grupos no suplementados con coenzima Q se observa en general un mayor contenido en α -tocoferol a los 24 meses de vida. Este mayor concentración de alfa-tocoferol al final de la vida del animal ha sido observado en estudios previos en otros órganos de rata envejecida (*Ochoa et al, 2003; Ochoa et al, 2005; Van Der Loo et al, 2002*), habiéndose postulado, en este sentido, la posibilidad de que exista un sistema de defensa antioxidante compensatorio para contrarrestar el estrés oxidativo asociado al envejecimiento y por lo tanto algunos antioxidantes podrían acumularse en los sitios en los cuales ellos son más necesitados, siendo uno de los principales el α -tocoferol.

6.- RESPECTO AL CONTENIDO EN COENZIMA Q EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

6.1.- Adaptación a la suplementación con coenzima Q₁₀

Los objetivos de este estudio son por un lado comprobar si una manipulación alimentaria a través de la grasa puede modular el proceso de envejecimiento de la mitocondria en cerebro de rata y por otro lado, si la suplementación con coenzima Q₁₀ puede ayudar a esta posible modulación llevada a cabo por la grasa alimentaria. La suplementación con coenzima Q₁₀ se ha realizado por dos razones, en primer lugar por ser componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y en segundo lugar por su importante papel antioxidante (*Mellors, A. y Tappel, A.L., 1966; Battino, M. et al, 1990; Litarru, G.P., 1995*).

Por lo tanto, es importante comprobar en primer lugar si los grupos de animales suplementados han adaptado o modificado su contenido mitocondrial en coenzima Q₁₀.

Los estudios que han llevado a cabo suplementaciones con coenzima Q en roedores son numerosos (*Zhang, Y, et al, 1995; Lonrot, K, et al, 1998; Lass, A, et al., 1999; Kwong, L.K., et al., 2002, Ochoa, J.J. et al, 2005*) y los resultados obtenidos varían ampliamente en función de parámetros tan diversos como el tipo de material biológico analizado, órgano utilizado, edad de los animales al comienzo y final de la suplementación, duración de la suplementación, cantidad de coenzima Q₁₀ utilizado e incluso metodología empleada para la determinación de coenzima Q.

De estos estudios se obtienen diversas conclusiones, entre las cuales se encuentra que en plasma y tejidos con alta capacidad de generación como el hígado, se manifiesta de forma más pronunciada el proceso de adaptación que en otros órganos como cerebro o corazón, los cuales son más resistentes a incrementar sus concentraciones de coenzima Q a través de fuentes exógenas (kwong, L. K., 2002).

En líneas generales, los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales muestran, como se puede observar en la **Figura 29**, que se produce una adaptación del contenido mitocondrial del coenzima Q₁₀ a la dieta, sobre todo a los 18 y 24 meses de edad. Este hecho permite afirmar que nuestra suplementación a lo largo de la vida basada en una baja concentración de coenzima Q₁₀ (0.7 mg/kg/día) da lugar a un buen patrón de adaptación en mitocondrias de cerebro de rata.

Este efecto, junto a la adaptación del perfil lipídico de la membrana a la grasa alimentaria, tiene una importancia elevada, ya que abre las puertas a una posible terapia antienvjecimiento a través de la dieta.

En el siguiente apartado veremos con más detalle el efecto del envejecimiento y la grasa alimentaria sobre el contenido mitocondrial en coenzima Q₁₀.

6.2.-Contenido en coenzima Q₉, coenzima Q₁₀ y coenzima Q₉+Q₁₀

Respecto al coenzima Q₉, los valores mostrados en la **Figura 29**, globalizándolos en un intento de buscar un comportamiento uniforme, indican que todos los grupos, a los 12, 18 y 24 meses de vida, aumentan los contenidos en coenzima Q₉ respecto a los valores de inicio correspondientes a los 6 meses de edad. Sin embargo, al final del periodo experimental (24 meses), los niveles del citado antioxidante descienden, manteniéndose los valores dentro de un rango similar al observado en la época intermedia de madurez, 12 y 18 meses. Esta evolución es similar a la anteriormente discutida de α -tocoferol, con la excepción de lo ocurrido en el último periodo que en este caso aumentaba, mientras que en el supuesto de coenzima Q disminuye.

Es difícil de explicar de una misma manera esta distinta actuación antioxidante, pues si en el caso del α -tocoferol parece lógico suponer que hay un intento celular de atenuar el daño oxidativo incrementando sus niveles de membrana, en el coenzima Q₉ parece que hay un menor contenido quizás debido a una mayor utilización de este antioxidante ante un peor *estatus* oxidativo, o sea, una mayor agresión oxidativa. No se puede olvidar que su principal mecanismo antioxidante es el mantenimiento o regeneración de los niveles de α -tocoferol (*Mukai K, et al, 1993*).

Además, nunca se puede dejar de tener en cuenta que el coenzima Q₉ es un componente de la cadena de transporte de electrones, y puede que en la última fase de la vida su necesidad como tal es menor y eso condiciona sus niveles en la membrana. En cualquier caso el conjunto de coenzima Q₉ más el α -tocoferol, antioxidantes fisiológicamente relacionados, mantiene un nivel a los 24 meses equiparable a edades más tempranas.

Cuando se comparan los valores encontrados en los animales alimentados con distintos aceites no se observan diferencias entre ellos cuando se considera una resultante global.

Lo que si ocurre en prácticamente todos los casos, es que cuando los aceites se suplementan con el coenzima, los contenidos en el mismo son siempre superiores que cuando no hubo suplementación. Estudios previos han mostrado que la suplementación con coenzima Q₁₀ en roedores conlleva un incremento en los niveles de α -tocoferol, como anteriormente se ha mencionado, así como un incremento en los niveles de su homólogo, el coenzima Q₉, como se observa en nuestro estudio (*Kwong, L.K., 2002; Ochoa, J.J., et al, 2005*).

El comportamiento del coenzima Q₁₀, es bastante similar al mostrado por el coenzima Q₉, en el sentido que aumenta a lo largo de la vida, disminuyendo en el último periodo experimental estudiado. Incluso en este caso, a los 18 meses, se observa un aumento, a diferencia de lo que ocurría en el caso del coenzima Q₉, en cuyo análisis había una gran similitud de valores. Este incremento a los 18 meses de edad podría estar

relacionado con los menores valores de hidroperóxidos y diclorofluoresceína diacetato encontrados y comentados anteriormente.

La posible explicación de este descenso en los niveles de coenzima Q₁₀ se encuentra, al igual que se ha comentado para su homólogo, en una mayor utilización de este antioxidante para regenerar el α -tocoferol, el cual muestra mayores niveles a los 24 meses de edad.

En lo que respecta al efecto de la grasa alimentaria sobre los niveles de coenzima Q₁₀, tan solo se observan diferencias significativas a los 24 meses de edad, lo cual sorprendentemente coincide con menores niveles de α -tocoferol en este grupo.

La consideración conjunta de ambas coenzimas ofrece una visión muy similar de lo que se ha descrito y discutido para las coenzimas separadamente (**Figura 29**). Por un lado, existe un mayor contenido de coenzima Q en los animales suplementados, en este caso en todos los periodos de tiempo objeto de estudio y por otro lado se observa que todos los grupos, a los 12, 18 y 24 meses de vida, aumentan su contenido respecto a los valores de inicio correspondientes a los 6 meses de edad, con un ligero descenso a los 24 meses. Es difícil comparar los resultados obtenidos con los mostrados en otros estudios ya que existe controversia acerca del comportamiento de esta molécula durante el envejecimiento. Así, *Beyer, R.E. et al* (1985), describen incrementos en la concentración de coenzima Q en hígado y músculo esquelético, mientras que otros órganos como cerebro no presentan cambios; por otra parte *Albano, C.B., et al* (2002) hablan de un descenso de coenzima Q durante envejecimiento en cerebro.

Una visión global de los dos antioxidantes estudiados α -tocoferol y coenzima Q, que actúan conjuntamente y a nivel de membrana, permite deducir que a medida que avanza la edad y especialmente en la madurez los contenidos de antioxidantes en la membrana son elevados y óptimos, lo que hace pensar que existe una buena defensa ante el inevitable status oxidativo. Por otra parte, el aumento de α -tocoferol y la pequeña disminución de coenzima Q, que ocurre al final del periodo estudiado, dan una suma total equivalente a la que había en edades más tempranas.

A pesar de la situación lograda el hecho anteriormente descrito al considerar el nivel de hidroperóxidos nos puede indicar que puede ser insuficiente la defensa conseguida, o si es suficiente están fallando o disminuyendo otros mecanismos de defensa.

7.- RESPECTO DE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS ANTIOXIDANTES CITOSÓLICOS

Como es conocido, los enzimas antioxidantes constituyen un importante sistema de defensa que permite limpiar el organismo de las perjudiciales especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, cualquier factor que implique una alteración de la actividad de estos enzimas puede dar lugar a la acumulación de especies reactivas del oxígeno y por lo tanto incrementar el daño oxidativo a macromoléculas. Uno de estos factores puede ser el proceso de envejecimiento (*Tian, L., et al, 1998*).

Son múltiples los estudios que han estudiado la modulación en cerebro de la actividad de los enzimas antioxidantes citosólicos en relación al envejecimiento. Sin embargo, la principal conclusión que se obtiene de estos estudios es la existencia de una gran controversia, ya que en conjunto no se ha observado una buena correlación entre envejecimiento y enzimas antioxidantes. Así, algunos autores muestran una disminución en la actividad catalasa y un incremento en la actividad SOD en cerebro asociada al envejecimiento (*Nistico, G. et al, 1992*), otros muestran que el envejecimiento no modifica de manera significativa la actividad de estos enzimas, al menos de la SOD y la glutatión peroxidasa (*Cand, F. y Verdeti, J., 1989; Sohal, R.S., et al, 1990; Tian, L. et al., 1998*) e incluso se ha observado una disminución en la actividad SOD en diferentes regiones del cerebro (*Mizuno, Y. y Ohta, K., 1986*) y disminución de la actividad catalasa tan solo en cerebelo (*Hussain, S, et al., 1995*). La explicación de estas diferencias se encuentra en múltiples variables como son el tipo de ensayo utilizado, el material biológico utilizado (citosol, mitocondria, diferentes regiones encefálicas, etc.), edad de los animales, tipo de animal e incluso, como nuestro grupo ha mostrado anteriormente en otros órganos, el tipo de fuente grasa alimentaria utilizada (*Ochoa, J.J., et al, 2003*).

Hecha esta consideración, conviene discutir que es lo que sucede con estos enzimas antioxidantes citosólicos en nuestras condiciones experimentales.

La evolución de la actividad de la superóxido dismutasa a lo largo de todo el periodo experimental muestra un perfil muy similar al de los antioxidantes anteriormente citados, en el sentido de un aumento de la misma a partir de los 12 meses respecto al periodo inicial de 6 meses (*Figura 30*).

Por otra parte cuando se comparan los valores correspondientes a los tres últimos periodos, se observa de una manera global que la enzima que presenta una actividad mayor en los animales con aceite de oliva respecto a los de girasol, a los 12 meses, disminuye en los otros dos periodos manteniendo el mismo nivel en ambos, mientras que la actividad enzimática en los animales alimentados con girasol que como se ha dicho es menor a los 12 meses, aumenta en los siguientes periodos.

La conclusión a que nos lleva estos resultados experimentales es que si el estatus oxidativo es mayor a medida que avanza la edad, o al menos la producción de anión superóxido, un aumento de la actividad superóxido dismutasa tendría la justificación de que la célula intenta luchar contra aquel riesgo. Dado que esa situación oxidativa parece mayor en los animales alimentados con aceite de girasol, es lógico concluir que esa es la razón una mayor actividad enzimática cuando la grasa alimentaria es aceite de girasol.

La comparación entre aceites suplementados o no con el coenzima Q no ofrece diferencias entre los grupos, lo cual está en gran manera de acuerdo con los datos indicativos de daño oxidativo, al menos medido por los niveles de hidroperóxidos en la membrana mitocondrial.

Respecto a la actividad de la enzima catalasa, en la *Figura 31* se comprueba un hecho sistemáticamente repetido, consistente en un incremento de la actividad antioxidante de los animales de experimentación a medida que avanza la edad, aunque en el caso de la catalasa eso ocurre después de los 12 meses, ya que estos valores son similares a los encontrados a los seis meses.

Por otra parte aunque el estudio estadístico muestra valores con un alto rango de variación entre los periodos de 12 y 24 meses, lo que dificulta establecer diferencias entre grupos en distintos periodos y entre grupos considerando el mismo periodo, parece existir una tendencia a la disminución de la actividad catalásica en el último periodo de la vida considerado. De una manera concreta, se observa claramente en el grupo alimentado con aceite de oliva suplementado y así también en el de girasol suplementado.

Considerando globalmente la conclusión expuesta comparativamente a lo que ocurre con la actividad superóxido dismutásica, la “defensa catalásica” pierde capacidad con la edad, lo cual coincide con lo observado en la mayoría de los estudios (*Nistico, G. et al, 1992; Tian, L. et al., 1998*). Dicho de otra manera la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por la SOD, pudiera no ser degradado todo lo eficazmente que interese por la catalasa citosólica, este efecto podría ser más claro en el grupo de animales alimentados con aceite de girasol, ya que este grupo presenta una mayor actividad superóxido dismutasa a los 24 meses unido a una menor actividad catalasa. Esta menor actividad catalasa en el grupo girasol con respecto al grupo oliva virgen ha sido observado en estudios previos, aunque en otros órganos provenientes de ratas envejecidas (*Ochoa, J.J., et al, 2003*).

En lo que respecta a la comparación entre grupos de un mismo periodo y para aceites suplementados, parece que la suplementación no repercute en la actividad de la catalasa.

Finalmente, la evolución de la actividad de la glutatión peroxidasa muestra en algún aspecto que puede que sea el fundamental, un cierto paralelismo con lo que ocurre con la actividad catalásica (**Figura 32**). En este sentido hay un aumento de la actividad glutatión peroxidasa a partir de los seis meses (hecho que sucedía los 18 meses con la catalasa), que finalmente desciende de manera acusada al final del periodo experimental (24 meses), en donde los valores se igualan a los encontrados en periodo inicial. Incluso en los grupos estudiados a los 12 y 18 meses, se observa una tendencia a la disminución en este último, aunque las acusadas variaciones de los valores encontrados impiden la existencia de una estadística significativa.

El paralelismo descrito parece obligado dado que la glutatión peroxidasa es una enzima que actúa conjuntamente con la catalasa, no pareciendo que tuviera sentido encontrar valores dispares en dos enzimas que tiene un tipo de acción tan condicionada de una con la otra.

De la comparación entre grupos dentro de un mismo periodo de vida, merece destacarse lo que ocurre a los 12 meses y sobre todo al final del periodo experimental, en el que la menor actividad está dentro de los grupos suplementados con coenzima Q. Aún siendo arriesgado poder llegar a una conclusión precisa, parece como si la actividad glutatión peroxidásica estuviera al final de la “vida experimental”, y ante una mejor defensa antioxidativa del coenzima Q, se requerirá menor “esfuerzo enzimático antioxidante”.

8.- RESPECTO A LOS NIVELES DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CEREBRO

Las membranas biológicas deben tener un determinado grado de fluidez, o mejor, una fluidez dentro de unos rangos, que permita la mejor funcionalidad de las mismas. La citada fluidez varía apreciablemente según el tipo de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, que a su vez se influencia por el tipo de ácidos grasos alimentarios. Cuando los niveles de ácidos grasos de membrana son muy insaturados la fluidez es excesiva y, en este caso, el organismo consigue reducir la misma incorporando más moléculas de colesterol en la propia membrana, ya que esta se sitúa en los espacios libres dejados por la curvatura característica de los ácidos grasos poliinsaturados, junto al colesterol, otros factores que también afectan a esta fluidez son el contenido en α -tocoferol y coenzima Q (*Senault, C. et al, 1990; Hiramatsu, M. et al, 1993*).

La relación colesterol en cerebro y envejecimiento ha sido estudiada por varios grupos, aunque, al igual que sucede con otros parámetros, las conclusiones muestran controversia. Así, *Cutler, R.G. et al (2004)* muestra un incremento de los niveles de colesterol en cerebro asociado al envejecimiento, mientras que *Pallotini, V. et al, 2003*, destacan la ausencia de incrementos en los niveles de colesterol asociado al envejecimiento. Realmente, hay que indicar que los niveles de colesterol en los tejidos

se van a ver afectados por múltiples factores, entre los que se encuentran la proporción y el tipo de ácidos grasos dietarios, así como el periodo de manipulación alimentaria (Du, C., et al, 2003). Incluso, el estrés oxidativo y por lo tanto la suplementación con antioxidantes parece modificar el metabolismo del colesterol (Amer, M.A, 2002; Valenzuela, A., et al, 2003; Cutler, R.G., et al, 2004).

Además, se ha postulado que las ratas envejecidas son capaces de regular su concentración de colesterol en los tejidos mediante modificaciones del colesterol enviado a la sangre (Pallottini, V. et al., 2003).

Los factores moduladores de los niveles de colesterol citados anteriormente concurren en nuestras condiciones experimentales, lo cual hace difícil la discusión fisiológica de los valores de colesterol en las membranas mitocondriales de cerebro que se muestran en la **Figura 33**. En cualquier caso para poder hacerlo es necesario acudir a otro tipo de parámetros, alguno de los cuales se van a tratar con posterioridad a este apartado.

En lo que respecta a las fuentes grasas se observa que los grupos alimentados con aceite de oliva virgen no parecen modificar sus niveles de colesterol salvo en el periodo de los 18 meses de edad, en el cual incrementan su contenido con respecto al resto de periodos. Como se ha comprobado anteriormente, este periodo de tiempo es de difícil explicación, tanto por la disminución de hidroperóxidos y diclorofluoresceína diacetato, tanto como por el incremento en coenzima Q₁₀, que se ha descrito anteriormente. Es posible, que en este periodo, por alguna razón fisiológica sea necesaria un mecanismo especial de mantenimiento de fluidez de membrana ya que como se observa en los resultados en este periodo todos los grupos muestran el mismo contenido en colesterol, sin que exista ninguna diferencia significativa entre ellos, mientras que en el resto de periodos sí existen. Los grupos alimentados con aceite de girasol, por el contrario, muestran una tendencia a disminuir su contenido en colesterol, aunque hay que considerar el hecho de que parten de unos niveles de colesterol mucho más altos..

Con respecto a los mayores niveles de colesterol en el grupo de girasol con respecto al grupo oliva, especialmente a los 6 y 24 meses de vida, coinciden con datos

previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, aunque en plasma de ratas alimentadas a lo largo de toda su vida con estas dos fuentes grasas alimentarias (*Quiles, J.L., et al., 2004a*). Una posible explicación puede encontrarse en los mayores niveles de ácidos grasos de la serie n-3 encontrados en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva, ya que se ha observado que estos ácidos grasos disminuyen los niveles de colesterol en las membranas neuronales (*Yehuda, S. et al, 2002*). Aunque también se podría considerar el estrés oxidativo, ya que se ha mostrado que el estrés oxidativo incrementa los niveles de colesterol en cerebro (*Yehuda, S. et al, 2002*).

La suplementación con coenzima Q parece tener únicamente efecto en el grupo alimentado con aceite de girasol, lo cual puede ser debido a los mayores niveles de colesterol existentes en este grupo. El mecanismo de acción de este efecto, es difícil de explicar con tan solo los datos de los que disponemos en este momento, aunque no se puede olvidar que ambas moléculas comparten la misma ruta biosintética (*Huertas, J.R., 1991*). Además, también se debería contemplar el efecto que el estrés oxidativo tiene sobre el colesterol ya comentado anteriormente

El comportamiento de los fosfolípidos de membrana es similar al encontrado para el colesterol, sobre todo en lo que respecta a los 6 meses de edad, lo cual podría indicar el intento de la membrana para mantener una fluidez más o menos constante.

9.- RESPECTO A LA FLUIDEZ DE MEMBRANA (POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA)

Como se ha visto comentado anteriormente las membranas biológicas deben tener un determinado grado de fluidez, o mejor, una fluidez dentro de unos rangos, que permita la mejor funcionalidad de las mismas, ya que alteraciones en aquella implican cambios en la movilidad de proteínas, en los intercambios iónicos, en los mecanismos de transporte, etc. (*Choe, M. et al, 1995; Feller, S.E. et al, 2002*).

Así mismo, tal como ya se apuntó la fluidez va a venir determinada por múltiples factores incluidos el tipo de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, que a su vez se influencia por el tipo de ácidos grasos alimentarios, los niveles de colesterol, α -tocoferol y coenzima Q y de una manera especial, el grado de

lipoperoxidación existente, el cual incrementa la rigidez de las mismas (*Senault, C. et al, 1990; Hiramatsu, M. et al, 1993; Choe, M., et al, 1995; Ochoa, J.J., et al, 2003*). De hecho, se ha postulado, gracias a numerosos estudios, que las alteraciones debidas a la lipoperoxidación juegan un papel predominante en la rigidez existente en las membranas senescentes. Así, se ha observado que el envejecimiento implica un aumento en la rigidez de las membranas celulares, debido en gran parte a un aumento en la agresión oxidativa (*Choe, M, et al., 1995; Yehuda, S., et al, 2002*).

En nuestro estudio hemos utilizado dos sondas, la DPH y la TMA-DPH, siendo esta última la más utilizada en los estudios de fluidez de membrana.

La sonda DPH no muestra diferencias entre los grupos con respecto a la edad, aunque si un ligero incremento de P, es decir, una tendencia a la disminución en la fluidez de membrana, aunque no de manera significativa. Las únicas diferencias se observan a los 6 meses entre el grupo girasol y el resto de grupos objeto de estudio, lo cual coincide con el mayor contenido en hidroperóxidos mostrado por este grupo y comentado anteriormente.

Sin embargo, la sonda TMA-DPH, que como hemos comentado anteriormente es la más utilizada, si muestra un incremento en P en los grupos oliva y girasol, ambos sin suplementar, lo cual es indicativo de una disminución en la fluidez de membrana asociada a la edad. Esta disminución es más marcada en el grupo de animales alimentados con aceite de girasol, lo cual vuelve a coincidir con el mayor contenido en hidroperóxidos asociado a la edad existente en este grupo.

La suplementación con coenzima Q, elimina en ambos tipos de grasa la disminución de fluidez o rigidez de membrana asociada a la edad. Esta disminución en los valores de P para esta sonda en los grupos suplementados vuelve a coincidir con los menores valores en hidroperóxidos encontrados en ambos grupos a los 24 meses de edad, con respecto a los encontrados en sus grupos de grasa correspondientes sin suplementar. Sin embargo, hay que indicar que en ambos grupos estos valores de hidroperóxidos a los 24 meses de edad son mayores que los encontrados a los 6 meses, por lo que debe de existir otro mecanismo complementario al través del cual la suplementación con coenzima Q mantiene la fluidez de membrana, aunque con los

datos de los que disponemos hasta el momento no nos es posible establecer este mecanismo y por lo tanto requiere de una investigación más profunda.

Estos resultados muestran la importancia que el daño oxidativo presenta en la fluidez de membrana.

10.- RESPECTO AL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO

Un aspecto característico que parece aceptarse en envejecimiento es que el perfil lipídico en tejidos se hace más saturado, lo cual se asocia con una disminución en el grado de poliinsaturación (*Ulmann et al, 1991; Imre et al, 2000; Yehuda, S., et al., 2002*). Por ejemplo, el efecto del envejecimiento sobre el contenido total de lípidos en varias áreas del cerebro de rata ha sido estudiado por *López, G.H. et al (1995)*, hallando un incremento de ácidos grasos monoinsaturados con la edad y una disminución en ácidos grasos poliinsaturados.

Sin embargo, nuestro grupo ha mostrado previamente que los cambios asociados con el envejecimiento en el perfil lipídico de la membrana mitocondrial son dependientes tanto del tejido como de la fuente grasa alimentaria. Consecuentemente, no debe considerarse un incremento o disminución neta del grado de insaturación asociado al envejecimiento (*Ochoa, J.J., et al., 2003*). Esto está de acuerdo con lo postulado por diversos autores que sugieren que no es fácil predecir si con el envejecimiento aumenta o disminuye el grado de insaturación en las membranas. Así, dependiendo de la dieta empleada cada tejido va a cambiar su perfil lipídico de distinta manera para establecer las mejores condiciones de trabajo para las membranas (*Lutz, M., et al, 1999; Feller, S.E., et al, 2002*). Además, hay que considerar que la mayoría de los estudios son realizados en membranas neuronales y/o homogenados cerebrales y no en membranas mitocondriales, como es el caso de nuestro estudio.

Lo hechos anteriormente comentados hacen difícil comparar nuestros datos con datos existentes, ya que en la mayoría de los estudios o bien no se ha considerado la fuente grasa alimentaria o se ha utilizado una fuente grasa alimentaria diferente o bien se han realizado en homogenados o fracciones cerebrales.

Por lo tanto, en los apartados correspondientes a ácidos grasos nos hemos limitado a describir e intentar explicar el porqué de los diferentes comportamientos, así como indicar los beneficios o perjuicios de estos comportamientos en base a la grasa alimentaria y a la suplementación con coenzima Q.

Antes de comenzar con la discusión de los ácidos grasos parece conveniente indicar algunos aspectos de interés. En la discusión de los resultados previamente considerados, se ha visto de manera bastante palpable, que según el aceite alimentario ensayado el daño oxidativo es distinto a nivel mitocondrial cerebral, como también es diferente el comportamiento de algunos mecanismos antioxidantes. En este sentido, cuando la grasa alimentaria fue aceite de oliva virgen, tanto la agresión de tipo oxidativo como los sistemas de defensa antioxidante estudiados, presentaron un mejor comportamiento. Este hecho globalmente considerado adquiere una especial relevancia, si se tiene en cuenta que esto sucede a nivel de la célula nerviosa y más concretamente en la fracción mitocondrial de la misma. Es decir, el tejido nervioso es un tejido postmitótico y por tanto un adecuado mantenimiento del mismo constituye el mejor sistema para que se atenúe en lo posible una adecuada funcionalidad. Por otra parte, la mitocondria como es sobradamente conocido, es el orgánulo celular clave en la producción de energía de tipo aeróbico y el tejido nervioso es asimismo un tejido especialmente aeróbico, por lo que un menor daño oxidativo mitocondrial adquiere una especial relevancia.

Los distintos trabajos llevados a cabo por nuestro equipo de investigación sustentan que el diferente daño oxidativo que sucede en los diversos tejidos del organismo en función de los aceites de la dieta, se debe a la influencia que estos ejercen en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (*Huertas, J.R. et al., 1991b; Quiles, J.L., et al, 1999b; Ochoa-Herrera, J.J., et al, 2201; Ochoa. J.J., et al, 2003; Quiles, J.L., et al, 2005*).

En función de lo acabado de comentar, la manera más concluyente de comprobar la hipótesis planteada es estudiar la composición en ácidos grasos de las membranas mitocondriales de las neuronas encefálicas, comprobando si los ácidos grasos de la

grasa alimentaria pueden influenciar la citada composición, en qué grado y como lo hacen a lo largo de la vida del animal experimental.

Este hecho comentado es especialmente importante estudiarlo a nivel cerebral, dado que se sabe que el tejido nervioso es posiblemente el más resistente a modificaciones en la composición química lipídica de las membranas correspondientes (Suarez, A.F., 1992).

10.1.- Adaptación de las membranas mitocondriales de cerebro al perfil lipídico de la dieta.

Ya que uno de los objetivos de nuestro estudio es observar el efecto de dos fuentes grasas con diferente grado de insaturación, aceite de oliva virgen y aceite de girasol, parece de gran importancia evaluar si los animales han adaptado sus membranas mitocondriales cerebrales al perfil lipídico de la dieta.

Como lo que se pretende es observar si las diferencias existentes en las fuentes grasas alimentarias se han transmitido a las membranas analizadas, la relación oleico/linoleico de las membranas analizadas debe ser ideal para este propósito.

Esta relación ha sido mostrada en la **Figura 43**. Esta figura muestra un índice oleico/linoleico mucho menor en los grupos alimentados con aceite de girasol, lo cual es indicativo de su mayor porcentaje en ácido linoleico. Este dato muestra la adaptación de estas membranas a la grasa alimentaria utilizada, tal y como ha sido documentado en estudios previos (Huertas, J.R. et al., 1991b; Quiles, J.L., et al, 1999b; Ochoa-Herrera, J.J., et al, 2001; Ochoa. J.J., et al, 2003; Quiles, J.L., et al, 2005). Además esta relación se mantiene en todos los periodos de tiempo estudiados, lo cual indica que la intervención nutricional basada en el tipo de grasa se refleja en la composición mitocondrial y además esta adaptación se mantiene a lo largo de la vida del animal, con lo que el posible beneficio o perjuicio del uso de un tipo específico de grasa en la alimentación se mantiene durante toda la vida.

10.2.- Respecto al perfil de ácidos grasos saturados en mitocondrias de cerebro

La consideración de los ácidos grasos saturados totales que se observa en la **Figura 38 b**, ofrece la visión global de que con la edad independientemente del aceite dietético empleado, hay un aumento significativo de los citados ácidos grasos. Asimismo se puede concluir que el tipo de aceite no fue muy determinante del contenido de ácidos grasos saturados totales, aunque en la segunda mitad del periodo experimental, los animales alimentados con aceite de girasol mostraron un mayor contenido en estos ácidos grasos.

Por otra parte la adición de coenzima Q a los correspondientes aceites mostró algunas variaciones, tanto en sentido de aumento como de disminución. Tanto la heterogeneidad de la respuesta como la magnitud de la misma hacen realmente difícil una explicación plausible a los citados resultados.

El hecho comentado de valores significativamente distintos que se pueden encontrar a lo largo de toda la vida del animal, que salvo raras excepciones no responden a un razonamiento mínimamente fisiológico hay que saber interpretarlos. Esto que se puede comprobar a lo largo de toda la memoria presentada obliga a contemplar siempre los resultados con una perspectiva fisiológica y con un tratamiento global. La consideración excesivamente casuística de todos los valores haría imposible encontrar una explicación coherente y general.

En cuanto a los ácidos grasos saturados considerados individualmente, se muestran en la **Figura 38 a**. En ella se puede apreciar nítidamente que mientras el ácido palmítico tiende a mantener sus niveles más o menos constantes a lo largo de los 24 meses que duró el periodo experimental, el ácido mirístico está aumentado en su contenido en la membrana mitocondrial y, por el contrario, hay una disminución del ácido esteárico.

De los tres ácidos grasos considerados, el que presenta un comportamiento más errático es el mirístico, independientemente del citado aumento de niveles con la edad. El tipo de aceite cuando no está suplementado con coenzima Q determina un mayor

contenido en el caso del aceite de girasol en los últimos periodos estudiados, ocurriendo lo contrario en la primera mitad del periodo experimental.

La adición del coenzima Q no ofrece una respuesta uniforme, aunque se puede hablar de que está asociado a un incremento del ácido mirístico, excepto a las 24 meses y solo en el caso del aceite de girasol.

En cuanto al ácido palmítico, a pesar de la existencia de diferencias significativas entre edades y entre grupos, se observa una tendencia a un aumento ligero de todos los grupos a excepción del de los animales que ingirieron aceite de oliva virgen como grasa alimentaria. Las diferencias encontradas no parece puedan alterar la visión general expuesta y, en cualquier caso, son imposibles de explicar.

Por último, el ácido esteárico presenta unos valores con pequeñas variaciones a lo largo del periodo experimental y asimismo entre grupos. El hecho más evidente es que a los 24 meses de edad hay una clara disminución de este ácido en todos los grupos estudiados respecto a los periodos previos. Además los valores encontrados son similares para todos los grupos.

La consideración conjunta de los tres ácidos grasos determinados, con los aumentos, reducciones y mantenimiento de los valores expuestos, dan como resultante que con la edad se produce un ligero incremento de la fracción de ácidos grasos saturados, hecho que ya parece sucede de modo claro a los 12 meses de edad.

10.3.- Respecto al perfil de ácidos grasos monoinsaturados en mitocondrias de cerebro

Los niveles de ácidos grasos monoinsaturados totales presentes en las mitocondrias de cerebro se muestran en las *Figura 39 b*. Es evidente que hubo una clara disminución con la edad de los citados ácidos, resultados que prácticamente todos los grupos presentaban de una manera más o menos acusada.

Las diferencias entre ácidos sin suplementar dentro de un mismo periodo se puede considerar inexistente, excepto en el primer periodo experimental en donde los

niveles de ácidos grasos monoinsaturados totales fueron superiores en el caso del grupo de animales alimentados con aceite de girasol.

Por otra parte, la suplementación con coenzima Q condujo a respuestas contradictorias en los diferentes periodos estudiados, destacando como más evidente el aumento que determinó a los 24 meses de edad de los animales, cuando estos ingirieron como grasa alimentaria aceite de girasol suplementado.

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados analizados se muestran en la *Figura 39 b*. Del ácido palmitoleico lo más resaltante es que sus contenidos en las membranas mitocondriales neuronales son muy bajos respecto a los otros dos ácidos grasos oleico y nervónico. Este hecho junto a la falta de conocimientos respecto a su papel fisiológico, plantean la duda de la significación fisiológica de los valores encontrados. En cualquier caso los resultados obtenidos para este ácido graso, muestran que no parece haber diferencias claras a lo largo de la vida del animal, siendo tan solo muy evidente el gran aumento que se encuentra a los 18 meses de edad en los animales alimentados con aceite de oliva virgen como grasa dietética y, asimismo, lo que ocurre a los 24 meses cuando el aceite estudiado era girasol suplementado con coenzima Q. Ambos hechos son difíciles de explicar y discutir dentro del contexto de evidencias que existe a lo largo de la vida.

El ácido oleico es el que muestra los niveles más elevados en la membrana mitocondrial, no solo de entre los ácidos grasos monoinsaturados sino también del conjunto total de ácidos grasos en los fosfolípidos de la misma.

Los resultados evidencian claramente que el ácido oleico sufre con la edad un descenso de cerca del 50 %, hecho especialmente digno de tener en cuenta cuando se desee interpretar los fenómenos más destacables en el proceso de envejecimiento. Este hecho sucede en todos los grupos estudiados siendo especialmente notorio a partir de los 18 meses de edad de los animales.

Cuando se comparan los distintos grupos entre sí, se observa asimismo un hecho llamativo, cual es la no práctica diferencia entre los animales que tomaban aceite de girasol (excepto en el periodo inicial). Estos resultados sorprenden en cierto grado, dado

que hubiera sido de esperar un aumento de este ácido en las mitocondrias cerebrales en aquellos en donde la grasa alimentaria fue aceite de oliva. En cierto modo se confirma que el sistema nervioso tiende a mantener una composición aceptablemente constante a pesar de modificaciones en el perfil de ácidos grasos de la dieta.

La suplementación con coenzima Q ofrece como ocurre casi siempre resultados distintos según el periodo estudiado, aunque casi nunca conduce a grandes modificaciones en la composición de membrana. En cualquier caso podría destacarse el aumento de ácido oleico que se observa al final del periodo experimental en los animales alimentados con aceite de girasol suplementado con coenzima Q.

El tercer ácido graso analizado fue el nervónico, el cual se mantiene en la membrana mitocondrial neuronal a un importante nivel, aunque sin llegar al correspondiente al ácido oleico. Considerando su evolución a lo largo del largo periodo de vida estudiado se observa que no hay cambios al final del mismo comparativamente al periodo inicial, habiendo variaciones en ambos sentidos en los periodos intermedios, con tendencia a la disminución a los 12 meses y aumento a los 18 meses.

Otro aspecto destacable es que los niveles correspondientes a los grupos de girasol son en general más elevados que los correspondientes a los de aceite de oliva, a los 18 meses de edad y solo en los animales alimentados con aceite de girasol sin suplementar.

Por último la suplementación, o no produjo efectos, o lo hizo de manera inversa, pudiendo tan solo hacer notar que como en el caso de los otros dos ácidos mencionados solo al final del periodo experimental, hubo un aumento cuando el aceite de girasol estaba suplementado con coenzima Q. Estos tres aumentos que se encuentran en los tres ácidos grasos considerados, justifican el porqué solo en este grupo hay un incremento al considerar conjuntamente los tres ácidos grasos en el citado periodo de 24 meses.

10.4.- Respecto al total de ácidos grasos poliinsaturados en mitocondrias de cerebro

Los ácidos grasos poliinsaturados totales representan conjuntamente el otro gran componente de los ácidos grasos de la membrana mitocondrial neuronal, inferiores no obstante a los monoinsaturados que constituyen la fracción principal, y situados dentro del mismo orden que el ácido oleico, considerando en este caso solo el periodo inicial de la vida del animal.

Los valores correspondientes a los ácidos grasos poliinsaturados totales se muestran en la **Figura 40**, donde se muestra que al final del periodo experimental existe un mayor contenido en ácidos grasos en la membrana mitocondrial neuronal respecto al periodo inicial de la vida del animal, no evidenciándose este aumento en los periodos medios de 12 y 18 meses de edad.

Estos datos son en parte contradictorios a los observados por otros estudios y comentados al principio de este apartado. Es decir disminución del contenido en ácidos grasos poliinsaturados (*Ulmann et al, 1991; Imre et al, 2000; Yehuda, S., et al., 2002*), aunque si hemos mostrado un incremento en el contenido en ácidos grasos saturados a costa del nivel de ácidos grasos monoinsaturados. El porque de estas diferencias con respecto a otros estudios, se han comentado anteriormente.

Al comparar los resultados obtenidos cuando los aceites alimentarios fueron oliva virgen y girasol se observa un mayor nivel en el primer caso y en todos los periodos considerados. Este hecho también ocurre cuando se consideran los valores correspondientes a los grupos en donde el aceite dietético se suplementó con coenzima Q, excepto en el último periodo ensayado.

En cuanto a lo que sucede por el hecho de suplementar con coenzima Q, los resultados muestran que apenas hay diferencias debido a esta manipulación.

Lo más destacable de los valores obtenidos para los ácidos grasos poliinsaturados, es que su aumento se corresponde en especial con la reducción de los ácidos grasos monoinsaturados expuesto previamente. Es posible interpretar ambos hechos como un intento por parte de la célula de mantener un mismo grado de fluidez y permeabilidad a lo largo de la vida.

Por otra parte, el aumento en el total de los ácidos grasos citados junto a una disminución del ácido oleico determinan una membrana mitocondrial de mayor grado de insaturación y con un mayor riesgo oxidativo.

10.4.1.- Respecto al perfil de ácidos grasos poliinsaturados n-6 en mitocondrias de cerebro

El total de ácidos grasos poliinsaturados n-6 se muestra en la **Figura 41 b**, de la cual se puede deducir que apenas hay cambios a lo largo del periodo experimental estudiado, intentando la célula mantener la constancia en los valores de aquellos.

Cuando comparativamente se estudian los datos correspondientes a distintos aceites, los animales que ingirieron aceite de girasol muestran valores superiores a los correspondientes al aceite de oliva tanto si estaban suplementados como si no lo estaban.

Por otra parte, la suplementación con coenzima Q no ejerció apenas influencia sobre el contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-6, aunque se encontraron algunas diferencias a lo largo del periodo experimental.

Los valores correspondientes a los ácidos grasos n-6 considerados individualmente se muestran en la **Figura 41** pudiendo hacerse diversas consideraciones. Así, el ácido linoleáidico que es un ácido graso *trans* se encuentra en niveles bastante bajos a lo largo de todo el periodo experimental estudiado, aunque muestra un claro ascenso al final del mismo, aumento que ya se hace patente a los 18 meses, para los dos grupos de animales que tomaron aceite de girasol como grasa alimentaria.. Del mismo modo que se discutió para el caso del ácido palmitoleico, los bajos niveles existentes en la membrana mitocondrial junto a la falta de conocimientos acerca de su papel positivo o negativo, no permiten hacer ningún tipo de consideraciones.

Respecto al ácido eicosatrienoico cuyos valores se representan en la gráfica de barras de la **Figura 41** tampoco se encuentra en niveles elevados. Este hecho puede no tener importancia desde el punto de vista de la estructura de membrana y muchas de las

funciones ligadas a la misma, pero si la tiene si se piensa que de él deriva la serie 1 de eicosanoides. Los valores correspondientes a este ácido son difíciles de encajar en un marco homogéneo aunque se pueden establecer algunos hechos. Los valores al final del periodo experimental tienden a ser los mismo que durante el periodo inicial de 6 meses excepto para los animales alimentados con aceite de oliva sin suplementar en donde fueron claramente más elevados. En los periodos intermedios hubo descenso de los mismos grupos mencionados y aumento en el caso de aceite de oliva sin suplementar.

Cuando se compararon los aceites entre sí no hubo diferencias entre ellos estuvieran o no suplementados. En cuanto al efecto de la suplementación, el comportamiento no fue homogéneo, aunque con la edad no hubo diferencia alguna.

La significación fisiológica de los resultados obtenidos con el ácido eicosatrienoico es imposible de establecer.

El contenido en ácido linoleico en las membranas mitocondriales neuronales representado en la gráfica de barras de la *Figura 41*, merece ciertas consideraciones sobresalientes. Como es conocido el ácido linoleico es el precursor de la serie o familia n-6 y, sin embargo apenas está en cantidad importante en la membrana, lo cual sugiere algunas conclusiones que se pondrán de manifiesto posteriormente.

Lo primero que sobresale en los valores encontrados para el citado ácido es que en este caso hay una evidente y gran diferencia entre lo que ocurre entre el aceite de oliva y el de girasol, suplementados o no con coenzima Q. Cuando los animales se alimentaron con aceite de girasol las cantidades de ácido linoleico en la membrana fueron muy superiores (bastante más del 100 %) a los encontrados con aceite de oliva. Esta influencia claramente evidenciada aquí no se encontró con los valores de ácido oleico en los animales alimentados con aceite de oliva, tal como se expuso y discutió anteriormente.

En segundo lugar, observando la evolución de los valores a lo largo de la vida del animal, se observa un aumento evidente al final de la misma en los animales en que el aceite de oliva fue la grasa de la dieta. En el caso del aceite de girasol no ocurrió así, de modo que aunque se observaron incrementos al llegar a los 18 meses, al final del

periodo experimental, los niveles de ácido linoleico eran comparables a los del periodo inicial.

En cuanto a la suplementación con coenzima Q se puede dar como conclusión general, que no afecta los contenidos en membrana de ácido linoleico.

De los hechos descritos es importante considerar si los niveles más elevados de ácido linoleico pueden afectar la estructura y funcionalidad adscritas a la membrana. Posiblemente unos contenidos tan pequeños no influyeran aspectos tan ligados a la estructura como fluidez y permeabilidad, pero es posible que si lo haga con aquellos relacionados con la interacción entre las series n-6 y n-3, aspecto que se volverá de nuevo a considerar al discutir los resultados referentes a los ácidos grasos pertenecientes a esta última serie.

Por último respecto al ácido araquidónico, debe hacerse notar en primer lugar que es el ácido graso de la serie n-6 que presenta un mayor contenido en la membrana mitocondrial. La importancia del mismo radica en que no solo interviene en la estructura de la membrana mitocondrial como lo prueba el elevado contenido en la misma, sino también en el fisiologismo de la misma en el aspecto concreto de la síntesis de eicosanoides correspondientes a la serie 2. La visión global de este ácido indica que solo se observan cambios apreciables en el sentido de disminución al final del periodo experimental y cuando los animales ingerían aceite de oliva suplementado o no con coenzima Q.

La suplementación con coenzima Q puede considerarse que no afecta el contenido de ácido araquidónico en la membrana mitocondrial cerebral.

10.4.2.- Respecto al perfil de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en mitocondrias de cerebro

En la parte inferior de la **Figura 42** se representan los contenidos en ácidos grasos poliinsaturados de las membranas mitocondriales de cerebro y en la superior están los correspondientes al citado ácido graso n-3 docosaheptaenoico que se encuentra en mayor proporción en las citadas membranas. Como se puede comprobar la mayoría

de los ácidos grasos totales n-3 está representado por este último, siendo por ello por lo que se pueden hacer consideraciones comunes para ambos conjuntos de valores.

La primera consideración es la gran diferencia de valores encontrados en los animales que se alimentaron con aceite de oliva respecto a los que lo hicieron con aceite de girasol, siendo aquellos notoriamente más elevados que estos últimos. Este hecho cualitativamente considerado coincide exactamente como una imagen respecto a su objeto con el perfil correspondiente al ácido linoleico y no tanto al conjunto de ácidos grasos n-6. Los aumentos de ácidos grasos n-3 según diversos supuestos investigados por nosotros siempre se producen cuando en la dieta la grasa de la misma está representada por aceite de oliva (*Quiles, J.L., 1995; Ochoa, J.J., 1998; Ibáñez, S., 2003; Martínez, E., 2004*), lo cual evidentemente puede tener una gran repercusión funcional.

La evolución de los niveles de ácidos grasos n-3 muestra un aumento en los grupos de aceite de oliva a lo largo del periodo experimental, que se evidencia desde el principio del mismo cuando el aceite fue suplementado con coenzima Q, y solo en el último periodo cuando no hubo suplementación alguna.

En el caso de los grupos de aceite de girasol al final del periodo experimental se observa un incremento respecto a periodos previos, especialmente el inicial.

Los resultados comparados cuando los aceites estaban o no suplementados, indican que no hubo efecto cuando la grasa dietética era girasol y apenas hubo (valor a los 12 meses) cuando era aceite de oliva.

10.5.- Respecto a la relación ácidos grasos monoinsaturados / ácidos grasos poliinsaturados (AGM / AGP)

Los mayores, aunque no excesivamente, niveles de ácidos grasos de ácidos grasos monoinsaturados (oleico más nervónico en especial) respecto a los poliinsaturados, hace que la relación entre ellos se mantenga aproximadamente entre 1 y 1.8.

Lo más notorio de la citada relación es que disminuye con la edad, lo que es debido no tanto al aumento que sucede con los AGP sino con la gran disminución que se produce en el caso de citado ácido oleico, ya que apenas varía el ácido nervónico.

El segundo hecho que vale la pena discutir es que la relación AGM / AGP, que es algo mayor en el caso de los animales de los dos grupos cuya grasa alimentaria fue aceite de girasol, desaparece con la edad, de tal modo que los 18 meses, no se aprecian diferencias entre ellos.

Un tercer aspecto respecto a la relación considerada es que salvo los dos grupos de aceite de oliva a los 12 meses, no hubo diferencia alguna por efecto de la suplementación.

10.6.- Respecto a la relación ácido araquidónico / ácido docosahexaenoico (AA / DHA)

Estos dos ácidos grasos constituyen los presentes en membrana con un mayor contenido, pertenecientes a las series n-6 y n-3 respectivamente.

Lo más sobresalientes que el aceite de oliva determina en los dos grupos de animales donde era consumido un menor valor de la citada relación AA / DHA. Este aspecto se puede considerar altamente positivo en el momento actual donde existe un desequilibrio de la serie n-6 / n.3 en detrimento de esta última. Según nuestros resultados la ingesta de aceite de oliva ayuda a normalizar esa situación, lo que conduce a mejorar todas aquellas funciones celulares afectadas por los niveles de ácidos grasos n-6 y n-3.

El segundo aspecto es que a medida que avanza la edad, la citada relación disminuye, siendo patente en los grupos de aceite de oliva una vez superado el periodo inicial y al final del periodo experimental. Cuando la grasa alimentaria era aceite de girasol.

Por último, y una vez más, la suplementación con coenzima Q no modificó en la gran mayoría de las situaciones, la relación considerada AA / DHA.

10.7.- Respecto al índice de insaturación e índice de peroxidación.

Estos índices teóricamente son indicativos de la mayor o menor susceptibilidad a sufrir daño oxidativo en las membranas.

Paradójicamente y al contrario de lo observado previamente por nosotros mismos, los grupos que ingieren aceite de oliva muestran durante todo el estudio unos valores algo más elevados que los correspondientes a aceite de girasol.

Con respecto a este hecho, hemos de considerar que los estudios previos han sido realizados en plasma y en otros órganos, que aparentemente son más susceptibles a la adaptación al perfil lipídico de la fuente grasa alimentaria. Por el contrario, el cerebro ha mostrado ser más resistente a este tipo de adaptación.

Además, es importante considerar que este mayor índice en el caso del aceite de oliva, es debido al incremento en el porcentaje de ácidos grasos de la serie n-3, los cuales, en diversos estudios, han mostrado ser menos peroxidables biológicamente que los ácidos grasos de la serie n-6 (*de Ruiz, G.J., et al, 2002; Kikugawa, K. et al, 2003; Napolitano, M., et al, 2004; Filian, M., et al, 2005*). Por ello, este mayor índice en los grupos que ingieren aceite de oliva no tiene porque contradecir el menor daño oxidativo mostrado por estas ratas.

Finalmente, tal como ya se indicó previamente, la mayor presencia de ácidos grasos de la serie n-3 en las membranas de los grupos alimentados con aceite de oliva, hay que interpretarlo como una ventaja fisiológica netamente positiva.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

Durante el proceso de envejecimiento se observa en la membrana mitocondrial de cerebro un incremento del daño oxidativo medido por los niveles de hidroperóxidos y de diclorofluoresceína oxidada. El citado daño intenta ser contrarrestado por el aumento conjunto de α -tocoferol y coenzima Q₁₀.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

Durante el proceso de envejecimiento la defensa antioxidativa enzimática, representada por la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, presenta una menor actividad global, en concreto en las dos últimas, existiendo además una sincronía funcional entre catalasa y glutatión peroxidasa, pero una disincronía con la superóxido dismutasa, lo que puede comprometer seriamente, dada ambas condiciones, la eficacia de esta defensa antioxidativa.

CONCLUSIÓN TERCERA

La influencia del tipo de aceite estudiado, muestra que el aceite de oliva virgen disminuye el daño oxidativo asociado al proceso de envejecimiento en las membranas mitocondriales de cerebro.

CONCLUSIÓN CUARTA

La suplementación de los aceites de oliva virgen y girasol con coenzima Q₁₀, amplifica el efecto observado en el primero y ayudan a reducir el daño oxidativo en el caso del segundo.

CONCLUSIÓN QUINTA

La influencia del tipo de aceite sobre las actividades enzimáticas antioxidantes estudiadas muestra que el aceite de girasol incrementa la disincronía antes apuntada entre la superóxido dismutasa y catalasa.

CONCLUSIÓN SEXTA

Durante el proceso de envejecimiento y en nuestras condiciones experimentales, se demuestra que existe un incremento en ácidos grasos saturados y poliinsaturados a costa de una disminución de los monoinsaturados, no observándose ninguna influencia de los aceites ensayados. Solamente debe hacerse notar que hay un significativo aumento de los ácidos grasos n-3 en el caso del aceite de oliva virgen.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. **150**:121-127.
- Agarwal S, Sohal RS. DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; **91**: 12332-12335.
- Albano, C.B., Muralikrishnan, D, and Ebadi, M (2002). Distribution of coenzyme Q homologues in brain. *Neurochem. Res.* **27**:259-268.
- Amer, M.A. (2002). Modulation of age-related biochemical changes and oxidative stress by vitamin C and glutathione supplementation in old rats. *Ann. Nutr. Metab.*, **46**:165-168.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:7915-7922.
- Aniya, Y. y Naito, A. (1993). Oxidative stress induced activation of microsomal glutathione s-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology.* **45(1)**:37-42.
- Anuoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. y Dizdaroglu, M. (1991). Cooper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presense of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **273**: 601-604.
- Arizmendi, J.M., Runswick, M.J., Skehel, J.M. y Walker, J.E. (1992). NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. A fourth nuclear encoded subunit with a homologue encoded in chloroplast genomes. *FEBS lett.* **301**:237-242.
- Aw, T.Y., Andersson, B.S., Kennedy, F.G. y Jones, D.P. (1986). Intracellular O₂ supply to support mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**:707-716.
- Azzi, A. y Müller, M. (1990). cytochrome c oxidases: polypeptides composition, role of subunits, and location of active-metal centers. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**:242-251.
- Band, L. Y Ardaillou, R. (1993). Involvement of reactive oxygen species in Kidney damage. *British Medical Bulletin.* **49(3)**:621-629.

- Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 1995; 338: 115-128.
- Batelli, M.G., Dellacorte, E. y Stirpe, F. (1972). Xanthine oxidase type D (dehidrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochemistry* **126**:747-749.
- Battino M, Ferreiro MS, Littarru G, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Huertas JR, et al. Structural damages induced by peroxidation could account for functional impairment of heavy synaptic mitochondria. *Free Rad Res* 2002a; 36: 479-484.
- Battino M, Quiles JL, Huertas JR, Ramírez-Tortosa MC, Cassinello M, Mañas M, et al. Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. *J Bioenerg Biomembr* 2002b; 34: 127-134.
- Battino, M. (1989). Ubichinone, studi comparativi ed in sistemi modello. Tesi di dottorato. Università degli studi di catania. Italia.
- Battino, M., Bompadre, S., Leone, L., Villa, R.F., Gorini, A. "Coenzymes Q₉ and Q₁₀, vitamin E and peroxidation in rat synaptic and non-synaptic occipital cerebral cortex mitochondria during ageing". *Biol. Chem.* **382**: 925-931. 2001.
- Battino, M., Fato, R., Parenti-Castelli, G. y Lenaz, G. (1990). Coenzyme Q can control the efficiency of oxidative phosphorylation. *Int. J. Tissue Reactions.* **12(3)**:137-144.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J. et. al. (1990), Apparen Hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1620-1624.
- Benzi, G. (1992). Aerobic performance and oxygen free-radicals. *Int. J. Sport Med. Phys. Fitness.* *
- Benzi, G. y Moretti, A. (1995). Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radical Biology & Medicine.* **19 (1)**:77-101.
- Beyer, R.E., Burnett, B.A., Carwright, K.J., Edington, D.W., Falzon, M.J., Kreitman, K.R., kuhn, T.W., Ramp, B.J., Rhee, S.Y., Rosenwasser, M.J., Stein, M., and An, L.C. (1985). Tissue coenzyme Q (ubiquinone) and protein

- concentrations over the life span of the laboratory rat. *Mech. Of Ageing Develop*, 32:267-281.
- Bielski, B.H.J., Arudi, R.L. y Sutherland ,M.W., (1983). A study of the activity of $\text{HO}_2^- / \text{O}_2^-$ with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **258**:4759-4761
 - Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J et al. 2003. Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. *J Clin Endocrinol Met*; 88: 16-23
 - Bohr, V.A. and Anson, R.M. (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 391-398.
 - Borevis, A. y Cadenas, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. *FEBS Lett.* **54**:311-314.
 - Borevis, A. y Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**:707-716.
 - Bowry, V.W., Mohr, D., Clearly, J. y Stocker, R. (1995). Prevention of tocopherol-mediated peroxidation of ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**:5756-5763.
 - Breimer, L.H. (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.* **3**:188-197.
 - Brown, L.A. y Dean, P.J. (1995). The biology of ascorbic acid. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 117-153.
 - Buck, S, Vettraino J, Force AG, Arkinj R. 2000. Extender longevity in *Drosophila* is consistently associated with a decrease in larval viability. *J Gerontol A* 55, B 292-B30.
 - Bueetner, G.R. (1988). In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals. *J. Biochem. Biophys Meth.* **16**:27-40.
 - Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., (1995). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 91-115.
 - Burton, G.W. y Ingold, K.U. (1984). β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* **224**:569-573.

- Burton, G.W., Joyce, A. y Ingoldy, K.U. (1982). First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* **11**:327-328.
- Cadenas E y Davies K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* **29**: 222-230.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180: 248-257.
- Cand, F. and Verdeti, J. (1989). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aged rats. *Free rad, Biol. Med.*, 7:59-63
- Capaldi, R.A. (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:569-59.
- Carlberg, I. y Mannervik, B., (1985). Glutathione reductase. *Methods in enzymology.* **113**:484-490.
- Carp, H., Miller, F., Hoidal, J.R. y Janoff, A. (1982). Potential mechanism of emphysema: alpha-1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidised methionine and has decreased elastase inhibitory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:2041-2045.
- Casey, R.P., Thelen, M. y Azzi, A. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**:1044-1051. *
- Chance, B., Sies, H. Y Boveris, A. (1979). *Physiol. Rev.* **59**:577-605. *
- Cheeseman, K.H. (1993). Lipid peroxidation and cancer. En: *DNA and Free Radicals.* Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (eds). Ellis Horwood. New York , pp 109-144.
- Cheeseman, K.H. y Slater T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical Bulletin.* **49(3)**: 481-493.
- Cheeseman, K.H. y Slater T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical Bulletin.* **49(3)**: 481-493.
- Choe, M., Jackson, C., and Yu, B.P. (1995). Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic. Biol. Med.* 18:977-984.

- Chomyn, A., Clester, M.W.J., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F. y Attardi, G. (1986). URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehidrogenase unit. *Science* **234**:614-618. *
- Chow, C.K. (1991). Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **11**:215-232.
- Chung MH, Kasai H, Nishimura S, Yu BP. Protection of DNA damage by dietary restriction. *Free Radic Biol. Med* 1992; 12: 523-525.
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89: 7370-7374.
- Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L. y Widner, C (1957). Isolation of a quinone from beef heart. *Biochim. Biophys. Acta.* **24**:220-221. *
- Cross AR, Jones OT. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1057: 281-298.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., and Mattson, M.P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and alzheimer's disease. *PNAS*, 1001:2070-2075.
- Davis, K.A. y Hatefi, Y. (1971). Spectra and reconstitution of properties of cytochromes b in complexes II and III. *Biochemistry*.**10**:2509.
- De Benedictis G, Carrieri G, Varcasia O, Bonafè M, Franceschi C. Inherited variability of the mitochondrial genome and successful aging in humans. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908: 208-218.
- de Jong, J.W., van de Meer, P. Nieukoop, A.S., Huizer, T., Stroeve, R.J. y Bos, E. (1990). Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ.Res.* **67**:770-773.
- De Ruiz, G.J., Mertxe de Renobales, del Cerro, A., de Fernández, L.E., Amiano, P., Dorronso, M. (2002). Habitual fish intake is associated with decreased LDL susceptibility to ex vivo oxidation. *Lipids*, 37:333-341.
- de Teresa, C. (1995). Peroxidación lipídica endógena y funcionalidad mitocondrial en hígado y corazón de ratas alimentadas con distintas fuentes grasas (aceite de oliva virgen , refinado y de maíz). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- Degli, M. (2002). Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* **26**, 335-340.
- Deisseroth, A. Y Dounce, A.L. (1970). Catalase:Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews*. **50(3)**:319-375. *
- DellaCorte, E. y Stirpe, F. (1972). The regulation of at liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type I) into oxidasde (type II) and purification of the enzyme. *Biochemistry* **126**:736-745.
- Dizdaroglu, M. (1993). Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: DNA and free radicals. Eds. Halliwell, B. Y Aruoma. O.I. ELLIS HORWORD. Inlaterra. pp:19-39.
- Dreosti, I.E. y Record, I.R. (1979). Superoxide dismutase (Ec 1.15.1.1), zinc status and ethanol consumption in maternal and fetal rat livers.
- Du, C., Sato, A., Watanabe, S., Wu, C., Ikemoto, A., ando, K., Kikugawa, K., Fujii, Y., and Okuyama, H. (2003). Cholesterol synthesis in mice is suppressed but lipofuscin formation is not affected by long-term feeding of n-3 fatty acid-enriched oils compared with lard and n-6 fatty acid-enriched oils. *Bio. Pharm. Bull.* **26**:766-770.
- Ernster, L., Forsmark, P. y Nordenbrand, K. (1992). The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **548**:41-46.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**: 81-128.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Phul, H. y Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **6**:67-75.
- Etsuo, N. (1991). Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Ntr.* **54**:1119S-1124S.
- Evans, P.H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin.* **49(3)**:577-587.
- **Fasce et al. (1982):**

- Fato, R., Battino, M., Degli Esposi, M. Y Parenti-Castelli, G. (1986). *Biochemistry*. **25**:3378-3390. *
- Feller, S.E., Gawrisch, K., and MacKerell, A.D. (2002). Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers:intrinsic and enviromental contributions to their unique physical properties. *J. Am. Chem. Soc.* 124:318-326.
- Fenn, W.O. y Gerschman, R., Gilbert, D.L., Terwiblinger, D.E. y Cotharn, F.V. (1957). Mutagenic effects of high oxygen tension on Escherichia Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **43**:1027-1032. *
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247.
- Flitter, W.D. (1993). Free radical and myocardial reperfusion injury. *British Medical Bulletin* **49(3)**:545-555.
- Flohe, L. y Wolfgang, A.G. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. **105**:114-121.
- Forsmark-Andree P, Lee CP, Dallner G, Ernster L. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 391-400.
- Frankel, E.N. (1984). Lipid-oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *JAOCS*. **61 (2)**: 1908-1917.
- Frei, B. (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Ntr.* **54**:1113S-1118S.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.* **44**:147-159.
- Fridovich, I. (1976). In: free radicals in Biology. Ed. Pryor. Academic press, New York. Vol. **1**, pp 239. *
- Friedl, H.P., Smith, D.J. y Till G.D. (1990). Ischaemia reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.* **136**:491-495.
- Friedl, H.P., Till, G.O., Trentz, O. y Ward, P.A. (1989). Roles of histamine complement and xhantine oxidase in thermal injury of skin. *Am. J. Pathol.* **135**:491-495.
- Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, W., Schmitz, B. Y Weiss, H. (1989).A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora Crass.* *Science*. **234**:614-618. *

- Furukawa T, Meydani SN, Blumberg JB. Reversal of age-associated decline in immune responsiveness by dietary glutathione supplementation in mice. *Mech Ageing Develop* 1987; 38: 107-117.
- Gillery, P., Monboisse, J.C., Marquat, F.X. y Borel, J.P. (1991). Mecanismos de veillesment des proteines. *Diabetes Metabolisme*. **17**:1-15.
- Graham, W.B. y Maret, G.T. (1990). Vitamin E: antioxidant, activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* **10**:357-382.
- Granger, D.N., Rutilio, G. Y McCord, J.M. (1980). Superoxide radicals in feline intestinal ischaemia. *Gastroenterology*. **81**:282-291.
- Griffiths, H.R. y Lunec, J. (1989). The effects oxygen free radicals on the carbohydrate moiety of IgG. *FEBS Lett.* **245**:95-99.
- Grum, C.M., Ragsdale, R.A., Ketai, L.H. y Simon, R.H. (1987). Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J. Crit. Care.* **2**:22-26.
- Guarente L, Kenyon C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organismus. *Nature* 408, 255-262.
- Guthenberg, C., Alin, P. y Mannervik, B., (1985). Glutathione transferase from rat testis. *Methods in enzymology*. **186**:448-457.
- Guyton, K.Z. y Kensler T.W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin* **49 (3)**:523-544.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Third edition. ed. Oxford University Press: Oxford, 1999.
- Halliwell, B. y Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57(S)**:715S-722S.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1984). Lipid peroxidation. Oxigen radical, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*. **1**:1396-1398.
- Halliwell, B., gutteridge, J.M.C. y Cross, C.E. (1992). Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Labo. Clin. Med.* **119 (6)**:598-620.
- Handelman, G. J. (1995). Carotenoids as scavenger of active oxigen species. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 259-313.
- Harman D.1957. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*, 2,298-300.

- Hatch, G.M., Vance, D.E. y Wilton, D.C. (1993). Rat liver mitochondrial phospholipase A₂ is an endotoxin-stimulated membrane-associated enzyme of Kupffer cells which is released during liver perfusion. *Biochem. J.* **293**:143-150.
- Hatefi, Y., y Stiggall, D.L. (1976). En: Boyer, P.D. (Eds). *The enzymes*. 3^a edicion. Academy Press. Nueva York. Pp 175.
- Hatefi, Y. (1985). The enzymes and the enzyme complexes of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Ann Rev. Biochem.* **54**:1015-1069.
- Hatefi, Y., Haavick, A.G. y Griffiths, D.E. (1961). Reconstitution of the electron transport system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**:441-453. *
- Hatefi, Y., Haavick, A.G. y Griffiths, D.E. (1963). Electron transport system. XL. Preparations and properties on mitochondrial (NADPH)-coenzyme Q reductase. *J. Biol. Chem.* **237**:1676-1680.
- Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 1996; 335: 295-304.
- Heilbronn I, Ravussin E. 2003. Calorie restriction and aging:review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr*;78: 361-9.
- Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Velasco, R.D., Ooba, S., Kamakura, K. y Mori, A. (1993). Exhaustive exercise affects fluidity and alpha-tocopherol levels in brain symptosomal membranes of normal and vitamin E supplements rats. *Neurochem. Res.* **18(3)**:313-316.
- Hirayama, D., Nakamura, K., Hamada, S. y Kobayosi, Y. (1994). Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids.* **29**:149-150.
- Hubert, M.F., Laroque, P., Guillet, J.P., Keenan, K.P. (2000). The effects of diet, ad libitum feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control Sprague-dawley rats. *Toxicology Sciences*, 58: 195-207.
- Huertas JR, Battino M, Lenaz G, Mataix FJ. Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1991; 5: 287: 89-92.
- Huertas JR, Battino M, Mataix J, Lenaz G. Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oil. *Biochem Biophys Res Commun* 1991b; 181: 375-382.

- Huertas JR, Martínez-Velasco E, Ibáñez S, López-Frías M, Ochoa JJ, Quiles JL, et al. Virgin olive oil protect heart mitochondria from peroxidative damage during aging. *Biofactors* 1999; 9: 337-343.
- Ibáñez, S. (2003). Efecto del tipo de grasa de la dieta (aceite de oliva y aceite de girasol) y de la adición de coenzima Q10 sobre diversos aspectos del envejecimiento mitocondrial (deleciones del ADN mitocondrial) en hígado. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Imre, S., Firbas, J. H., and Noble, R.C. (2000). Reduced lipid peroxidation capacity and desaturation as biochemical markers of aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **31**, 5-12.
- Jessup, W., Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Houlst, J.R.S., Scott, J. Y Leake, D.S. (1990). α -Tocoferol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem. J.* **265**:399-405.
- Jiang, Z.Y., Woolard, A.C.S. y Wolff, S.P. (1990). Hydrogen peroxide production during experimental protein glycolation. *FEBS Lett.* **268**:69-71.
- Johnson, W.D., Kayser, K.L., Brenwitz, J.B. y Saedi, S.F. (1991). A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. *Am. Heart. J.* **121** (1) :20-24.
- Kadenbach, B.; Jarausch, J.; Hartmann, R. y Merle, P. (1983). Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal Biochem.* **129**:517-521.
- Kagan, V.E., Nohl, H. y Quim. P.J. (1995). Coenzyme Q: its role in scavenging and generation of radicals in membranes. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York.157-201.
- Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Koynova, E.A., Kitanova, S.A., Tyurin, V.A., Stoytchev, T.S., Quinn, P.J. y Parcker, L. (1990). Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.* **9**:117-126.
- Kanofsky, J.P. y Sima, P. (1991). Singlet oxygen production from reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.* **266**: 9039-9042.
- Kapahi P, Boulton ME, Kirkwood TBL.1999. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radical Bios Med* 26, 495-500.

- Kattermann R, Jaworek D, Moller G, Assmann G, Bjorkhem I, Svensson I, Borner K, Boerma G, Leijnse B, Desager JP, et al. (1984). Multicentre study of a new enzymatic method of cholesterol determination. *J Clin Chem Clin Biochem*, 22, 245-251.
- Kellog EW, Fridovich I. Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. *J Gerontol* 1976; 31: 405-408.
- Kennedy B.K., Austriaco NR, Zhang J, Guarente L, 1995. Mutation in the silencing gene SIR can delay aging in *S.cerevisiae* Cell, 80,485-486.
- Kikugawa, k., Yasuhara, Y., Ando, K., KoyamK., Hiramoto, K., and Suzuki, M. (2003). Effect of supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids on oxidative stress-induced DNA damage of rat hepatocytes.
- Kilian, m., Heukamp, I., Gregor, J.I., Bretthauer, C., walz, M.K., Jacobi, C.A., Lochs, H., Schimke, I., Guski, H., and Wenger, F.A. (2005). N-3, n-6, n-9 polyunsaturated fatty acids-which composition in parental nutrition decreases severity of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats?. *Int. J. Colorectal. Dis.* 29.
- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free radic. Biol. Med.* 6: 617-635.
- Krinsky, N.I., (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* 13:561-587.
- Kröger, A. (1978). Determination of contents and redox state of ubiquinone and menaquinone. *Methods Enzymology.* 53:579.
- Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhnov AN, Ruuge EK. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett* 1983; 155: 19-24.
- Ku HH, Brunk UT, Sohal RS.1993. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free radical Biol Med* 15, 621-627.
- Kwong, L.K., Kamzalov, S., Rebrin, I. et al, (2002). Effects of coenzyme Q10 administration on its tissue concentrations mitochondrial oxidant generation, and oxidative stress in the rat. *Free Radic Biol Med.* 33:627-638.
- Landi, L., Fiorentini, D., Stefanelli, C., Pasquali, P. y Pedulli, G.F. (1990). Inhibition of antioxidation of egg yolk phosphatidylcholine in homogenous solution and in liposomes by oxidized ubiquinone. *Biochim. Biophys. Acta.* 1028:223-228.

- Landvik, S.V., Diplock, A.T. y Packer, L. (1995). Efficacy of vitamin in human health and disease. In: Handbook of Antioxidants. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 63-87.
- Laroque, P., Keenan, K.P., Soper, K.A., Dorian, C., Gerin, G., Hoe, C.M., Duprat, P. (1997). Effect of early body weight and moderate dietary restriction on the survival of the Sprague-Dawley rat. *Exp. Toxic. Pathol.* 49:459-465.
- Lass, A., Foster, M.J., Sohal, R.S.. (1999). Effects of coenzyme Q10 and a-tocopherol admisntration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial a-tocopherol by coenzyme Q10. *Free Radic. Bio. Med.*, 26:1375-1382.
- Laurindo, F.R.M., da Luz, P.L. y Uint, L., (1991). Evidence for superoxide radical-dependet coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation.* **83**:1705-1715.
- Lee Ck, Klopp RG, Weindruch P, Prolla TA. 1999. Gene expression profile of ageng and its retardation by caloric restriction. *Science*; 285:1390-3
- Lee CM, Weindruch R, Aiken JM. Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1259-1269.
- Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 3-67.
- Lenaz, G. (1988). Role of mobility of redox components in the inner mitochondrial membrane. *J. Membrane. Biol.* **104**:193-209.
- Lenaz, G., Bovina, C., Castelluccio, C., Cavazzoni, M., Estornell, E., Romano, F., Huertas, J.R., Milena, M.P., Pallotti, F., Castelli, G.P. y Rauchova, H. (1995). Modes of coenzyme Q function in electron transfer. *Protoplasma.* **184**:50-62.
- Lepage, G. y Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**:114-120.
- Lesnefsky, E.J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J., and Hoppel, C.L. (2001). Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 33:1065-1089.
- Liebler, D.C. (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**:147-169.
- Lind, C. Hochstein, P. y Ernester, L. (1982). In: Oxidase and other redox enzymes. King, T.E., Mason, H.S. y Morrison, M. (eds). Pergamon Press. Oxford.

- Linnae, A.W., Zhang, C., Yarovaya, N. et al., (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad. Sci.* 595:396-411.
- Lippe G, Comelli M, Mazzilis D, Sala FD, Mavelli L. The inactivation of mitochondrial F1 ATPase by H₂O₂ is mediated by iron ions not tightly bound in the protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 764-770.
- Litarru, G.P. (1994). Energy and defense. Facts and perspective on coenzyme Q₁₀ in biology and medicine. Casa editrice Scientifica Internazionale. Roma.
- Litarru, G.P., Battino, M. y Folkers, K. (1995). Clinical aspects of coenzyme Q: Improvement of cellular bioenergetics or antioxidant protection ?. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 203-239.
- Loe CK, Weindruch R, Prolla TA. 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature Genet* 25,294-297.
- Lonrot, K., Holm, P., Lagerstedt, A., Huthtala, H., Alho, H. (1998). The effects of lifelong ubiquinone 10 supplementation on the Q9 and Q10 tissue concentrations and life span of male rats and mice. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44:727-737.
- Lopéz, G.H., Ilincheta de Boschero, M.G., Castagnet, P.I., Giusto, N.M. (1995). Age-associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *B. Biochem. Mol. Biol.* 112:331-343
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.G. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Ludwig, B. y Schatz, G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:196-200. *
- Lunec, J. Brailsford, S., Hewitt, S.D., Morris, C.J. y Blake, D.R. (1986). Free radicals: Are they possible mediators of IgG denaturation and immune complex formation in rheumatoid arthritis. *Int. J. Immunotherapy.* **3**:39-43.
- Lutz, M., Alvarado, J., Barraza, P., Bonilla, S., and Luna, L. (1999). Effect of dietary oils and cholesterol supplement on fluidity and enzyme activities of liver microsomal in the rat. *Lipids*, 34:119.
- Machlin, L.J. (1991). Vitamin E. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 99-144.
- Maiorino, M., Gregolin, C. y Ursini, F., (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in enzymology.* **186**:448-457.

- Malatesta, F; Georgevich, G.; Capaldi, R.A. (1983). In structure and function of membrane proteins. Ed. E. Quag. Liatiello, F. Palmieri. Pp. 223-235. Amsterdam:Elsevier. *
- Malis, C.D., Weber, P.C., Leaf, A. y Bonventre, J.V. (1990). Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increases susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species. Evidence for enhanced activation of phospholipase A₂ in mitochondria enriched with n-3 fatty acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:8845-8849.
- Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. Methods in enzymology. **113**:491-495.
- Martínez, E. (2004). Efecto de distintas fuentes grasas sobre el envejecimiento mitochondrial en músculo esquelético y cardíaco. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. Exp. Gerontol. 2000; **35**: 299-305.
- Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mañas, M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. Free Radic Biol Med 1998; 24: 511-521.
- Mataix J. Editor. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Granada: Universidad de Granada y PULEVA Food. 2001.
- Mataix, J. Mañas. M., Quiles, J., Battino, M., Cassinello, M., López-Frías, M. y Huertas, J.R. (1997). Coenzyme Q content depends upon oxidative stress and dietary fat unsaturation. Molec. Aspects. Med. **18**:129S-135S.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. Nutrition 1989; 5(3): 155-171.
- McCord, J.M. (1979). In: Reviews in Biochemical Toxicology. Eds. Hodgson, E.; Berd, J.R. y Philpot, R.M. Elsevier, New York. Vol. **1**, pp.109. *
- McCord, J.M. (1989). Free radical and heart disease. In: Nutritional Impact of Food Processing. Eds. Somogy, J.C.; Müller, H.R. Bibli. Nutr. Dieta, Basel, Karger, **43**:327-337.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry. **224**(22): 6049-6055.

- McCord, J.M., Roy, R.S. y Schaffer, S.W. (1985). Free radical and myocardial ischaemia. The role of xanthine oxidase. *Adv. Myocardiol.* **5**:183-189.
- Mecocci, P. MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz. D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C., and Beal, M.F. (1993). Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* 34:609-616.
- Mellors, A. y Tappel, A.L. (1966). Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation. *Lipids.* **1**:282-284.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999; 286: 774-779.
- Minotti, G. y Aust, D. (1987). The role of Iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* **44**: 191-208.
- Miquel J, Economos AC. Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and the life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 1979; 14: 279-285.
- Miquel, J. Economos, A.C., Fleming, J.E., and Johnson, J.E. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15:579-591.
- Mitchell, P. (1976). Protonmotive Q cycle. General formulation. *J. Theor. Biol.* **62**:327-367.
- Mizuno, Y., and Ohta. K (1986). Regional distribution of thiobarbituric acid reactive products, activity of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals and some of the related enzymes in adult and aged rat brain. *J. Neurochem,* 46:1344-1346.
- Monstantinov, A.A. (1990). *Biochim. Biophys. Acta.* **1018**:138-141. *
- Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E. (1994). Radicales libres del oxígeno y superóxido dismutasas: Aspectos biológicos y médicos. *Medicina (Buenos Aires).* **54**:61-68.
- Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Flint Beal M, Markesbery WR, Roberts LJ, et al. Lipid peroxidation in aging brain and alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 620-626.
- Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S. y Nagaoka, S. (1993). Kinetic study of free radical scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of

- ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochim. Biophys. Acta.* **1157**:313-317.
- Nagaoka, S., Okauchi, Y., Urano, S., Nagashima, U. y Mukai, K. (1990). Kinetic and ab initio study of the prooxidant effect of vitamin E. Hydrogen abstraction from fatty acid esters and egg yolk lecithin. *J. Am. Chem. Soc.* **112**:8921-8924.
 - Napolitano, M., Bravo, E., Avella, M., Chico, Y., Ochoa, B., Botham, E.K., and Rivabene, R. (2004). The fatty acid composition of chylomicron remnants influences their propensity to oxidate. *Nutr. Metb. Cardiovascu. Dis.* **14**:241-247.
 - Nassi-Caló, L., Mello-Filho, A.C. y Meneghini, R. (1989). O-phenanthroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphological transformation. *Carcinogenesis.* **10**:1055-1057.
 - Nichols, D.G. (1982). In: *Bioenergetics - An introduction to the chemiosmotic Theory.* Academic Press. London. *
 - Nieto, N. (1993). Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia.
 - Niki, E. (1995). α -Tocoferol. In: *Handbook of Antioxidants.* Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 3-25.
 - Nistico, G., Ciriolo, M.R., Fiskin, K., and Rotilio, G. (1992). NGF restores decrease in catalase activity and increase superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. *Free Rad. Biol. Med.*, **12**:177-181.
 - Ochoa-Herrera JJ, Huertas JR, Quiles JL, Mataix J. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J Nutr Biochem* 2001; **12**: 357-364.
 - Ochoa JJ, Quiles JL, Ibáñez S, Martínez E, López-Frías M, Huertas JR, and Mataix J.(2003). Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *J Bioenerg Biomembr.* **35**: 267-275.
 - Ochoa JJ, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Mataix J, Huertas JR. Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents have different effects in lipid profile and peroxidation in rabbit-LDL. *Nutr* 2002; **18**: 60-65.

- Ochoa, J.J. (1998). Capacidad antioxidativa (fracción insaponificable frente a saponificable) de distintas fuentes grasas con alto contenido en ácido oleico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Ochoa, J.J., Quiles, J.L., Huertas, J.R., and Mataix, J. (2005). Coenzyme Q10 protects from aging-related oxidative stress and improves mitochondrial function in heart of rats fed a polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich diet. *Journal of Gerontology: Biological Sciences. En prensa.*
- Ochoa, J.J., Quiles, J.L., Ibáñez, S., Martínez, E., López-Frías, M., Huertas, J.R., and Mataix, J. (2003). Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35:267-275.
- Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. (1980). Differential aspects of antimycin on semiubiquinone bound in different environments in isolated succinate-cytochrome c reductase complex. *J. Biol. Chem.* **255**:278.
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. Y Nicotera, P. (1989). Role of Ca²⁺ in toxic cell Killing. *Trends. Pharmacol. Sci.* **10**:281-285.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**:1050 S-1055 S.
- Pallottini, V., Marino, M., Cavallini, G., Bergamini, E., and trentalance, A. (2003). Age-related changes of isoprenoid biosynthesis in rat liver and brain. *Biogerontology*, 4:371-378.
- Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations. *FEBS Lett* 1998; 424: 155-158.
- Parenti-Castelli, G.; Fato, R.; Battino, M.; Castelluccio, C. y Lenaz, G.(1987). *Chem. Scripta.* **27**:161-166. *
- Parks, D.A., Bulkley, G.B., Granger, D.N., Hamilton, S.R. y McCord, J.M. (1982). Ischemic injury in the cat intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* **82**: 9-15.
- Promislow DEL, Tatar,XG, Khazaeli AP, Curtsinges JW. 1999. Age-specific paterus of genetic variation in Drosophila melanegaster.I.Mortality. *Genetics* 143, 553-566.

- Quiles J L, Ochoa JJ, Huertas JR y Mataix J (2004a). Aspectos mitocondriales del envejecimiento. Papel del tipo de grasa de la dieta y el estrés oxidativo. *Endocrinol. Nutr.* **51**:107-120.
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Ramírez-Tortosa MC, Cassinello M, Mataix J, et al. The intake of fried virgin olive or sunflower oils differentially induces oxidative stress in rat liver microsomes. *Br J Nutr* 2002; **88**: 57-65.
- Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Battino M, Mataix J. Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil. *Br J Nutr* 1999; **81**: 21-24.
- Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in rat. *J Bioenerg Biomembr* 2001; **33**: 127-143.
- Quiles JL, Martínez E, Ibañez S, Ochoa JJ, Martín Y, López-Frías M, Huertas JR and Mataix J. Ageing-Related Tissue-Specific Alterations in mitochondrial composition and function are modulated by dietary fat type in the rat. *J Bioenerg Biomembr* 2002b; **34**: 517-524.
- Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Ibañez S, González A, Duthie GG, Huertas JR et al. Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil. *Free Rad Res* 1999b; **31**:129-135.
- Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Huertas JR, Ibañez S, Gómez JA, Battino M, et al. Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin. *Biofactors* 1999c; **9**: 331-336.
- Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Ibañez S, González A, Duthie GG, Huertas JR et al. Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil. *Free Rad Res* 1999b; **31**:129-135.
- Quiles, J.L. (1995). Estudio comparativo del aceite de oliva y girasol sobre la peroxidación lipídica en ratas sometidas a ejercicio físico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Quiles, J.L. (1995). Estudio comparativo del aceite de oliva y girasol sobre la peroxidación lipídica en ratas sometidas a ejercicio físico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Quiles, J.L., Ochoa, J. J., Huertas, J.R. and Mataix, J. (2004b). Coenzyme Q supplementation protects from age-related DNA double-strand breaks and

- increases lifespan in rats fed on a PUFA-rich diet. *Experimental Gerontology* 39: 189-194.
- Quiles, J.L., Ochoa, J.J., Ramírez-Tortosa, M.C., Battino, M., Huertas, J.R., Martín, Y. y Mataix, J. (2004a). Dietary fat type (virgen olive vs. sunflower oil) affects age-related changes in double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology* 39: 1189-1198
 - Quiles, J.L., Ochoa, J.J., Ramírez-Tortosa, M.C., Huertas, J.R., and Mataix, J. (2005) Aged-related mitochondrial DNA deletion in rat liver depends on dietary fat unsaturation. *Journal of gerontology. Biological Sciences. En prensa*
 - Ragan, C.I. (1990). Structure on function of an archetypal respiratory chain complex:NADH-ubiquinone reductase. *Biochem. Soc. Trans.* 18:515-516.
 - Ragan, C.I.; Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1982). Purification of three iron-sulfur-proteins from the iron-protein fragment of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochemistry* 21:2518-2524.
 - Ramasarma T. (1985). Natural occurrence and distribution of CoQ. In: Coenzyme Q. Lenaz, G. (ed.) John Wiley & Sons, Chichester, pp. 67-81.
 - Ramírez-Tortosa MC, López-Pedrosa JM, Suarez A, Ros E, Mataix J, Gil A. Olive oil and fish oil enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *Br J Nutr* 1999; 82: 31-39.
 - Ramon, J.R. (1993). *Protocolos:Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. Editorial IDEPSA.
 - Ramotar, D. y Demple, B. (1993). Enzymes that repair oxidative damage to DNA. En: *DNA and Free Radicals*. Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (eds). Ellis Horwood. New York , pp 165-191.
 - Redl, H., Gasser, H., Schlag, G. y Marzi, I. (1993). Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *British Medical Bulletin* 49 (3): 556-565.
 - Reeves, P.G. "Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A Diet". *J. Nutr.* 127: 838S-841S. 1997.
 - Ritcher, C., Park, J.W. y Arnes, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6465-6467.

- Roberfroid, M. Y Buc-Calderón, P. (1995). Free radical and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.
- Roche, E. y Romero-alvira, D. (1996). Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. *Med. Clin.* **106**:144-153.
- Romero Alvira, C. y González Martínez, F. (1992). Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica. *An. Esp. Pediatr.* **36(2)**:85-97.
- Roy, R.S. y McCord, J.M. (1983). Superoxide and ischaemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In *Oxy radicals and their scavenger systems Vol II*. Greenwald y cohen (eds) 145-153. Elsevier Science Publishing.
- Sagai M, Ichinose T. Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sci* 1980; 27: 731-738.
- Salvioli S, Bonafè M, Capri M, Monti D, Franceschi C. Mitochondria, aging and longevity – a new perspective. *FEBS Lett* 2001; 492: 9-13.
- Samori, B.; Lenaz, G.; Battino, M.; Marconi, G. y Domini, I. (1992). On coenzyme a orientation in membranes: a linear dichroism study of ubiquinones in a model bilayer. *J. Membr. Biol.* **128**:193-203.
- Saran, M. y Bors, W. (1990). Radical Reactions in vivo-an overview. *Rad. Env. Biophys.* **29**:249.
- Saran, M.; Michel, C. y Bors, W. (1989). Reactions of NO with O_2^- . Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radical Res. Commun.* **10**: 221-226.
- Saraste, M.; Pentilla, T. y Wikstrom, M. (1981). *Eur. J. Biochem.* **115**:261-268.
- Sastre J, Pallardó, FV, García de la Asunción J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res* 2000; 32: 189-198.
- Sauberlich, H.E. (1994). Pharmacology of vitamin C. *Ann. Rev. Ntr.* **14**:371-391.
- Schroder, I.; Gunsalus, R.P.; Ackrell, B.A.C. y Kashara, M. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**:101-108. *
- Schwartz, J. y Weiss, S.T. (1990). Dietary factors and their relationships to respiratory symptoms:NHANESII. *Am. J. Epidemiol.* **132**:67-76.
- Senault, C., Yazbeck, J., Gourbern, M., Portet, R., Vincet, M. y Gallay, J. (1990). Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondrial of rat brow adipose tissue. Effect of thermal

- adaptation and essential fatty acid deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **1023** (2):283-289.
- Sevanian, A. y Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* **5**: 365-390.
 - Sevanian, A., Davies, K.J.A. y Hochstein, P. (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:1129S-1134S.
 - Shaw FH, Promislow DTL, Tatar XG, Hughes KA, Geyes CJ. 1999. Toward reconciling inferences concerning genetic variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 152, 553-566.
 - Shimomura Y, Nishikimi M, Ozawa T. Novel purification of cytochrome c1 from mitochondrial Complex III. Reconstitution of antimycin-insensitive electron transfer with the iron-sulfur protein and cytochrome c1. *J Biol. Chem* 1985; 260: 15075-15080.
 - Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**:213-219.
 - Simpson, K.L. y Chichester, C.O., (1981). Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* **1**:351-374.
 - Sjodin, B., Hellstern-Westling, Y. y Apple, F.S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* **10**:236-254.
 - Sohal RS, Dubey A. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radic Biol Med* 1994: 16, 621-626.
 - Sohal, R.S., Sohal, B.H., and Brunk, U.T. (1990). Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech. Aging Dev.*, 53:217-227.
 - Soong, N.W., Hinton, D.R., Cortopassi, G. and Arnheim, N. (1992). Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat. Genet.*, 2, 318-323.
 - Stadtman, E.R. (1991). Ascorbic Acid and oxidative inactivation of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:1125S-1128S.
 - Stadtman, E.R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biol. Med.* **9**:315-325.

- Suarez, A.F. (1992). Efecto de la suplementación con ácidos grasos de cadena larga y vitamina E a la dieta sobre la composición de ácidos grasos y la lipoperoxidación lipídica tisular. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Tanaka M, Gong J, Zhang J, Yamada Y, Borgeld H, Yagi K Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet* 1998; 351: 185-186.
- Tappel, A. (1968). Will antioxidant nutrients slow aging process?. *Geriatrics*. **23**:97-105.
- Tian, L., Cai, Q., and Wei, H. (1998). Alterations of antioxidants enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Rad. Biol. Med.*, 24:1477-1484.
- Turrens, J.F. y Borevis, A. (1990). Generation of superoxide anion by the NADH deshidrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**:421-427.
- Tzagoloff, A.; Macino, G. y Sebald, W. (1979). Mitochondrial genes and translation products. *Ann. Rev. Biochem.* **48**:419-441.
- Ulmann, L., Blond, J. P., Maniongui, C., Poisson, J. P., Duran, G., Bezard, J., and Pascal, G. (1991). Effects of age and dietary essential fatty acids on desaturase activities and on fatty acid composition of liver microsomal phospholipids of adult rats. *Lipids* **26**, 127-133.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., and Nieto, S. (2003). Colesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. *Biol. Res.* 36:291-302.
- Van Der Loo, B. Laubegger, R. Aebischer, C.P. et al, (2002). Cardiovascular aging is associated with vitamin E increase. *Circulation*, 105:1635-1638.
- Van Remmen H, Richardson A. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 957-968.
- Van Voorheis WA, Ward S.1999. Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proc Natl Acad Sci USA*,95,II.399-11403.
- Von Sonntag, C. (1987). *The chemical basis of radiation biology*. Eds. Taylor and Francis. London. *
- Walker DW, McColl G, Jenkins NL, Harris J, Lithgow GJ. 2000. Evolution of lifespan in *C. elegans*. *Nature* 405, 296-297.
- Walker, J.E. (1992). The NADH-ubiquinona oxidoreductase (complex I) of respiratory chain. *Q.Rev.Biophys.* **25**:253-324.

- Warholm, M., Cuthenberg, C., Von Barh, C. y Mannervick, B. (1985). Glutathione transferases from human liver. *Methods in enzymology*. **113**:499-504.
- Watson WH, Cai J, Jones DP. Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:485-505.
- Weiss, H. y Kolb, H.J. (1979). Isolation of mitochondrial succinato ubiquinone reductase, citochrome c reductase from "Neurospora Crassa" using nonionic detergent. *Eur. J. Biochem*. **99**:139-149.
- Werns, S.W., Shea, M.J., Mitsos, S.E., Dysko, R.C. Fantone, J.C., Schork, M.A., Abrams, G.D., Pitt, B. y Lucchesi, B.R. (1986). Reduction of the size of infarction by allopurinol in the ischemic-reperfused canine heart. *Circulation* **73**:518-524.
- Wikstrom, M.; Krab, K. y Saraste, M. (1981). Proton-trnslocating cytochrome complexes. *Ann. Biochem*. **50**:628-655.
- Wikstrón, M. y Krab, K. (1979). Generation of electrochemical proton gradient by mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. **549**:177-222.
- Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J. y Blake, D.R. (1993). Free radical in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medicial Bulletin*. **49 (3)**:507-522.
- Yehuda, S., rabinovitz, S., Carasso, R.L., and Mostofsky, d.I. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiology of aging*, 23:843-853.
- Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 723-729.
- Zhang, Y., Aberg, F., Appelkvist, E., Dallner, G, and Ernster, L. (1995). Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *J. Nutr.*, 125:446-453.