



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA (FARMÀCIA)

**Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de
fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante
frente a estrés oxidativo en modelos celulares**

Vanessa Ugartondo Casadevall

2009

4. DISCUSIÓN GENERAL

Un balance redox intracelular es crucial para asegurar la viabilidad, el crecimiento y las diversas funciones celulares (Sen, 2000). Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y otros radicales libres se producen de forma natural en el organismo debido al propio metabolismo aeróbico de las células (metabolismo mitocondrial, actividad del Citocromo P450, de los peroxisomas, la acción de células fagocíticas, etc...) (Kohen, 1999; Zangar y col., 2004; Blanchetot y Boonstra, 2008). Pero una parte importante de los ROS que interaccionan con el organismo y la célula provienen de fuentes exógenas como la contaminación ambiental, la radiación solar, y otros factores como la dieta, las drogas, el tabaco o el ejercicio intenso (Ajila y Prasada Rao, 2008).

Existen un gran número de evidencias que sugieren que las concentraciones excesivas de ROS en el cuerpo humano están implicadas en varios eventos patológicos y que el daño oxidativo sobre los componentes celulares puede jugar un importante papel en el desarrollo de varias enfermedades (Ames y col., 1993; Singh y Rajini, 2008).

Los organismos vivos disponen de toda una serie de mecanismos de defensa endógenos y exógenos para limitar los niveles de ROS y el daño que causan (Ames y col., 1993). Estas defensas incluyen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, así como compuestos antioxidantes no enzimáticos como polifenoles, ácido ascórbico y el glutatión. Es sabido que un desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes de la célula está asociado a condiciones fisiológicas y patológicas como el envejecimiento, el cáncer, la artritis reumatoide, la aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas (Ajila y Prasada Rao, 2008).

De ahí el creciente interés de la comunidad científica y la industria por obtener sustancias de origen natural encaminadas especialmente a la prevención y tratamiento de estas patologías y alteraciones producidas por los ROS. En este contexto, es importante la caracterización de las funciones bioquímicas protectoras de antioxidantes de origen natural y el estudio de sus mecanismos de acción. Un gran número de constituyentes de las plantas, los conocidos como compuestos fitoquímicos, poseen reconocidas actividades antioxidantes (Auddy y col., 2003; Medina y col., 2006). Dentro de este extenso grupo de sustancias, destaca la familia de los polifenoles. Además de sus bien documentados efectos antioxidantes, los polifenoles, entre ellos los flavonoides, presentan otras propiedades que incluyen actividades antiinflamatorias, antivirales (Friedman, 2007), o antialérgicas (Havsteen, 2002) y son cada vez más apreciados como agentes quimiopreventivos en situaciones patofisiológicas, como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Dai y col., 2006; Torres y col., 2005; Middleton y col., 2000).

Dado que las fuentes de recursos naturales son limitadas, actualmente existe un gran interés en el uso de fuentes renovables y en la explotación integral de los materiales residuales no procesados. La recuperación de compuestos químicos de alto valor añadido de residuos y productos de desecho naturales es un prometedor enfoque para el desarrollo sostenible (Torres y Bobet, 2001). Por este motivo se

está realizando un gran esfuerzo en comprobar el putativo efecto beneficioso para la salud de nuevos productos obtenidos de los residuos agrícolas (Yilmaz y Toledo, 2004).

Una primera serie de potenciales compuestos antioxidantes se obtuvo a partir de la despolimerización de flavanoles poliméricos procedentes de bagazo de uva principalmente y, en menor grado, de corteza de hamamelis (para obtener los compuestos galoizados), en presencia de cisteína y cisteamina. (Torres y Bobet, 2001; Torres y col., 2002a).

La segunda colección de compuestos antioxidantes que han formado parte de este estudio consiste en una serie de fracciones polifenólicas (proantocianidinas) extraídas de bagazo de uva (*Vitis vinifera*), de corteza de pino (*Pinus pinaster*) y de corteza del arbusto hamamelis (*Hamamelis virginiana*), y obtenidas mediante la combinación de diferentes técnicas cromatográficas (siguiendo el procedimiento descrito por Torres y Bobet, 2001 y Touriño y col., 2005 y 2008a). Los polifenoles procedentes de pino y de uva son esencialmente procianidinas (catequinas oligoméricas con sólo dos hidroxilos en el anillo B) sin galoización o con bajo contenido en galatos, respectivamente. Las fracciones homólogas de hamamelis contienen galocatequinas y prodelfininas (catequinas monoméricas y oligoméricas con tres hidroxilos en el anillo B) con una elevada proporción de galatos, así como taninos hidrolizables ricos en galatos.

La caracterización de las propiedades de toda esta serie de compuestos de naturaleza polifenólica se ha realizado en colaboración con otros grupos de trabajo que se han dedicado, por un lado, a obtener los compuestos y determinar su estructura y por el otro, a estudiar sus efectos antiproliferativos sobre células tumorales, su actividad neuroprotectora y su capacidad antioxidante mediante diversos sistemas químicos. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la actividad y mecanismos de acción de estos compuestos, en este trabajo hemos planteado toda una serie de estudios dirigidos a caracterizar el efecto de los compuestos polifenólicos sobre modelos celulares sometidos a estrés oxidativo para comprender mejor su acción antioxidante, su relación estructura-actividad y poder plantear posibles aplicaciones.

Actividad antioxidante

Las propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos derivados de plantas han sido ampliamente estudiadas mediante sistemas químicos *in vitro*. Estos sistemas tienen la ventaja de ser relativamente simples y económicos, pero tienen el inconveniente que sólo pueden evaluar la actividad antioxidante para su particular sistema de reacción y su relevancia en acciones protectoras de la salud *in vivo* es incierta (Liu y Finley, 2005). Por lo tanto se considera adecuado utilizar más de un sistema de ensayo antioxidante, dado que pueden estar implicados diferentes mecanismos obteniéndose diferentes resultados dependiendo del método de análisis utilizado (Zhang y col., 2006). Debido a que el significado y la relevancia de la evaluación de la actividad antioxidante dependen en gran parte del método aplicado, la caracterización adecuada de un antioxidante debe realizarse mediante

una batería de ensayos que proporcionen información diversa y complementaria para una adecuada interpretación de los resultados.

Así, para caracterizar la actividad antioxidante de los compuestos de naturaleza polifenólica que forman parte de este estudio se ha utilizado como un primer modelo, eritrocitos humanos sometidos a estrés oxidativo causado por un azo compuesto, el AAPH.

Los eritrocitos son un modelo celular muy utilizado para el estudio de los mecanismos de daño oxidativo y toxicidad en biomembranas (Singh y Rajini, 2008); además de ser una muestra fácil de obtener y preparar, representan un modelo celular muy simple por no contener ni núcleo ni orgánulos. Los eritrocitos son muy susceptibles al estrés oxidativo debido a su función como transportadores de oxígeno, su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y proteínas en la membrana y por poseer una elevada concentración de hierro y hemoglobina intracelular que pueden actuar como promotores de procesos oxidativos (Tedesco y col., 2000; Singh y Rajini, 2008).

Los radicales del oxígeno reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados y las proteínas en los eritrocitos causando lipoperoxidación lipídica y degradación de proteínas. La peroxidación lipídica (LPO) es un proceso que produce un gran número de sucesos patológicos en las células y en el organismo (Sroka y Cisowski, 2003). Este proceso, que daña los ácidos grasos poliinsaturados, tiende a provocar un descenso de la fluidez de la membrana y conduce a una polimerización de los componentes de la membrana que puede ser transmitida a las sustancias vecinas como las proteínas de la membrana y del citoesqueleto (Chiu y col., 1989). Hay estudios que demuestran que estos procesos pueden ser efectivamente atenuados por polifenoles vegetales.

Actividad antioxidante frente al AAPH

La oxidación de la membrana de los eritrocitos y del resto de células por RL suele generarse por medio de la descomposición térmica de un compuesto azo, lipo o hidrosoluble, en un ambiente con oxígeno. El compuesto azo se descompone termodinámicamente para dar radicales sin participación de enzimas ni biotransformaciones y la tasa y el lugar de generación de radicales es fácilmente medido y controlado (Niki y col., 1988). La adición del AAPH, un iniciador de radicales peroxilo a una suspensión de eritrocitos induce la oxidación de los lípidos y proteínas de membrana, resultando en última instancia en hemólisis.

Como flavanol de referencia tanto para evaluar la actividad de los conjugados con cisteína y cisteamina como la de las fracciones polifenólicas, hemos utilizado la epicatequina, por ser uno de los flavanoles principales de la uva y del té y disponer de abundantes datos respecto a su actividad (Mitjans y col., 2004; Kitagawa y col., 2004).

Tanto los derivados de Epicatequina como las fracciones polifenólicas de diferente origen natural mostraron una eficaz actividad antioxidante en el ensayo de hemólisis con AAPH.

a. Derivados de Epicatequina

En general todos los derivados de epicatequina se mostraron más eficaces que la Ec en la protección contra la hemólisis inducida por el azo compuesto AAPH como demuestran las CI_{50} más bajas calculadas para cada compuesto (Tabla 1, Artículo 1). Una CI_{50} inferior indica que se necesita menos concentración de producto para obtener un efecto antihemolítico más eficaz. El orden del poder antioxidante fue el siguiente: E-Cys-Ec > Cya-EcG > Cys-EgcG > Cys-EcG > Cya-EgcG > Cys-Ec > Cya-Ec > Ec. En este ensayo, el compuesto más potente, con mejor actividad antihemolítica, resultó ser el E-Cys-Ec.

En todos los casos, la presencia de un grupo galato produjo un incremento en la actividad antioxidante, como se ha demostrado en otros estudios (Torres y col., 2002a; Sroka, 2005). El número de grupos hidroxilo conectados con el anillo aromático, en posición orto o para en relación los unos con los otros incrementa la actividad antioxidante y antiradicalaria de los ácidos fenólicos. Los grupos hidroxilo de los grupos galato contribuyen a la actividad antioxidante, haciendo no sólo que los compuestos sean capaces de donar más átomos de hidrógeno sino de proporcionar más sitios de quelación para el secuestro de cationes catalíticos (Kondo y col., 1999a y 1999b; Lozano y col., 2006).

b. Fracciones de pino, uva y hamamelis

Todas las fracciones ensayadas mostraron una inhibición de la hemólisis inducida *in vitro* por el AAPH de una manera dosis-dependiente, y todas fueron más efectivas que la epicatequina, como muestran las CI_{50} obtenidas a partir del análisis de las curvas dosis-respuesta, con diferencias significativas en todos los casos. (Figura 2, Artículo 3 y página 701, Artículo 4). Las fracciones de hamamelis fueron las que presentaron una mejor capacidad antihemolítica, seguidas por las fracciones de uva y las de pino. Las principales características que diferencian a esta colección de fracciones es el tamaño y el contenido en grupos galato (el % de galoización). Los polifenoles procedentes de pino y de uva son esencialmente procianidinas sin galoización o con bajo contenido en galatos, respectivamente. Las fracciones homólogas de hamamelis contienen galocatequinas y prodelfininas con una elevada proporción de galatos, así como taninos hidrolizables ricos en galatos.

Entre las fracciones de uva, el poder antioxidante más elevado corresponde a las mezclas de compuestos con el grado de polimerización y de galoización más altos y flavonoles no glicosilados. La glicosilación de los flavanoles los convierte en secuestradores de radicales menos eficientes que las correspondientes agliconas (Torres y col., 2002b). A igual grado de galoización en las fracciones, como es el caso de VIIIIG y XIG, la actividad antioxidante fue proporcional al mDP o grado medio de polimerización. Estas observaciones corroboran otros estudios en los que se describe que la actividad antioxidante depende de la polimerización e incrementa con la galoización (Plumb y col., 1998). La fracción de uva más efectiva fue la IVG, aunque no se encontraron diferencias significativas con la actividad de VIIIIG y XIG.

Las fracciones de pino, a pesar de la ausencia de galoización en su estructura, presentaron también una buena actividad antioxidante, siendo la fracción XIP la más potente. Se encontró una elevada correlación entre la actividad antioxidante y el grado de polimerización de las fracciones de pino, es decir, que cuanto mayor es el mDP, mejor es la capacidad de inhibir la oxidación inducida por el AAPH. La fracción total OWP fue la menos efectiva, posiblemente por su elevado contenido en catequinas monoméricas, que reduce la capacidad antioxidante. Ursini y col., (2001) concluyeron que las procianidinas poliméricas eran mejores antioxidantes que los correspondientes monómeros, catequina y epicatequina, debido a que si los grupos catecol están muy cercanos, sus potenciales de oxidación son mucho más bajos que los de las catequinas.

Al comparar fracciones homólogas de diferente procedencia se aprecia que las fracciones de pino son antioxidantes ligeramente menos potentes que las fracciones de uva y éstas, a su vez, presentan menor actividad que las fracciones de hamamelis. Estos resultados concuerdan con resultados previamente obtenidos por nuestro grupo (Tourinho y col., 2005) que sugieren que la menor capacidad antioxidante podría atribuirse a un menor contenido de grupos galato en la estructura de las fracciones de uva y pino, que, como se ha indicado, proporciona capacidad antioxidante extra (Sroka, 2005; Torres y col., 2002a). Las fracciones de hamamelis, al ser las que presentan el porcentaje de galoización más elevado, como era de esperar, fueron las que presentaron un efecto antioxidante más marcado respecto a la oxidación de los eritrocitos por el AAPH.

Hay estudios que han sugerido que el daño prehemolítico causado por el AAPH está mediado principalmente por la peroxidación lipídica y en menor medida, por la oxidación de proteínas localizadas en la región hidrofóbica de la membrana (Simao y col., 2006). Entonces, todos estos compuestos de naturaleza polifenólica (derivados de Ec y fracciones), de acuerdo a su efecto antihemolítico, deberían prevenir la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas.

Por el momento no se han encontrado evidencias concluyentes sobre la relación estructura-actividad responsable de la actividad biológica de las catequinas y otros flavonoides, (Caturla y col., 2003). Varias investigaciones han mostrado que flavonoides como la (-)-epicatequina y la (+)-catequina, y sus procianidinas relacionadas, podrían adsorberse a las membranas a través de asociaciones con las cabezas polares de los fosfolípidos, generando un ambiente rico en flavonoides. Esta "cubierta" de flavonoides proporcionaría protección contra los oxidantes, así como contra otros agresores externos limitando el acceso de los oxidantes a la bicapa y/o controlando la tasa de propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres que se dan en el núcleo hidrofóbico de las membranas (Erlejman y col., 2004). En particular, las catequinas galoizadas podrían afectar a la configuración de la membrana formando estructuras más compactas que limitarían el acceso de prooxidantes (Pazos y col., 2006). Esta podría ser una de las razones por las que las fracciones con mayor contenido en grupos galato y los derivados de Epicatequina con más galatos en su estructura sean en general antioxidantes más activos. De cualquier forma, debido a la información que se dispone (Torres y col., 2002b; Na y Surh, 2006; Matito y col., 2003) sobre el posible efecto prooxidante de los grupos galato y su influencia sobre diversos eventos celulares (ciclo celular, apoptosis), podría ser preferible, en ciertos casos, usar compuestos con menor galoización para aplicaciones relacionadas con la alimentación o la protección de la

piel. Por ejemplo, en el caso de las fracciones polifenólicas, se ha demostrado que las fracciones de pino, aunque algo menos potentes que las de uva y las de hamamelis, mostraron propiedades antioxidantes efectivas, especialmente las de elevado mDP (XIP y IVP) y por este motivo son una interesante opción para el diseño de productos seguros que ejerzan protección antioxidante sin alterar funciones normales celulares.

Actividad protectora frente al estrés oxidativo inducido por el H₂O₂

Como un segundo modelo oxidativo para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos, se han utilizado eritrocitos humanos y cultivos celulares de líneas no tumorales, fibroblastos 3T3 y queratinocitos HaCaT, sometidos a estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

En este estudio se ha utilizado el H₂O₂ como sistema generador de radicales del oxígeno, ya que se sabe que esta especie reactiva, cuando se presenta en exceso es uno de los principales compuestos que puede ser perjudicial para las células (Sroka y Cisowski, 2003), a elevadas concentraciones induce necrosis celular mientras que a bajas concentraciones induce apoptosis.

- Efecto protector frente al daño oxidativo en eritrocitos

Uno de los principales marcadores de daño oxidativo producido por los radicales libres es la peroxidación lipídica de las membranas celulares. En este proceso aparecen intermediarios altamente reactivos como el MDA, que pueden alterar las funciones celulares y disminuir la supervivencia celular (Singh y Rajini, 2008). Siguiendo con la caracterización de las propiedades antioxidantes de nuestros compuestos polifenólicos, se examinó el grado de peroxidación lipídica en eritrocitos tratados con H₂O₂ y la capacidad de los compuestos para proteger contra esta peroxidación. La determinación se hizo midiendo espectrofotométricamente la formación de TBARS después de la reacción entre MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Stocks y Dormandy, 1971).

a. Derivados de Epicatequina

La elevada producción de MDA que provocó la incubación de los eritrocitos con el H₂O₂ fue inhibida en diferente grado al añadir la Ec y sus derivados lo que indica que estos compuestos presentan capacidad protectora contra el daño lipídico (Figura 2, Artículo 2). Todos los compuestos protegieron de forma significativa contra la formación de TBARS a las concentraciones más altas, excepto la Ec y la Cys-Ec; la Cya-EcG fue el compuesto más efectivo a concentraciones más bajas. El efecto inhibitorio contra la peroxidación varía en función de la estructura o composición de los compuestos. Los compuestos galoizados (Cys-EcG, Cya-EcG, Cys-EgcG y Cya-EgcG) se mostraron más eficaces que los compuestos sin galato. Esta relación directa de la protección contra la peroxidación lipídica y el grado de galoización ha sido documentada por otros autores (Kondo y col., 1999a; Caturla y col., 2003; Sroka y Cisowski, 2003). El grupo no fenólico también afecta a la actividad de los conjugados. Los conjugados con cisteamina mostraron un comportamiento ligeramente mejor que el de los conjugados con cisteína, aunque las diferencias no fueron significativas. El compuesto E-Cys-Ec fue a su vez un

inhibidor de la LPO más efectivo que el Cys-Ec, lo que puede atribuirse al grupo éster etilo como se ha postulado en otros estudios (Sultana y col., 2005). Recientemente se ha descrito que la parte no fenólica de los conjugados, especialmente el grupo cisteamina, promueve la internalización de la cisteína en las células y ayuda a mantener el nivel de glutatión intracelular (Maher y col., 2008). Este incremento del sistema de defensa antioxidante endógeno podría contribuir significativamente a la actividad antioxidante celular de los derivados de epicatequina.

Otro de los marcadores de estrés oxidativo característico del ataque por radicales es el grado de hemólisis que provocan sobre los eritrocitos. La actividad antioxidante de los derivados de Ec se ensayó también midiendo la actividad antihemolítica en eritrocitos incubados con H_2O_2 . La elevada hemólisis causada por el peróxido de hidrógeno (más del 75 %) fue prevenida con distinta efectividad por la Ec y sus conjugados (Figura 3, Artículo 2). Del mismo modo que en el caso de la LPO, la incorporación de cisteína y cisteamina a la Ec incrementa su capacidad antihemolítica y la presencia de grupos galato en las moléculas también hace más efectiva la capacidad protectora. De nuevo el compuesto Cya-EcG fue el más eficiente, especialmente en el rango de concentraciones más bajo.

Para comprobar la posible relación entre los fenómenos de lipoperoxidación lipídica y hemólisis causadas por el ataque del peróxido de hidrógeno a los eritrocitos, se calcularon las CI_{50} (concentraciones que inhiben el 50% de la producción de MDA y de la hemólisis inducida por H_2O_2) a partir de las curvas dosis-respuesta de los ensayos de peroxidación lipídica y hemólisis. De nuevo se constató que los compuestos que contienen el grupo 3-O-galato (Cys-EcG, Cya-EcG, Cys-EgcG y Cya-EgcG) presentaban los valores de CI_{50} más bajos, lo que corrobora el incremento de eficacia causado por la presencia de este grupo. La correlación entre las CI_{50} de ambos ensayos fue muy elevada (Figura 4, Artículo 2), lo que sugiere que los compuestos presentaron una eficacia similar en ambos ensayos de capacidad antioxidante. Los valores obtenidos para la hemólisis fueron ligeramente inferiores a los de la LPO, lo que indicaría que la peroxidación lipídica y la hemólisis son dos fenómenos relacionados, pero que serían desencadenados por diferentes mecanismos.

Respecto a los derivados flavanoles, podemos concluir que dos características químicas podrían dictar principalmente su capacidad antioxidante, la fracción no fenólica y la presencia de grupos pirogalol y galato en su estructura. La fracción no fenólica de la molécula parece afectar a la actividad de los conjugados, especialmente su capacidad de penetrar en las membranas biológicas (Alonso y col., 2004) y puede también modular los sistemas de defensa endógenos. En contraste, los grupos galato de estos conjugados proporcionan un poder secuestrador de radicales superior debido a sus grupos hidroxilo adicionales (Torres y col., 2005).

b. Fracciones de pino, uva y hamamelis

Las fracciones polifenólicas inhibieron la peroxidación lipídica causada por el H_2O_2 en eritrocitos de una forma efectiva y dosis dependiente (Figura 1, Artículo 5). La

eficacia de las fracciones fue más evidente a altas concentraciones, aunque ya se detectó un buen efecto inhibitorio de la LPO a las concentraciones más bajas ensayadas de las fracciones de pino, uva y hamamelis. Al comparar fracciones homólogas, las fracciones de hamamelis mostraron los efectos inhibitorios más elevados y las de pino los más bajos, aunque las diferencias no fueron significativas. Las fracciones de hamamelis, con un contenido superior de grupos galato, mostraron una mejor protección contra la peroxidación lipídica y las fracciones de uva y pino, con un contenido más bajo en galatos o su no galoización, respectivamente, se mostraron más modestas en su efecto inhibitorio, cumpliendo así con la actividad esperada por el efecto de la galoización.

Entre las fracciones de pino, la capacidad inhibitoria de LPO más fuerte se correspondió con el extracto que presentaba el grado de polimerización más alto (mDP). En los extractos de uva y de hamamelis, la protección contra la LPO fue proporcional al mDP y a la galoización. Por lo tanto, como ha sido previamente descrito (Artículo 3), se puede concluir que tanto el mDP como la galoización son características químicas importantes en la determinación de la capacidad antioxidante de las sustancias polifenólicas.

El efecto protector de las fracciones también se evaluó mediante la capacidad de inhibición de la hemólisis inducida por el H_2O_2 . La considerable hemólisis provocada por el peróxido de hidrógeno en nuestras condiciones de ensayo (75%) fue significativamente inhibida por las diversas fracciones polifenólicas (Figura 2, Artículo 5). Las fracciones de pino y uva homólogas ejercieron una actividad antihemolítica similar, siendo la fracción IV la más protectora en ambos casos, sin embargo, los extractos de hamamelis ejercieron una capacidad antihemolítica más baja de lo esperado en función de los resultados obtenidos en la peroxidación lipídica. Estos datos nos sugieren que en el caso de la hemólisis provocada por H_2O_2 el grado de polimerización y galoización de las mezclas no determina tan claramente su actividad protectora como en el caso de la inhibición de la LPO (o la protección contra el AAPH).

Las fracciones de hamamelis casi previenen completamente la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados pero no previenen completamente la hemólisis, lo que indica que hay otros factores importantes que causan la lisis de los eritrocitos además de la peroxidación lipídica (Sato y col., 1995).

- Efecto protector frente a la citotoxicidad del H_2O_2

a. Derivados de Epicatequina

Dado que los conjugados de epicatequina presentaron actividad antiproliferativa y apoptótica en varias células tumorales (Lozano y col., 2006, Torres y col., 2002a, Lozano y col., 2005) y un bajo efecto citotóxico en líneas celulares no malignas (Ugartondo y col., 2006), se intentó caracterizar la potencial capacidad protectora de estos derivados en células no tumorales expuestas a daño inducido por H_2O_2 . Como modelos celulares se escogieron las líneas celulares de fibroblastos de ratón 3T3 y de queratinocitos HaCaT porque previamente se habían realizado los ensayos de citotoxicidad de estos compuestos en estas líneas celulares. Tanto las 3T3 como las HaCaT sufrieron un descenso de la viabilidad celular al ser expuestas al H_2O_2 ,

aunque las primeras fueron mucho más sensibles al daño oxidativo llegando a un descenso de casi el 80 % de la supervivencia (un 55% en el caso de las HaCaT).

En las células 3T3 se ensayaron tanto la Ec como todos sus derivados, mientras que en las HaCaT, sólo se ensayaron los derivados que presentaron un mejor efecto protector en las pruebas realizadas con los fibroblastos.

Los antioxidantes modularon la viabilidad celular de los fibroblastos 3T3 expuestos a H₂O₂ de forma específica y la protección que ejercieron no fue significativa para todos ellos. El derivado Cya-Ec fue el que mostró un mejor rendimiento a las concentraciones más elevadas y el único en presentar un comportamiento dosis-respuesta, mientras que los compuestos Ec, Cys-Ec, Cya-EgcG y E-Cys-Ec, mostraron una capacidad protectora muy débil. Los compuestos Cya-EcG y Cys-EgcG mostraron una protección más eficiente a concentraciones intermedias (Figura 5, Artículo 2). De nuevo, el mantenimiento de los niveles intracelulares de glutatión producido por el grupo cisteamina (Maher y col., 2008) podría ser parcialmente responsable del efecto general del compuesto Cya-Ec. Los compuestos galoizados perdieron efectividad a altas concentraciones, observación que podría relacionarse con el efecto prooxidante previamente descrito de los compuestos polifenólicos y, sobre todo, con el contenido en grupos galato de las moléculas (Caturla y col., 2003; Fan y Lou, 2004). Además, algunas de las concentraciones utilizadas mostraron ya cierta toxicidad en los estudios previos de actividad citotóxica (Tabla 2, Artículo 1). Este dato implica que no es posible inhibir totalmente el daño celular inducido por el H₂O₂ incrementando la concentración de los compuestos galoizados, debido a que pueden presentar efectos prooxidantes a altas concentraciones.

Respecto a la influencia de la fracción no fenólica, se observó que los derivados con cisteamina (Cya-Ec y Cya-EcG) fueron más efectivos que sus correspondientes derivados con cisteína (Cys-Ec y Cys-EcG), pero este patrón no se observó con los compuestos que contienen el grupo pirogalol (Cys-EgcG y Cya-EgcG). La acción prooxidante a menudo atribuida a los flavonoles se debe en gran medida al grupo pirogalol del anillo B presente en las galocatequinas. Bajo ciertas condiciones, los flavonoides que contienen esta estructura pirogalol como la (-)-epigalocatequina y la (-)-epigalocatequinagalato, pueden participar en el ciclo redox vía la producción del anión radical superóxido activo (O₂^{·-}) y el subsiguiente peróxido de hidrógeno (Kondo y col., 1999a; Lozano y col., 2006). En contraste, el grupo galato, que tiene la estructura de tres hidroxilos acoplada con el grupo carbonil, no produce superóxidos debido a la estabilidad de su radical.

En la línea celular HaCaT se ensayaron los compuestos Cya-EcG y Cys-EgcG considerados los más eficientes en los ensayos de protección en 3T3, ya que a concentraciones intermedias mostraron una actividad antioxidante significativa contra el daño inducido por ROS. Se observó un incremento dosis-dependiente en la viabilidad celular al pretratar las células con los compuestos Cya-EcG y Cys-EgcG, con diferencias significativas sólo en las concentraciones más altas (Figura 6, Artículo 2). El compuesto más efectivo, especialmente a concentraciones más bajas, fue el Cya-EcG. De nuevo, la leve pérdida de viabilidad observada a las concentraciones más altas es consistente con los datos obtenidos en los ensayos de citotoxicidad de estos compuestos (Tabla 2, Artículo 1) y podría atribuirse de nuevo a la presencia de grupos galato y a su efecto prooxidante.

Es importante señalar que estos ensayos, tanto en 3T3 como en HaCaT, se realizaron preincubando las células toda la noche antes de la adición del H₂O₂. Esta necesidad de preincubación con los flavanoles antes de añadir el H₂O₂ para conseguir un efecto protector más marcado, sugiere que estos compuestos ejercen su acción protectora contra el daño celular por otros mecanismos diferentes al mero secuestro de ROS. Entre estos mecanismos se proponen la interacción de los flavonoides con las membranas y proteínas intracelulares y la activación de enzimas antioxidantes y del ciclo del glutatión (Puiggròs y col., 2005; Roig y col., 2002).

La Cya-EcG presentó la efectividad más alta como agente antioxidante contra los tres marcadores de estrés oxidativo estudiados, es decir, la hemólisis, peroxidación lipídica y citotoxicidad. Su efecto puede ser el resultado de la combinación de diferentes actividades antioxidantes incluyendo el secuestro directo de radicales libres, el incremento de los sistemas de defensa endógenos, la quelación de metales y la fluidez de membrana. Además, dado que este compuesto no presenta el grupo pirogalol en la estructura flavánica condensada, podría ser más seguro que otros potentes polifenoles del tipo galocatequina como el compuesto Cys-EcgG.

b. Fracciones de pino, uva y hamamelis

Se examinaron los efectos protectores específicos de nuestra serie de fracciones polifenólicas contra el daño oxidativo en fibroblastos de ratón para determinar su potencial papel como antioxidantes en cultivos celulares normales. En este caso no se comprobó este efecto protector en la línea celular HaCaT por falta de disponibilidad de producto.

La adición de H₂O₂ a los cultivos celulares provocó una pérdida de aproximadamente un 85% de viabilidad de las células 3T3. La preincubación con las fracciones polifenólicas antes de inducir el daño oxidativo por H₂O₂, dio lugar a una modulación de la viabilidad celular específica de compuesto (Figura 3, Artículo 5). Todas las fracciones protegieron en cierto grado contra la citotoxicidad del H₂O₂, aunque no se observaron diferencias significativas en todos los casos.

De nuevo, como ya se observó en los ensayos realizados con la Ec y sus derivados conjugados con cisteína y cisteamina, el efecto protector de cada compuesto no siempre se incrementó en paralelo con su concentración. Excepto para las fracciones de mDP más bajo, OWP y IVP, que ejercen un efecto protector dosis-dependiente, el resto de fracciones pierden efectividad a las concentraciones más altas. Además, los extractos de hamamelis y uva fueron citotóxicos en cierto grado a algunas de las concentraciones más altas utilizadas en este estudio, dato que se corrobora con los ensayos de citotoxicidad realizados con estos compuestos (Figura 4, Artículo 3 y página 701, Artículo 4). Este efecto tóxico se podría explicar considerando el efecto prooxidante de los compuestos polifenólicos (Fan y Lou, 2004) y estaría muy relacionado con el grado de galoización presentado por las fracciones. Por lo tanto, no es posible inhibir totalmente el daño inducido por el H₂O₂ incrementando la concentración de las fracciones al igual que ocurriría con los derivados galoizados de Ec. Es interesante destacar que algunas de estas fracciones altamente galoizadas como XIG, OWH, IVH y VIIIH, mostraron ya una actividad biológica antioxidante muy significativa contra el estrés oxidativo inducido por ROS

a bajas concentraciones. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el grado de galoización por un lado está estrechamente relacionado con la capacidad protectora antioxidante de los compuestos en este modelo celular y, por el otro, es también responsable de su efecto prooxidante a elevadas concentraciones como se ha descrito para otros compuestos polifenólicos (Fan y Lou, 2004; Schmidt y col., 2005).

Spencer y col., (2001) constataron que el tratamiento de fibroblastos con peróxido de hidrógeno lleva a la muerte celular implicando procesos apoptóticos. Estos datos son consistentes con las observaciones de otros investigadores (Teramoto y col., 1999; Lee y col., 2000), que muestran la implicación de procesos apoptóticos en la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno en fibroblastos y otras células. Por lo tanto, la capacidad de las fracciones polifenólicas para ejercer efectos beneficiosos, no dependería necesariamente sólo de su acción como secuestradoras de radicales libres o ROS, sino que también intervendrían su habilidad de interactuar con funciones celulares como las cascadas de señalización celular, influenciar en la célula a nivel transcripcional y regular a la baja vías que conducen a la muerte celular. Además, los compuestos polifenólicos mejoran la actividad antioxidante celular contra el estrés por H₂O₂ modulando el potencial reparador del ADN dañado, funcionando así como un modificador de respuestas biológico.

La relevancia prometedor y fisiológica de los presentes resultados se basa en el hecho de que cuando los polifenoles del estudio se usan a bajas concentraciones, se comportan como compuestos protectores contra el daño celular causado por el H₂O₂. La observación que las concentraciones protectoras de estos compuestos están en el rango bajo, respaldan el concepto de que estas procianidinas pueden proporcionar una significativa actividad antioxidante *in vivo*.

Citotoxicidad

Actualmente, las poblaciones que tienen sus necesidades básicas cubiertas, centran su interés en la búsqueda de una mejor calidad de vida, fomentando hábitos de alimentación y de cuidado personal que ayuden a mejorar su estado de salud general. Debido a sus reconocidos beneficios para la salud, la gente tiende a consumir cada vez más suplementos alimenticios y productos farmacéuticos ricos en compuestos de origen vegetal, como polifenoles, e incluso recurrir a la medicina natural. Pero existe poca información sobre el potencial riesgo para la salud humana que podrían suponer estos compuestos. Ciertas sustancias presentes en las plantas expresan actividades citotóxicas y genotóxicas y muestran correlación con la incidencia de ciertos tumores (Labieniec y Gabryelak, 2005), además de poder causar efectos irritantes o reacciones de tipo alérgico por el contacto con la piel u otros órganos. Por lo tanto, entender los beneficios para la salud y/o la toxicidad potencial de estos componentes vegetales es fundamental para garantizar su correcta y segura utilización.

La determinación de la citotoxicidad y la genotoxicidad son una parte fundamental de la evaluación de nuevos compuestos con potenciales usos en campos como la quimioterapia o la dermofarmacia, para determinar las asociaciones riesgo-beneficio de dichos compuestos y garantizar que los productos

ejerzan sus actividades de una forma segura con el mínimo efecto tóxico sobre el organismo (Rao y col., 1997; Savi y col., 2006).

Estudios previos demostraron que tanto los derivados de epicatequina (Torres y col., 2002a, Lozano y col., 2005; Lozano y col., 2006), como las fracciones polifenólicas, presentaban una prometedora actividad antiproliferativa, proapoptótica y reguladora del ciclo celular en diversas líneas celulares tumorales de piel y colon (Torres y col., 2002b; Matito y col., 2003; Touriño y col., 2005; Lizárraga y col., 2005; Touriño y col., 2008a), así que, entre las potenciales aplicaciones de estos compuestos tiene mucho interés la de utilizarlos como agentes quimiopreventivos. Pero, por la acción que deben desarrollar, los fármacos anticancerígenos están diseñados para matar células y se debe asegurar que esta actividad sea selectiva para las células tumorales. Debido a esto, es necesario e imprescindible, antes de considerar el uso de compuestos en la lucha contra el cáncer, demostrar que estos nuevos o potenciales fármacos son menos tóxicos para las células normales que para las tumorales.

Pensamos que es razonable utilizar, como primera fase de cribado, ensayos toxicológicos *in vitro* para seleccionar los compuestos menos tóxicos de entre los más activos. El uso de ensayos *in vitro* simples y reproducibles consistentes en cultivos de monocapas de queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos, nos permitirán predecir los efectos adversos, incluyendo la toxicidad potencial, y definir las concentraciones seguras de aplicación para futuras formulaciones (Benavides y col., 2004). Para especificar los efectos citotóxicos *in vitro* de las sustancias polifenólicas de este estudio, se determinó la viabilidad celular a través del ensayo de captación del rojo neutro en las líneas celulares de queratinocitos humanos HaCaT y fibroblastos de ratón de origen embrionario 3T3.

a. Derivados de Epicatequina

Todos los derivados de epicatequina presentaron efectos citotóxicos y esta toxicidad fue superior a la mostrada por la epicatequina, aunque no se vieron diferencias significativas en todos los casos. En la Tabla 2 del Artículo 1 se muestran los resultados de citotoxicidad expresados como la CI_{50} tanto de la epicatequina como de los diferentes conjugados, organizados por línea celular y por tiempo de exposición a los compuestos. A menor valor de CI_{50} , más potente resulta el producto como inhibidor del crecimiento celular o más tóxico resulta el producto hacia las células. En general se observa que los diferentes compuestos tienen un comportamiento similar respecto a la línea celular, son más tóxicos en la línea de fibroblastos 3T3 e incrementan su efecto citotóxico al incrementarse el tiempo de exposición, especialmente en el intervalo 24 a 48h más que de 48 a 72h (ejemplo Cya-EcG, Figura 2, Artículo 1).

Los derivados estudiados con un efecto citotóxico menor fueron los que no presentaron grupos galato en su estructura, es decir, Cys-Ec, Cya-Ec y E-Cys-Ec. En contraste, los derivados con grupos galato en sus moléculas tuvieron un efecto citotóxico marcadamente superior. Así, la presencia de galatos incrementa el efecto citotóxico de los productos. Otros autores han demostrado que las catequinas polifenólicas más tóxicas del té contienen grupos galato, mientras que las menos tóxicas, la catequina y la epicatequina, no los contienen (Galati y col., 2006; Schmidt y col., 2005).

La influencia del grupo no fenólico de las moléculas sobre la actividad citotóxica no parece demasiado clara, ya que no se aprecian diferencias significativas entre la citotoxicidad ejercida por los compuestos conjugados con cisteína y los conjugados con cisteamina, aunque estos últimos parecen tener un efecto tóxico más marcado. Lo que sí es evidente es que la introducción de estos grupos incrementa la citotoxicidad respecto a la molécula no conjugada, la Ec. En este caso sí que parece claro que el grupo éster etilo, aunque también aumenta la citotoxicidad, no lo hace como cabría esperar por el elevado efecto antioxidante que proporciona.

Al correlacionar los índices de toxicidad de cada compuesto (derivado de Ec) obtenido mediante el ensayo NRU (CI₅₀) con la actividad antioxidante, se comprobó que el compuesto más activo como antioxidante es también el más citotóxico (Figura 3, Artículo 1). Esta correlación fue similar en los tres períodos de exposición. Si eliminamos el compuesto E-Cys-Ec, la correlación se incrementa, por lo que se puede postular que este compuesto es menos citotóxico de lo que podríamos suponer en función de su actividad antihemolítica.

La presencia del grupo etil éster no sólo no incrementa la citotoxicidad del compuesto sino que promueve su actividad antioxidante en relación a su equivalente sin el grupo etil éster (Cys-Ec). Otros autores han observado resultados similares en el caso del ácido etil éster ferúlico, que exhibe elevada actividad secuestradora de radicales (Mohammad-Abdul y Butterfield, 2005; Kikukaki y col., 2002). La esterificación etílica de ácidos fenólicos incrementa su lipofilicidad y su efecto protector contra dos tipos de estrés oxidativo: la peroxidación de LDL catalizada por Cu y el ataque radicalario a la membrana del eritrocito por AAPH (Sultana y col., 2005).

Los derivados con cisteína y cisteamina han mostrado mejor actividad antioxidante que la epicatequina, aunque sus efectos citotóxicos han sido más fuertes. Sin embargo, las concentraciones antioxidantes efectivas son más bajas que las concentraciones citotóxicas (los compuestos son antioxidantes a concentraciones no citotóxicas). Como era de esperar, los productos con mejor actividad antioxidante fueron también los más citotóxicos, especialmente debido al poder antioxidante proporcionado por el grupo galato de las moléculas, que es a su vez también, responsable del incremento en su citotoxicidad.

En base a los resultados de este estudio y de los realizados anteriormente por nuestro grupo, se ha observado que las células cancerígenas fueron más sensibles que las células normales a los efectos de inhibición de crecimiento ejercidos por la familia de conjugados de epicatequina (Lozano y col., 2005). Estos resultados coinciden con otros estudios basados en la comparación de la citotoxicidad de la epigallocatequina galato entre células normales y tumorales (Chen y col., 1997; Chen y col., 2003a). Se ha postulado que las células normales en potencial contacto frecuente con polifenoles derivados de las plantas, como células que se encuentran en la mucosa oral, han desarrollado cierta tolerancia para mitigar la citotoxicidad de estos compuestos, mientras que células normales de los órganos internos del cuerpo y las células tumorales son, en general, más sensibles a este efecto citotóxico (Yamamoto y col., 2004). El hecho que los derivados de Ec resultaron ser menos citotóxicos para las líneas celulares no tumorales que para las líneas celulares cancerígenas, permite plantear un potencial uso de estos

compuestos como agentes quimiopreventivos y de tratamiento contra el cáncer, sin correr el riesgo de dañar las células normales del organismo en su aplicación.

b. Fracciones de pino, uva y hamamelis

Las CI_{50} calculadas a partir de las curvas dosis respuesta para los diferentes períodos de incubación muestran que todas las fracciones presentaron cierto grado de toxicidad, especialmente después de 48 h de exposición (Figuras 3 y 4, Artículo 3 y página 701, Artículo 4).

Se encontró una elevada correlación entre la citotoxicidad y el grado de polimerización ($r= 0,968$ y $0,978$ para 72 h en HaCaT y 3T3, respectivamente) y el porcentaje de galoización ($r= 0,973$ y $0,966$ para HaCaT y 3T3 respectivamente) para las fracciones de uva. Es decir, las fracciones con un grado de polimerización y galoización más elevado (XIG y VIIIIG) ejercen el efecto tóxico más alto en los cultivos celulares. Estos resultados coinciden con los presentados por otros autores que también atribuyen el elevado nivel de citotoxicidad de algunos compuestos polifenólicos a estas dos propiedades (Matito y col., 2003; Schmidt y col., 2005).

Dado que la galoización es la principal diferencia entre las fracciones de pino, uva y hamamelis, estos resultados confirman la influencia de los grupos galato en la viabilidad celular y su papel en la regulación del ciclo celular. Estudios previos en células de melanoma han detectado efectos antiproliferativos y apoptóticos más fuertes en catequinas galoizadas que en las no galoizadas (Torres y col., 2002a; Lozano y col., 2005), pero en ciertos casos, especialmente en aplicaciones no relacionadas con fármacos anticancerígenos como la alimentación o la protección de la piel, es preferible utilizar compuestos que no alteren las funciones normales de las células.

Aunque todas las fracciones ensayadas en este estudio han presentado más citotoxicidad que la (-)-Epicatequina (Artículo 1), también han mostrado actividades antioxidantes a concentraciones no tóxicas para las células. Se ha encontrado una elevada correlación entre las actividades antioxidante y citotóxica para todas las fracciones y todas las condiciones de exposición. La mejor fracción antioxidante fue también la más citotóxica para las células. Para saber si podemos trabajar en un rango de concentraciones seguro con estas fracciones, se calculó la relación entre el índice de citotoxicidad (CI_{50}) a 72h en 3T3, que en general fue la condición en la que las fracciones presentaron más toxicidad, y el potencial antioxidante. Se encontró que las concentraciones antioxidantes eran aproximadamente de 1,3-2,5 veces menores que las concentraciones citotóxicas. Estos resultados nos indican que se puede obtener una actividad antioxidante efectiva de las mezclas de procianidinas en un rango de concentraciones no tóxico para las líneas celulares estudiadas. Esto es especialmente cierto para las fracciones de pino, que presentan una efectiva capacidad antioxidante con una baja citotoxicidad debido a la ausencia de grupos galato en su composición.

De las dos líneas celulares utilizadas para los ensayos de citotoxicidad, la línea 3T3 presentó una mayor sensibilidad a los efectos tóxicos ejercidos por los compuestos, obteniéndose en ella los valores de CI_{50} más bajos para todos los compuestos ensayados. Estas diferencias de sensibilidad de los fibroblastos 3T3 y

los queratinocitos humanos ya habían sido observadas previamente (Clothier y col., 1999), y están relacionadas con las diferencias morfológicas y fisiológicas que hay entre ellos, especialmente con las variaciones en la capacidad de enfrentarse al estrés oxidativo.

El concepto de antioxidante normalmente se relaciona al secuestro de radicales libres, ya que está ampliamente aceptado que la causa subyacente del daño celular es la producción de ROS, principalmente por el metabolismo mitocondrial y que los ROS son básicamente dañinos y deben eliminarse. Pero los ROS no son siempre perjudiciales. Primero, ROS como los RNS son agentes clave en la regulación de funciones celulares actuando como mensajeros secundarios en las cascadas de señalización intracelular (Alanko y col., 1999; Valko y col., 2007). Segundo, una generación moderada de ROS puede acabar produciendo un efecto antioxidante al fortalecer las defensas endógenas. Los polifenoles podrían, en parte, ejercer su actividad de una manera similar proporcionando ligeras cargas prooxidantes a través de reacciones de transferencia de electrones llevando a una formación moderada de ROS. El llamado efecto prooxidante de algunos polifenoles puede ser de hecho, la actividad antioxidante real. Los resultados presentados en este estudio con los compuestos fenólicos de hamamelis, pino y uva, junto a estudios preliminares (Torres y col., 2002b; Lizárraga y col., 2007), muestran que cuanto más alto es el porcentaje de grupos pirogalol en las mezclas, más alta es la potencia antiproliferativa en células epiteliales y mayor es la citotoxicidad en células no tumorales.

Actividad genotóxica de la Ec y sus tiol derivados en células 3T3

Resulta de gran interés identificar secuestradores de radicales libres o antioxidantes que inhiban el daño oxidativo del ADN y que eviten así fenómenos de mutagénesis y quizás cáncer (Fan y Lou, 2004). Uno de los pasos previos antes de investigar el potencial efecto protector de estos compuestos es comprobar la ausencia de daño sobre el ADN por ellos mismos. Es decir, es fundamental descartar posibles efectos genotóxicos y garantizar la seguridad de estos compuestos antioxidantes.

Se ha evaluado el potencial efecto genotóxico de una serie de derivados flavanólicos (Ec, Cys-Ec, Cys-EcG y Cys-EgcG) mediante la técnica del cometa, un tipo de electroforesis que permite determinar y analizar la rotura del ADN en células individuales.

De los compuestos ensayados se observó que la epicatequina, a concentraciones iguales o superiores a 1 mM, ya presentaba cierto efecto genotóxico y que la presencia de un activador metabólico, la Fracción S9, no modificaba significativamente el daño ejercido sobre el ADN (Figura 42), lo que nos indicaría que la posible metabolización de la epicatequina en nuestras condiciones de ensayo no repercutiría en sus características genotóxicas. Las concentraciones de Ec utilizadas en este ensayo están muy por encima de las posibles concentraciones fisiológicas, pero otros autores han demostrado efectos genotóxicos de la Epicatequina a concentraciones inferiores ($< 500 \mu\text{M}$) en otros tipos celulares (Savi y col., 2006), dato que respalda los resultados obtenidos en nuestros ensayos.

La Epicatequina a la concentración de 300 μM no presentó actividad genotóxica, mientras que los derivados con cisteína sí que mostraron cierta capacidad de dañar el ADN a esta concentración, aunque no de forma significativa en todos los casos (Figura 44). La relación estructura-capacidad genotóxica no queda muy clara en estos estudios. La presencia del grupo tiol parece ser la responsable del incremento del efecto tóxico de la epicatequina, ya que el daño en el ADN provocado por la Cys-Ec es superior al inducido por la Ec (Figura 45). Este efecto más pronunciado de los compuestos con cisteína podría estar relacionado con la mayor capacidad de penetración e interacción con las membranas celulares, que se ha visto que los grupos no flavonoides conferían a las catequinas (Alonso y col., 2004; Lázaro y col., 2007) y que permitiría un mayor acceso al material genético de la célula. La presencia de grupos galatos en las moléculas también parece ejercer cierto efecto en la actividad genotóxica, resultando el compuesto Cys-EgcG más dañino que el Cys-EcG. Este resultado podría explicarse por el efecto prooxidante que se ha atribuido al grupo pirogalol del anillo B presente en las galocatequinas que puede favorecer la producción del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y, por consiguiente, de peróxido de hidrógeno, muy reactivo con el ADN (Kondo y col., 1999a; Lozano y col., 2006)

El principal interés de estos estudios preliminares de genotoxicidad realizados con nuestros derivados flavanoides, ha sido proporcionar evidencias que compuestos con potencial antioxidante reconocido pueden actuar como prooxidantes. Pero, a pesar que los resultados obtenidos indican que estos compuestos polifenólicos pueden tener efectos tóxicos en nuestro sistema de ensayo, no significa que no puedan ser tratados como prometedoras sustancias antioxidantes y antimutagénicas. Además, existe la hipótesis que el efecto genotóxico podría ser una manera de ejercer un efecto antioxidante por parte de los compuestos flavonoides: inducir apoptosis y activación de enzimas reparadoras del daño del ADN por generación de ROS intracelulares y aumentar así el potencial antioxidante de la célula (Chen y col., 2003b).

Interacción de la Ec y sus derivados con la membrana del eritrocito

- Efectos sobre la fluidez de membrana

Se ha sugerido que las propiedades antioxidantes de las sustancias polifenólicas podrían residir en su habilidad para insertarse en las membranas celulares y modificar el orden de los lípidos y la fluidez (Suwalsky y col., 2006) y que la diferente localización de los flavonoides vendría determinada principalmente por sus propiedades químicas. Con el objetivo de profundizar en la relación de los flavanoles con la membrana celular del eritrocito, se estudió la interacción del flavanol epicatequina y varios de sus tiol conjugados con la membrana de los eritrocitos y su capacidad para prevenir o revertir las alteraciones de membrana causadas por dos agentes oxidantes, el AAPH y el H_2O_2 . Estos ensayos se realizaron únicamente con la Ec y algunos de sus tiol derivados (Cys-Ec, Cys-EcG, Cys-EgcG) dado que constituyen una puesta a punto y además, había poca disponibilidad del resto de compuestos.

Uno de los parámetros más importantes relacionados con la estructura y funcionalidad de la membrana celular es su fluidez. La determinación de la misma se hizo mediante anisotropía de fluorescencia, utilizando dos sondas fluorescentes que se sitúan en diferentes regiones de la bicapa, la DPH y la TMA-DPH (Figura 35).

Los dos agentes oxidantes incrementaron la rigidez de la membrana (incremento del valor de anisotropía); el efecto del AAPH estaría principalmente confinado a la porción exterior de la membrana y el del H₂O₂ lo estaría en el interior de la bicapa (Tabla 5). Este dato confirma las observaciones de Celedón y col., (2001) que indican que los radicales generados por el AAPH son efectivos promoviendo la oxidación de las proteínas de membrana y la lisis celular y tienen poca habilidad para entrar en el eritrocito. Por el contrario, el H₂O₂ presenta una elevada capacidad de difusión y penetra en la membrana de los eritrocitos y reacciona con los componentes más internos de las mismas (Lee y Jeong, 2007).

La Ec y sus derivados provocaron un descenso de la fluidez de la membrana tanto en la región externa como en la interna de la bicapa, lo que sugiere que la localización de los flavonoides en la membrana no se restringiría a una zona determinada, sino que abarcaría diferentes profundidades de la bicapa lipídica. El tratamiento conjunto de los eritrocitos con los agentes oxidantes y las moléculas de flavanoles produjo nuevamente un incremento de la rigidez de la membrana, tanto en el caso del AAPH como en el del H₂O₂, respecto a las células no tratadas. Sin embargo, no se observó ningún cambio significativo en los valores de anisotropía para ambas sondas al compararlos con los oxidantes solos.

Respecto al efecto de los compuestos polifenólicos sobre la fluidez de la membrana existe un debate abierto sobre los mecanismos de acción de estos compuestos. Hay autores que defienden que un incremento en la fluidez de membrana favorecería la capacidad antioxidante y las capacidades sequestradoras permitiendo una interacción más eficaz de las moléculas de antioxidantes con los radicales lipídicos (Lúcio y col., 2007) y llevaría a una menor propagación de la oxidación lipídica (Verstraeten y col., 2004). Pero otros trabajos sugieren que los flavonoides impondrían un mayor orden estructural y rigidez en la membrana reduciendo así la movilidad de los radicales libres en la bicapa lipídica y disminuyendo la tasa de propagación de las reacciones radicalarias (Arora y col., 2000).

Así, además de los mecanismos normalmente aceptados de acción antioxidante de los flavonoides como el secuestro de radicales libres y la quelación de metales, también se sugiere que estos compuestos tendrían la habilidad de situarse en las membranas celulares, modificar la fluidez y dificultar la difusión de radicales libres y disminuir la cinética de las reacciones de los radicales libres.

La Ec y sus tiol derivados provocaron una disminución de la fluidez de membrana de los eritrocitos por ellos mismos y no revertieron el incremento de rigidez que causaron los agentes oxidantes. Esta restricción de la fluidez podría dificultar la difusión de los radicales libres y disminuir la propagación de sus reacciones. El efecto protector de los flavonoides estaría relacionado con el número de grupos hidroxilo en la molécula que facilitarían las interacciones de los flavonoides con la superficie de la membrana mediante la formación de puentes de hidrógeno con los grupos de cabeza polar de los lípidos, manteniendo así la integridad de las

membranas y evitando el acceso de moléculas hidrofóbicas, incluyendo las que afectan a la fluidez o inducen daños en los componentes celulares.

- Cambios en la morfología de los eritrocitos

El daño oxidativo que sufren los eritrocitos incluye cambios en las proteínas de membrana y en la estructura de los lípidos, que a su vez pueden inducir alteraciones en la superficie externa de las células.

El efecto de los sistemas generadores de radicales de oxígeno y de la Ec y sus derivados sobre la morfología de los eritrocitos se ha investigado estudiando los cambios de forma de estas células por microscopía electrónica de barrido (SEM). Se pudo observar como los agentes oxidantes provocaban la aparición de formas anormales, principalmente formas crenadas o equinocitos, caracterizadas por la pérdida de la forma normal de discocito y la presencia de espículas y protuberancias en su superficie (Figura 36). Estas alteraciones son consistentes con los datos de otros autores (Ajila y Prasada Rao, 2008; Singh y Rajini, 2008; Sato y col., 1995). La formación de múltiples protuberancias en la membrana plasmática se considera una señal inicial de daño oxidativo de la célula y, si estas elongaciones se extienden, pueden acabar rompiendo la membrana y liberando los componentes intracelulares. La peroxidación lipídica de la membrana y el daño en las proteínas del citoesqueleto se consideran factores importantes en la formación de estas protuberancias (Singh y Rajini, 2008).

La Ec y sus derivados Cys-Ec y Cys-EcG también provocaron por si mismos alteraciones en la membrana de los eritrocitos incrementando la proporción de formas espiculadas y aplanadas (leptocitos) respecto a las células control. Los tiol derivados alteraron en mayor grado la forma normal de los eritrocitos, aunque no de forma relevante. Estos resultados preliminares indicarían que existe una interacción entre estos derivados flavonoides y la membrana de los eritrocitos que lleva a una modificación de las características morfológicas de estas membranas. No obstante, en nuestras condiciones experimentales, la Ec y sus derivados Cys-Ec y Cys-EcG, no consiguieron revertir de forma significativa las alteraciones morfológicas inducidas por el AAPH y el H₂O₂, a pesar de que hay estudios que constatan la capacidad de ciertos compuestos de naturaleza polifenólica para prevenir los cambios morfológicos inducidos por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (Ajila y Prasada Rao, 2008; Grinberg y col., 1997). De acuerdo con la hipótesis de la bicapa lipídica (Sheetz y Singer, 1974; Lim y col., 2002), el hecho de que las moléculas de flavonoides induzcan la aparición de equinocitos indicaría que estos compuestos se localizarían principalmente en la monocapa más externa de la membrana de los eritrocitos. Además, se ha demostrado que estos compuestos efectivamente causan cierta perturbación en el orden de los lípidos de la membrana disminuyendo su fluidez, como se ha visto en los ensayos de fluidez de membrana.

- Oxidación de las proteínas de membrana de los RBC

La bicapa lipídica de la membrana de los eritrocitos está anclada a una red de proteínas esqueléticas a través de proteínas transmembrana. La Banda 3, la principal proteína integral de membrana, interacciona con este citoesqueleto que mayoritariamente incluye espectrina, actina, anquirina y proteína 4.1. Esta red

proteica en la superficie más interna de la membrana plasmática es la responsable de mantener la forma, estabilidad y deformidad de los eritrocitos (Vittori y col., 2002), por lo tanto se puede establecer una estrecha relación entre la organización de la membrana y la forma celular. Entre algunas de las alteraciones en las membranas de los eritrocitos que producen los agentes oxidantes, encontramos una disminución del contenido de proteínas del citoesqueleto y una producción de proteínas de elevado peso molecular. Estas alteraciones pueden desencadenar anomalías en la forma del eritrocito. Las alteraciones en el patrón de proteínas de membrana producidas por los compuestos oxidantes y la Ec y sus derivados se observaron mediante electroforesis SDS-PAGE.

El tratamiento de los eritrocitos con AAPH parece que provocó un cambio en el patrón de bandas, sobre todo en la zona donde se localizaría la proteína banda 3 (Figura 38, carril 7). Las co-incubaciones de los oxidantes con los compuestos fenólicos (Ec, Cys-Ec, Figura 38, carriles 2 y 3) no mostraron una recuperación de bandas respecto a la incubación con el agente oxidante solo, por lo que en nuestras condiciones de ensayo no podemos concluir que estos compuestos protejan la membrana del eritrocito del daño oxidativo infringido por el AAPH.

Por su parte, el tratamiento de los eritrocitos con el H_2O_2 (Figura 39, carril 7) produjo una desorganización total del patrón de proteínas respecto a las células no tratadas (carril 8) observándose la formación de proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, la adición de los derivados de Ec (Figura 39, carriles 2 y 3) no evitó esta desestructuración, por lo que no se puede establecer una acción protectora de estos compuestos contra la degradación de las proteínas de membrana inducida por el H_2O_2 . Por otro lado, el patrón de bandas normal de los eritrocitos no se vio afectado al tratar las células sólo con los flavonoides (carriles 4 y 6), observación que coincide con trabajos previos de otros autores (Singh y Rajini, 2008). Así, la Ec y los derivados con cisteína ensayados en este estudio no modificarían el patrón de proteínas de los eritrocitos por sí mismos, pero tampoco protegerían contra la degradación de las proteínas de membrana inducida por el AAPH y el H_2O_2 en nuestras condiciones experimentales. En estos estudios preliminares tampoco hemos podido establecer un comportamiento diferente de los derivados de Ec relacionado con su diferente estructura, es decir, la presencia del grupo tiol (cisteína) y el diferente contenido en grupos galato.

Los radicales libres atacan a los componentes de las membranas de los eritrocitos, especialmente a los lípidos y proteínas, causando cambios en la estructura y función de las membranas. Numerosos compuestos de naturaleza polifenólica han sido propuestos como agentes antioxidantes capaces de prevenir, evitar o disminuir este daño oxidativo sobre las membranas (Tedesco y col., 2001). En nuestros estudios con la Ec y sus tiol conjugados hemos visto que estos compuestos actuaban modificando la fluidez de membrana y la morfología de los eritrocitos, pero no hemos observado que alteraran el patrón proteico de las membranas. Numerosos trabajos defienden que, aparte de su reactividad hacia los radicales libres, las interacciones de los flavonoides con las bicapas lipídicas podrían contribuir a determinar su capacidad antioxidante y ser un mecanismo relevante en su protección contra la oxidación de la membrana (Verstraeten y col., 2004; Singh y Rajini, 2008) y contra la pérdida de integridad debida a agentes perjudiciales externos (Lúcio y col., 2007). Los flavonoides podrían estabilizar la membrana localizándose sobre todo en la interfase acuosa-lipídica de las membranas y su

localización y las restricciones en la fluidez, podrían dificultar la difusión de los agentes oxidantes y de los propios radicales y evitar así sus efectos dañinos (Suwalsky y col., 2006).

Resumen

Una de las características que hacen más interesantes al grupo de sustancias polifenólicas es su capacidad de actuar al mismo tiempo como agentes secuestradores de radicales/agentes antioxidantes y como agentes formadores de ROS. Numerosos estudios han mostrado esta dualidad de acción de los polifenoles (Fan y Lou, 2004) y los compuestos considerados en este trabajo han confirmado este comportamiento. El hecho de que los bioflavonoides actúen de una forma u otra dependerá de varios factores como las concentraciones ensayadas (Cemeli y col., 2008) y del sistema biológico o línea celular que se esté utilizando.

El hecho que tanto los derivados de epicatequina como las diversas fracciones polifenólicas provocaran un descenso de la viabilidad en los ensayos de citotoxicidad en las líneas celulares no tumorales, confirma este comportamiento prooxidante de los polifenoles (Tabla 2, Artículo 1) (Figuras 3 y 4, Artículo 3). El efecto prooxidante se vio confirmado en los ensayos de protección frente daño oxidativo causado por el H₂O₂.

La observación que compuestos con altos porcentajes de galoización en su estructura química presenten efectos prooxidantes en las células no es necesariamente excluyente para que puedan ser considerados potenciales agentes antioxidantes, especialmente quimiopreventivos. Es probable que los elevados porcentajes de galoización sean uno de los factores por los cuales muchos de los compuestos de naturaleza polifenólica ejercen su efecto protector estimulando mecanismos primarios de defensa celular, como la biotransformación de xenobióticos o la estimulación de la maquinaria endógena antioxidante de la célula. Además, los polifenoles parecen estar también involucrados en desencadenar mecanismos de muerte celular, ya que provocan arresto del ciclo celular y/o inducción de apoptosis.

Los resultados indican que se puede obtener una actividad antioxidante efectiva con los derivados de Ec y de las fracciones polifenólicas en un rango de concentraciones que es seguro para las células normales. Un mejor conocimiento de las propiedades antioxidantes en sistemas biológicos contribuye al desarrollo de compuestos con propiedades mejoradas y a la ampliación de su rango de aplicaciones.