

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA 

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Actividad neuroprotectora de antocianidinas y leguminosas
crudas y procesadas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana del Castañar López Cid

Directoras

**Teresa Ortega Hernández-Agero
M^a Emilia Carretero Accame**

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE
ANTOCIANIDINAS Y LEGUMINOSAS
CRUDAS Y PROCESADAS.**

TESIS DOCTORAL

ANA DEL CASTAÑAR LÓPEZ CID

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Actividad neuroprotectora de antocianidinas
y leguminosas crudas y procesadas.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana del Castañar López Cid

Directoras

Teresa Ortega Hernández-Agero
M^a Emilia Carretero Accame

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Dra. Dña. Teresa Ortega Hernández-Agero, profesora titular, y Dra. Dña. M^a Emila Carretero Accame, profesora emérita Complutense, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis doctoral presentada por Dña. Ana del Castañar López Cid, titulada “Actividad neuroprotectora de antocianidinas y leguminosas crudas y procesadas”, ha sido realizada bajo nuestra inmediata dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Madrid, 20 de Abril de 2015

Teresa Ortega Hernández-Agero

M^a Emilia Carretero Accame

Parte de los estudios realizados en la presente tesis se desarrollaron en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense gracias a un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Ref. AGL-2008-05673-C02-01) cuyo título es “Evaluación de la actividad biológica de componentes bioactivos, como criterios calidad de leguminosas crudas y procesadas”.



La vida no es un pasillo recto, fácil y sin obstáculos por el que viajamos con libertad, sino un laberinto de recovecos en el que debemos hallar nuestro camino, perdidos y confusos atrapados de vez en cuando en un callejón sin salida.

Pero si mantenemos la fe, siempre acabará abriéndose una puerta ante nosotros, tal vez una que jamás hubiéramos imaginado, pero que demostrará ser conveniente para nosotros.

A.J. Cronin

A mis hijos, a mi marido

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al terminar mi carrera de Farmacia, dediqué unos años a mi desarrollo profesional como farmacéutica en diferentes ámbitos de la profesión. Después todo cambió y decidí dedicar unos años a mi familia. Cuando mis hijos iniciaron su etapa escolar, “ese gusanillo” que llevo dentro, que me impulsó a estudiar la carrera de Farmacia, resurgió de nuevo, embarcándome en este periplo de Tesis Doctoral. Hacía años que había salido de la Facultad de Farmacia y el empezar de nuevo resultó difícil, pero con ilusión, todo se hace más llevadero.

Hace ahora seis años que me embarqué en este reto. Dos años invertí en realizar mi master en farmacología y cuatro en realizar la presente tesis doctoral.

En primer lugar agradecer al Departamento de Farmacología y en particular a su directora la Doctora Paulina Bermejo por acogerme en el departamento y por mostrarse siempre dispuesta a ayudar.

Gracias mil, a mis queridas directoras de tesis, la Doctora M^a Emilia Carretero y Teresa Ortega, por confiar en mi hace seis años. Siempre escuchando y apoyando no sólo en el ámbito profesional, sino también en el personal. Sin su ayuda y apoyo no hubiera sido posible iniciar este largo camino, del que ahora vemos los resultados.

Agradecer a la Doctora Pilar Gómez-Serranillos su interés y colaboración.

Gracias a la Doctora Olga Palomino por su ayuda en el uso del HPLC y codirección en el trabajo de master; gracias por tu cariño.

También me gustaría agradecer al equipo de investigación del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, por facilitar parte de las muestras utilizadas en este trabajo, así como su colaboración en algunas de las investigaciones de esta tesis doctoral.

Muchísimas gracias al resto de profesorado del departamento, que siempre me han ayudado cuando lo he necesitado, en especial agradecer al Doctor José M^a Vivas sus enseñanzas en el ámbito de la docencia.

Muchas gracias a todos los compañeros y personal de la Facultad de Farmacia de la UCM, en particular, a mis compañeras Elena y María que siempre me han ayudado y escuchado durante estos años. A Manal, que aunque llegó hace solo tres años, siempre ha estado a mi lado animando y escuchando, a Carlos por su constante ayuda.

A Estefanía, Natalia, Irene, Karim, Andrea, Vanesa, los dos Tarek, Juanky, Miguel, Arturo, Laura, Jorge... por los buenos ratos dentro y fuera de la Facultad. En especial agradecer a Alba su ayuda cuando algunos experimentos se tornaron “negros” y parecían no tener sentido.

No querría olvidarme y dejar de mencionar la ayuda prestada por otros profesores de la Facultad de Farmacia. De entre todos ellos agradecer con cariño a la Doctora Pilar González del departamento de Bioquímica por su ayuda desinteresada y su capacidad de transmitir ilusión y amor por la Ciencia.

Agradecer a “mi Rosa”, siempre atenta a cuanto pudiera necesitar para el laboratorio. Gracias también por escuchar.

A Nieves, Azucena y Jesús por hacer amenos los días de trabajo.

Mis padres han sido siempre un modelo de lucha y tesón. Gracias por enseñarme, apoyarme y estar siempre ahí. -Papá, ¡me voy a doctorar a la misma edad que tú!, quien lo habría dicho!

Por último, gracias a mi marido, que aunque no ha entendido nunca por qué hacer una tesis doctoral, me ha apoyado siempre y “soportado mis malos humores y malos ratos”. Gracias a mis hijos, aunque no entendían muy bien lo que hacía (pensaban que estaba en mi colegio), siempre estaban ahí. Mis objetivos para con ellos en este trabajo fueron, dar ejemplo y aprender dos premisas:

“Lo que se empieza, se acaba”

“El saber no ocupa lugar”

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	15
1. PROCESOS OXIDATIVOS Y SALUD.....	18
1.1.Radicales Libres (RL) y Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	18
1.2.Mecanismos de defensa antioxidante.....	22
1.2.1. Enzimas Extranucleares.....	22
1.2.2. Enzimas Intranucleares.....	24
1.2.3. Compuestos extracelulares e intracelulares.....	24
1.2.4. Proteínas transportadoras.....	25
1.3.Daño Oxidativo.....	25
2. NEURODEGENERACIÓN.....	28
3. ASTROCITOS: FUNCIONES FISIOLÓGICAS EN EL SNC.....	35
4. LOS ALIMENTOS EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO: LAS LEGUMBRES Y SUS PROCESADOS.....	38
5. POLIFENOLES Y PREVENCIÓN DE LA OXIDACIÓN.....	42
6. ANTOCIANOS.....	45
6.1. Características Químicas.....	45
6.2. Actividades Farmacológicas.....	47
6.2.1. Actividad Neuroprotectora.....	48
6.2.1.1 Ensayos <i>in vitro</i>	49
6.2.1.2 Ensayos <i>in vivo</i>	51
6.2.1.3 Ensayos clínicos.....	53
6.2.2. Actividad cardiovascular.....	54
6.2.3. Otras Actividades.....	55
6.3. Estudios Farmacocinéticos.....	55
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS.....	67
2. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	68
3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN FENOLES TOTALES.....	70
4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	71
4.1. Estudio de la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC).....	71
4.2. Determinación del radical DPPH.....	72
5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	74
5.1. Cultivos celulares.....	74
5.2. Preparación de las muestras.....	77
5.3. Determinación de la viabilidad celular mediante la técnica del MTT.....	77
5.4. Evaluación del daño celular.....	78

5.5. Medida de la generación intracelular de ROS	78
5.6. Estudio de la morfología celular	79
5.7. Preparación de extractos citosólicos.....	79
5.8. Determinación de proteínas (Método del ácido bicínico).....	80
5.9. Valoración del enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	81
5.10. Determinación de la peroxidación lipídica.....	82
5.10.1. Ensayo de TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico).....	82
5.10.2. Determinación de MDA por HPLC.....	83
5.11. Determinación de actividades enzimáticas.....	83
5.11.1. Determinación de la actividad del enzima catalasa (CAT).....	83
5.11.2. Determinación de la actividad del enzima superóxido dismutasa (SOD).....	84
5.11.3. Determinación de la actividad del enzima glutathion reductasa (GR).....	85
5.11.4. Determinación de la actividad del enzima glutathion peroxidasa (GPx).....	86
5.11.5. Determinación de la actividad del enzima NADPH quinona reductasa (NQO1).....	88
5.12. Determinación de glutatión.....	89
5.13. Determinación de las actividades caspasa 3, 8 y 9.....	90
5.14. Determinación de nitritos.....	92
5.15. Modelo de parkinsonismo inducido por MPTP.....	94
6. Análisis estadístico.....	94
7. Aparatos utilizados y consumibles.....	95
RESULTADOS	97
1. LEGUMINOSAS.....	99
1.1. Identificación y cuantificación de componentes fenólicos de leguminosas crudas y procesadas.....	99
1.1.1. Judías de Tolosa (<i>Phaseolus vulgaris</i> L cv. Tolosana)..	99
1.1.2. Lenteja de la Armuña (<i>Lens culinaris</i> Medik cv. Rubia de la Armuña).....	104
1.2. Determinación del contenido total en polifenoles de semillas de leguminosas crudas y procesadas.....	108
1.3. Evaluación de la capacidad captadora de radicales libres peroxilo (ORAC) de extractos de leguminosas crudas y procesadas.....	108
1.4. Medida de la actividad captadora del radical difenil picril hidracilo (DPPH) de extractos de leguminosas crudas y procesadas.....	110
1.5. Determinación de la actividad neuroprotectora de extractos de semillas de leguminosas crudas y procesadas.....	111
1.5.1. Evaluación de los efectos sobre la viabilidad celular...	111
1.5.2. Determinación de la viabilidad celular frente al daño oxidativo inducido por el reactivo de Fenton.....	114
1.6. Evaluación de los efectos de extractos de semillas de leguminosas crudas y procesadas en la generación intracelular de ROS	117

2. ANTOCIANIDINAS.....	119
2.1. Evaluación del efecto inducido por las antocianidinas sobre la morfología de astrocitos.....	119
2.2. Medida de la actividad captadora del radical difenil picril hidracilo (DPPH).....	122
2.3. Determinación del efecto sobre la viabilidad celular en presencia o ausencia de daño oxidativo.....	123
2.4. Efecto del tratamiento de astrocitos con antocianidinas sobre la generación intracelular de ROS.....	126
2.5. Efecto de las antocianidinas sobre los marcadores de citotoxicidad celular.....	127
2.5.1. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH).....	127
2.5.2. Determinación de los efectos sobre la peroxidación lipídica (TBARS).....	129
2.5.3. Determinación cromatográfica (HPLC) de las concentraciones de MDA inducidas por el tratamiento con antocianidinas..	130
2.6. Evaluación de los efectos de antocianidinas sobre los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante.....	133
2.6.1. Actividad catalasa (CAT).....	133
2.6.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD).....	134
2.6.3. Actividad glutatión reductasa (GR).....	136
2.6.4. Actividad glutatión peroxidasa (GPX).....	137
2.6.5. Actividad NADPH quinona reductasa (NQO1).....	138
2.7. Determinación de glutatión. Índice redox (IR).....	140
2.8. Determinación de actividades caspasa 3, 8 y 9.....	142
2.9. Efecto de las antocianidinas en la liberación de nitritos.....	146
2.10. Evaluación de los efectos de antocianidinas sobre la viabilidad celular inducida por MPTP.....	147
DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173
PUBLICACIONES	197

ABREVIATURAS

ABC transportador ATP *binding cassette*

Ach acetilcolina

ADN ácido desoxirribonucleico

Akt proteín cinasa B no específica

AMPK activación de la proteín cinasa AMP

API ionización a presión atmosférica

Apo E apolipoproteína E

APPH 2,2'-Azobis(2-dihidro cloro metilpropionamida)

APx ascorbato peroxidasa

ASK1 cinasa reguladora de apoptosis 1

ATP adenosín trifosfato

AUC área bajo la curva

BCRP proteína de resistencia al cáncer de mama

BHE barrera hematoencefálica

BHT butil hidroxitolueno

CaMK II y CaMK IV calmodulinas cinasas

CAT catalasa

Cmax concentración máxima

COMT catecol o-metil transferasa

COX-2 ciclooxigenasa tipo 2

CSF análisis del fluido cerebroespinal

Cys cisteína

DCF diclorofluoresceína fluorescente

DCFH diclorofluoresceína desacetilada

DCFH-DA diclorofluoresceína diacetato

DMEM Dulbecco`s Modified Eagle Medium

DMSO dimetilsulfóxido

DTT ditioneitol

EA enfermedad de Alzheimer

EDTA ácido etilen diamino tetra acético

EFSA Agencia Europea de Seguridad Alimentaria

EGCG galato de epigallocatequina

ELA esclerosis lateral amiotrófica

EMA	Agencia Europea del Medicamento
EM	esclerosis múltiple
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
EP	enfermedad de Parkinson
ERK	cinasa regulada por señales extracelulares
ESI	ionización por electroespray
FBS	suero fetal bovino
FCN	factor de crecimiento neuronal
FDG-PET	tomografía por emisión de positrones
FLA₂	fosfolipasa A ₂
GAE	equivalentes de ácido gálico
Gly	glicina
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
GSK 3β	glucógeno sintasa cinasa 3 β
GSSG	glutación oxidado
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperacina N'-2'-etanosulfónico
HO-1	hemo oxigenasa 1
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-PAD	cromatografía líquida de alta resolución- detector fotodiodo
IFNγ	interferón γ
IL1β	interleukina 1 β
IL3	interleukina 3
IL6	interleukina 6
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IR	índice redox
JB	judías cocidas
JC	judías crudas
JG	judías germinadas
LOO\cdot	radical peroxilo
LB	lentejas cocidas
LC	lentejas crudas

LDH	lactato deshidrogenasa
LG	lentejas germinadas
LO[·]	radical alcoxilo
LOO[·]	radical peroxilo
LOOH	lipoperóxidos
LPS	lipopolisacáridos
LSD	diferencia mínima significativa
m/z	masa/carga
MAO-B	monoamino oxidasa B
MAO-A	monoamino oxidasa A
MAPK	proteín cinasa activada por mitógenos
MDA	malondialdehido
MDR-1	glicoproteína resistente a multiples drogas
MEK 1/ 2	protein cinasa activada por mitógeno 1/ 2
MPP⁺	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina oxidada
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
MRI	resonancia magnética por imágenes
MS	espectroscopía de masas
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NADP⁺	nicotinamida dinucleótido fosfato en forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida
NEM	N-etilmaleimida
Nfr2	factor nuclear eritroide 2
NFκB	factor nuclear κ B
NMDA	receptores de glutamato N-metil-D- aspartato
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductasa
O₂^{·-}	radical superóxido
ONOO⁻	anión peroxinitrito
ONOOH	ácido peroxinitroso

OPT fluoróforo o-ptaldehido
ORAC capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno
p38 proteína activada por mitógeno p38
PBS tampón fosfato salino
PFN polifenoles
PI3K fosfatidil inositol 3 quinasa
Pmsf fluoruro de fenilmetanosulfonio
RCS especie reactiva de cobre
RL radical libre
RNS especie reactiva de nitrógeno
ROS especies reactivas de oxígeno
SGLT1 glucotransportador sodio dependiente 1
SNC sistema nervioso central
SOD superóxido dismutasa
TBA ácido tiobarbitúrico
TBARS sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA ácido tricloroacético
TGF β factor de crecimiento transformante β
Tmax tiempo máximo
TNF α factor de necrosis tumoral α
TRIS tris (hidroximetil) aminometano
U373 MG células tumorales benignas de astrocitoma humano
UAF unidad arbitraria de fluorescencia

ABSTRACT

The increase in life expectancy within population in developed countries, leads an increase of neurodegenerative diseases prevalence, like Parkinson disease (PD) or Alzheimer disease (AD), which will significantly raise health-care expenditures.

An appealing possibility to control these diseases would be to slow down disease progression or try to early identification of the symptoms related to the disease.

Although the causes of these diseases are not completely known, it is proposed that neuronal decline progression could be triggered by several factors, like neuroinflammation, glutaminergic excitotoxicity, an increase of iron concentration, and/or endogenous antioxidants depletion.

Human body maintains a redox balance constantly, between pro-oxidants from normal cell metabolism and antioxidant defense systems. The loss of this redox balance leads to oxidative stress, characterized by a free radical and reactive species increase.

Astrocytes protect neurons against oxidative stress, due to their high concentration of low molecular weight antioxidants (ascorbic acid, glutathione and tocopherol) and antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and peroxidase). Due to its function on Central Nervous System, astrocytes are cells widely used in antioxidant and anti-inflammatory studies of natural products. Due to these properties, astrocytes are widely used in antioxidant and antiinflammatory studies of natural products. Human U373 astrocyte cell line was used in the current study.

Living things are constantly submitted to external or internal stimuli that cause stress, for that reason, in recent years many researches are looking for natural compounds that are able to prevent, reduce or reverted oxidative stress.

A natural way to fight against this oxidative stress would be the use of food, because they contain a wide range of natural compounds with great antioxidant activity, such those with polyphenolic structures. The antioxidant activity of polyphenols is related to the presence and position of free phenolic hydroxyls groups.

Recent studies have shown that pulses nourish and besides may be useful to prevent and treat diseases such as neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. Pulses are along with vegetables and wine, the base of Mediterranean Diet. In Spain, the most commonly consumed legume seeds are lentils (*Lens culinaris* Medik.), beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas. It has been shown that they have many phenolic compounds within their composition.

The richness and composition of phenolic compounds are related to pulses antioxidant capacity, although, such capacity does not always maintain constantly during seed processing, specially during cooking and germination, which are the most common processes used on food consumption.

The antioxidant activity and potential benefits of polyphenolic compounds, especially flavonoids, in the prevention and treatment of oxidative stress related diseases, such as

neurodegenerative, cardiovascular and antiinflammatory diseases, has been reported. Several published studies show the cardiovascular, anticancer, and antidiabetic properties of anthocyanins.

Several ongoing works refer the efficacy of polyphenols and especially anthocyanins, on mental and neurodegenerative disorders, probably due to interaction with different signaling cascades in existing neurons. In addition, they are able to react mainly with ROS and pro-inflammatory agents generated in brain during normal and aging metabolism.

Based on these findings, anthocyanins can be proposed as potential candidates for prevention and treatment of neurodegenerative diseases. Their utility and effectiveness on prevention of aging processes called into question the ability of these compounds to reach the target organ/tissue.

The most abundant anthocyanidins found in vegetals are cyanidin, pelargonidin, malvidin, delphinidin, peonidin and petunidin. These phenolic compounds are susceptible of oxidation, giving rise to a phenoxy radical, which is stabilized by resonance; this property assures the antioxidant and free-radical scavenger activities.

Anthocyanins principal therapeutic uses are, as yet, limited to treat symptoms linked to capillary fragility and to preserve their beneficial properties to sight. Because it has been clearly show that anthocyanidins are able to cross blood brain barrier, there are many ongoing works referring to these compounds.

For these reasons, we consider the following doctoral dissertation:

- To analyze differences on phenolic composition of raw and processed dark bean's (*Phaseolus vulgaris* L. cv Tolosana) and lentil's (*Lens culinaris* Medik cv. Rubia de la Armuña) seeds.
- To assess neuroprotective and antioxidant activities of raw, cooked and germinated legume seeds, in order to analyze processing influence.
- To assess the pharmacologic activity and the neuroprotective mechanism of action of three anthocyanidins found on studied legumes: cyanidin, malvidin and pelargonidin.

RESULTS

For beans, several polyphenolic compounds were detected on raw and processed seeds: procyanidins, phenolic acids (aldaric derivatives of *p*-coumaric, ferulic and synaptic acids), flavonols (myricetin, quercetin and kaempferol derivatives), flavones (apigenin derivatives), flavanones (naringenin and hesperetin derivatives), isoflavones (genistein, daidzein, biochanin A and B derivatives) and anthocyanins (derivatives of delphinidin, cyanidin, malvidin, pelargonidin and petunidin). Presence and concentration of each compound changed among processing.

During boiling process, anthocyanin concentration decreased while, similar content was found for germinated and raw samples. Malvidin and petunidin were only found in germinated beans. Isoflavones concentration was higher in germinated than raw and boiled samples. However, flavones concentration decreased during processing.

For lentils, many polyphenolic compounds were also identified: procyanidins and prodelphinidins dimers and trimers; kaempferol, quercetin and their derivatives, luteolin and its derivatives, catechin heteroside and free phenolic acids (*trans p*-coumaric and protocatechuic acids) as well as their derivatives. Raw lentils contain procyanidin dimers and trimers, prodelphinidin dimers and digallate procyanidin as the most abundant compounds. This amount was significantly reduced after boiling, and during germination. Referring to the flavones group, free luteolin and its mono-, di- and tri-heterosides were identified, the last ones being found in higher concentrations. Processing decreased this concentration; however, free luteolin was identified in higher concentration in boiled and germinated lentils, while no free luteolin was detected in raw lentils.

Kaempferol derivatives with different glycosylation degree have been identified in non-processed lentils (tetraglycosylated kaempferol); processing seemed to decrease this concentration. Other tri and di-glycosylated derivatives were detected in higher concentration in processed than in raw lentils.

Quercetin derivatives and phenolic acids, were detected in low concentrations in lentils, except for *trans p*-coumaric acid, which concentration increased during boiling (but were not found after germination), and *p*-coumaric acid, which was found only in germinated lentils.

In relation to total phenolic content, significantly differences were detected among raw and processed seeds. Phenol content was higher in non-processed legumes, and between legumes, beans shown the highest phenolic content. After evaluation of antioxidant activity by ORAC and DPPH assays, processing of legumes has a negative influence on free radical scavenging capacity.

At the beginning, injure was assessed over astrocyte cell line U- 373 when treated with Fenton's reagent (H_2O_2 1mM/ SO_4Fe 0,5mM), furthermore, cell morphology and different oxidative markers were changed.

In other to evaluate neuroprotective activity, no intrinsic toxicity was found for every legume. On an injure astrocyte model induced by Fenton reagent (FeSO_4 0.5mM/ H_2O_2 1mM), raw and boiled beans shown higher neuroprotective effect than germinated ones. The same effect was observed on lentils. Within legumes, lentils have shown higher viability than beans.

When intracellular ROS generation was evaluated, raw and processed lentil and beans exhibited a decrease on astrocyte ROS generation induced by Fenton reagent. In this assay, no significant differences were found among legumes.

Correlation study between different beans compounds and antioxidant activity have shown as that higher antioxidant activity was related to anthocyanin presence, while lentil antioxidant activity were related to procyanidin and luteolin composition.

Consequently we decided to assess antioxidant capacity of three anthocyanidins very abundant in nature (cyanidin, malvidin and pelargonidin) and founded on studied Tolosa beans. DPPH method was applied. Anthocyanidins displayed an antioxidant activity as strong as trolox (vitamin E analogous), used as a positive control. Cyanidin showed higher antioxidant activity than malvidin in the present assay.

On biological activity studies it was found that anthocyanidins were no toxic for astrocytes. Moreover, under oxidative injury induce by Fenton's reagent, every compound at the studied concentrations, reduced oxidative damage and diminish ROS generation induced by the toxic. These results were confirmed by a morphological change improvement of cultivate astrocytes damaged by Fenton reagent.

In order to establish anthocyanidin effects on cytotoxicity markers, it was observed that anthocyanidins significantly decrease lactic dehydrogenase (LDH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and malondialdehyde (MDA) release induced by Fenton reagent.

Assessing anthocyanidins activity over enzymatic antioxidant defense systems, it was observed that although everyone exhibit positive activity on these system, the way in which these anthocyanidins acted over enzymatic activities were different, probably due to their chemical structure. Furthermore, cyanidin improve superoxide dismutase, glutathione reductase and peroxidase activities (GPx) as well as reduced/oxidize glutathione ratio. However, malvidin showed an enzymatic activity similar to cyanidin and indeed a NADPH quinone oxidoreductase 1 activity (NQO1). Pelargonidin showed similar mechanism as cyanidin and malvidin, although it had no GPx activity, but the highest NQO1 activity.

On a 500 μ M hydrogen peroxide astrocyte injure model, anthocyanidins were able to prevent apoptosis, because they reduced caspase 3 activity levels, also, it was confirmed that hydrogen peroxide apoptosis activation was initiated by caspase extrinsic pathway, and anthocyanidins were capable to reduced such activation. This confirmation was assumed by an increase of caspase 8 activity, while caspase 9 activity (intrinsic pathway) was not significant.

Every studied anthocyanidins, where similarly able to prevent nitrite release induce by interferon γ (IF- γ , 160U).

Taking in account the positive effects obtained for anthocyanidins, in the studied antioxidant model, the effect of these isolated compounds on hemiparkinsonian model was assessed. Hemiparkinsonism was induced with 1 mM MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine) to astrocytes culture which were previously treated with anthocyanidins (cyanidin, malvidin and pelargonidin). Results confirmed anthocyanidins partially protected MPTP induced injury.

CONCLUSIONS

1. Raw and processed legumes have a high polyphenol concentration. There are qualitative and quantitative differences within them. The greatest compounds in raw beans are anthocyanins, while proanthocyanidins are the principal in lentils.

- Boiling, leads to an increase on hydrolysis compounds, while germination produces new compounds generated by different enzymatic processes.
2. Legumes have a noticeable antioxidant activity, shown by DPPH and ORAC assays. Furthermore, they are able to reduce oxidative stress *in vitro* induce by Fenton reagent. They increase cell viability and decrease free radical release induced by Fenton.
 3. Correlation studies show that anthocyanins are one of the polyphenol compounds that take part on antioxidant activity. Due to this results, we decided to start studying anthocyanidin biological activity:
 - 3.1. Cyanidin, malvidin and pelargonidin improve morphological changes induce by Fenton reagent.
 - 3.2. They show similar antioxidant activity than trolox (positive control). Cyanidin exhibits about seven times higher antioxidant activity than positive control.
 - 3.3. These compounds prevent cellular viability decrease induced by toxic agent.
 - 3.4. Additionally, reduce free radical release induce by Fenton.
 - 3.5. The anthocyanidins studies decrease cytotoxicity markers (LDH, TBARS and MDA release).
 - 3.6. They have no catalase activity, while improve other enzymatic activities (SOD, GR, GPx and NQO1) as well as redox index, reduced by Fenton reagent.
 - 3.7. These anthocyanidins reduce apoptosis induced by hydrogen peroxide (500 μ M) via extrinsic pathway.
 - 3.8. In addition, they significantly reduce nitrite release induced by IF- γ .
 - 3.9. On hemiparkinsonian model, studied anthocyanidins increase cell viability reduced by MPTP (1mM).

Legumes are one of the most important foods on *Mediterranean Diet*, due to their high nutritional value. Our results show benefits for some CNS cells survival. We consider that an increase on animal and human studies should be performed. In addition, we propose more researches on the design of new processes, in order to reduce negative processing effects shown on phenolic composition. Also, new legumes varieties and cultivars with high anthocyanins concentration should be searched and used.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida en la población nos hace pensar que, en unos años, se producirá una expansión de la población envejecida y por tanto, se incrementará la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, como la enfermedad de Parkinson (EP) y la de Alzheimer (EA), lo que supondrá un incremento considerable en los gastos sanitarios de los países desarrollados. Una estrategia interesante para hacer frente a este problema puede ser la búsqueda de remedios que de forma preventiva o curativa reduzcan la incidencia de dichas enfermedades.

Aunque todavía no se conocen exactamente las causas de estas enfermedades, se postula que el declive neuronal asociado a las enfermedades neurodegenerativas podría estar desencadenado por múltiples factores, como la neuroinflamación, excitotoxicidad glutaminérgica, aumento en la concentración de hierro y/o depleción de los antioxidantes endógenos (Von Bernhardi, 2007). Es conocido que los procesos oxidativos del tejido cerebral juegan un papel principal.

Durante el proceso de envejecimiento se produce en el cerebro una pérdida de neuronas, así como cambios en las dendritas que disminuyen de tamaño y sufren fragmentación y retracción. Esto se traduce en una pérdida en el número de sinapsis y en una alteración entre las conexiones interneuronales. En un gran número de trabajos de investigación se ha postulado que los procesos de envejecimiento ocurren en el núcleo de las neuronas provocando cambios en la transcripción y transducción de señales. Asimismo, durante el envejecimiento, se observa una disminución en neurotransmisores como acetilcolina y dopamina (Karolczak y col., 2013).

El conocimiento de los mecanismos implicados en las enfermedades relacionadas con el envejecimiento, no solo facilitará el diagnóstico temprano de la enfermedad, sino que permitirá el control de su progresión, mejorando la calidad y esperanza de vida de estos pacientes (Kim, 2013).

1. PROCESOS OXIDATIVOS Y SALUD

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes, que se generan como resultado del metabolismo celular normal y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo, caracterizado por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes, causando daño y muerte celular.

Esto ocurre en patologías degenerativas de tipo infeccioso, inmune, inflamatorio, etc. (Dorado Martínez y col., 2003).

1.1. RADICALES LIBRES (RL) Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Un radical libre (RL), o simplemente radical, es cualquier átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados que pueden alterar la actividad química de cualquier átomo o molécula incrementando su reactividad.

Determinadas moléculas del organismo reaccionan con los RL produciéndose reacciones en cadena en las que se forman nuevos RL o se originan alteraciones estructurales.

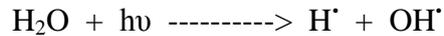
Tabla 1.- ROS más comunes en sistemas biológicos.

	ROS	REACCIÓN QUÍMICA
OH·	Hidroxilo	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$
O ₂ · ⁻	Superóxido	$NADPH + O_2 \rightarrow NADPH^+ + H^- + 2 \cdot O_2^-$
NO ₂	Dióxido de nitrógeno	$OH\cdot + NO_2^- \rightarrow OH^- + NO_2\cdot$
NO	Óxido nítrico	$NO + O_2\cdot^- \rightarrow ONOO\cdot$
LO ₂ ·	Peroxilo	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$
L·	Radical lipídico	$LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$

En prácticamente la totalidad de los procesos metabólicos inherentes al organismo se producen pequeñas cantidades de ROS, como sucede en el retículo endoplasmático, los microsomas y los peroxisomas, no obstante, la fuente endógena de ROS más importante es el sistema mitocondrial de transporte de electrones, donde se generan las ROS como producto secundario del metabolismo energético oxidativo (Dorado Martínez y col., 2003; Ajith y Jayakumar, 2014).

Las principales ROS producidas por el organismo son el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) el óxido nítrico (NO), etc. (Tabla 1).

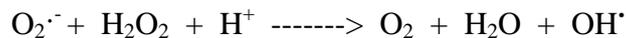
Por ejemplo, las radiaciones electromagnéticas de baja longitud de onda, $h\nu$ (rayos gamma) pueden provocar la ruptura de las moléculas de agua del organismo, generando radicales $\text{OH}\cdot$ (Halliwell y Gutteridge, 1989).



Si el radical $\text{OH}\cdot$ se genera cerca del ADN, éste ataca a las bases púricas y pirimidínicas causando mutaciones (Dizdaroglu, 1993).

El radical $\text{O}_2\cdot^-$ se genera de forma controlada en situaciones normales en el organismo, bien por escape de electrones de la cadena de transporte mitocondrial, bien por una reacción directa del oxígeno con moléculas oxidables (degradación de purinas por la xantina oxidasa). El propio organismo se encarga de eliminarle mediante distintos sistemas enzimáticos que controlan su formación. El $\text{O}_2\cdot^-$ dismuta a O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) espontáneamente, de forma bastante rápida (a pH 7).

El radical $\text{O}_2\cdot^-$ puede asimismo contribuir a la producción del radical $\text{OH}\cdot$, de forma no enzimática (Reacción de Haber-Weiss).



Otras reacciones son las que se producen entre el radical $\text{O}_2\cdot^-$ y los iones de hierro y cobre dando lugar también a radicales $\text{OH}\cdot$ (Halliwell y Gutteridge, 1989; Groß y col., 2013).

También puede reaccionar rápidamente con otros compuestos como el óxido de nitrógeno (NO), conocido como óxido nítrico, formando peroxinitrito. El NO es una molécula muy inestable que se oxida con facilidad originando dióxido de nitrógeno por lo que también se considera una ROS.

Aunque los radicales mencionados anteriormente ($\text{O}_2\cdot^-$ y NO) no son muy reactivos químicamente, bajo determinadas circunstancias, pueden generar productos tóxicos.

Efectivamente, cuando dos radicales libres reaccionan, sus dos electrones desapareados forman un enlace covalente. Así, cuando se combinan a pH fisiológico el radical $\text{O}_2\cdot^-$ y NO, se forma el anión peroxinitrito (ONOO^-), el cual reacciona con la proteínas descomponiéndolas en productos tóxicos, como el dióxido de nitrógeno (NO_2), $\text{OH}\cdot$, e ión nitronio (NO_2^+) (Tsang y Chung, 2009).



El ONOO^- , inhibe la respiración a nivel de la mitocondria, promueve la peroxidación lipídica, nitración de tirosina y ruptura de las cadenas de ADN, induciendo así la muerte celular (Bolton y col., 2009). A pH fisiológico se transforma en ácido peroxinitroso

(ONOOH) el cual puede reaccionar con otras moléculas (ADN, lípidos) dando lugar a compuestos citotóxicos (Halliwell, 2001).

Cuando el NO se encuentra en exceso en la mitocondria, puede inhibir además el enzima citocromo oxidasa, dando lugar a una pérdida de electrones y a la formación de más $O_2^{\cdot-}$, lo que ocurre en los procesos inflamatorios.

Aunque el H_2O_2 no es un RL propiamente dicho ya que todos los electrones de su orbital externo se encuentran apareados, se incluye dentro de este grupo por presentar propiedades similares. Se trata de un oxidante que, en presencia de iones metálicos, es capaz de generar RL en una reacción no enzimática (reacción de Fenton). Entre sus características figuran su capacidad para difundir a través de las membranas biológicas y además ser producido por muchas enzimas que fijan O_2 , presentes en peroxisomas, mitocondrias y retículo endoplasmático.

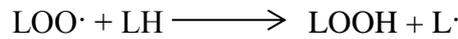
La reacción de Fenton se produce entre el H_2O_2 y metales de transición, generalmente hierro o cobre, dando como resultado la generación de radicales OH^{\cdot} , altamente reactivos (Moriwaki y col., 2008).

Al producto del metabolismo de los RL se le denomina especies reactivas e incluyen a las de oxígeno (ROS), hierro (RIS), cobre (RCS), así como a las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Dorado Martínez y col., 2003). Aunque no todas son RL, son moléculas oxidantes que se pueden transformar en RL.

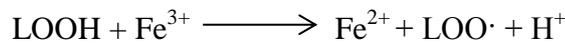
Las ROS se producen en el metabolismo redox de la célula (Aoyama y Nakaki, 2013). Presentan una alta reactividad, tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares. Sus dianas principales son los ácidos grasos constitutivos de las membranas fosfolipídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos. Una vez formadas dichas especies, dan lugar a una serie de reacciones en cadena (peroxidación lipídica, glicosilación) que pueden dañar moléculas de importancia biológica, ya sea por una alteración directa de la estructura y función, por la aceleración de la proteólisis endógena o por el incremento de la función enzimática (Zorrilla y Fernández, 1999).

La reacción de peroxidación puede iniciarla el radical hidroxilo, el radical hidroperoxilo y quizás el oxígeno singlete, pero no el radical superóxido o peróxido de hidrógeno (menos reactivos). El radical libre extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena del ácido graso y deja un electrón no apareado, con lo cual se genera un radical lipídico. Este radical lipídico, rápidamente, sufre un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical hidroperoxilo. Este radical puede a su vez extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido lipídico. El radical lipídico entonces, se combina con otra molécula de oxígeno y continúa la reacción en cadena. El hidroperóxido lipídico es un componente estable hasta que se pone en contacto con

iones metálicos de transición, entonces se producen más radicales, que a su vez posteriormente inician y propagan otra cadena de reacciones.

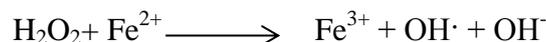


El hidropéroxido en presencia de un radical, puede reaccionar con el ion metálico Fe^{2+} dando lugar a un radical alcoxilo ($\text{LO}\cdot$) que es más reactivo que el radical peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) ya que puede iniciar otra peroxidación.



Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y otros residuos químicos, incluido el malondialdehído. Estos productos de degradación pueden difundir lejos del lugar de la reacción y producir edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Asimismo, pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endopéroxidos (Holgado y col., 1994).

El hierro es fundamental para la vida humana, para el metabolismo neuronal, para la producción de energía en la mitocondria y para el proceso de mielinización; pero un exceso de hierro en el organismo da lugar a la formación de ROS y por tanto neurodegeneración (Inglese y Petracca, 2013). Como ya se ha comentado, tiene la habilidad de transferir un electrón cada vez que pasa de su estado férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) en reacciones con RL:



El cobre es un metal de transición que se requiere como cofactor de muchas metaloenzimas, como es el caso de la Cu-Zn superóxido dismutasa, citocromo C oxidasa, ceruloplasmina o dopamina β -monooxigenasa. No obstante, un exceso de este metal cataliza la generación de radicales hidroxilos en una reacción de tipo Fenton o, directamente, inhibe las funciones proteicas contribuyendo al inicio de enfermedades (Scheiber y col., 2010).

1.2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Un antioxidante es cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación. Pueden actuar de las siguientes formas (Dorado Martínez y col., 2003):

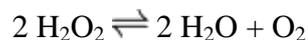
- Disminuyendo la concentración de oxidantes

- Evitando la iniciación de la reacción en cadena, al detener los primeros radicales libres formados
- Uniéndose a iones metálicos para evitar su contribución a la formación de especies reactivas
- Transformando los peróxidos en productos menos reactivos
- Deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres

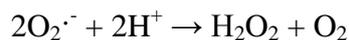
En el organismo se han desarrollado diferentes mecanismos de defensa antioxidante frente a la acción de los radicales libres. Pueden ser extranucleares o intranucleares.

1.2.1. Enzimas Extranucleares

- Catalasas (CAT): pertenecen a la categoría de los enzimas oxidoreductasas, encargados de la descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua. Están localizados en los peroxisomas de la mayor parte de las células. Existen cuatro tipos: CAT1, el más abundante, es un enzima tetramérico que utiliza como cofactor al grupo hemo (dos subunidades pequeñas); CAT2, también tetramérico y con grupo hemo (dos subunidades grandes); CAT3 (catalasa-peroxidasa), enzima dimérico con grupo hemo; y CAT4, enzima hexamérico que utiliza como cofactor ión manganeso Mn^{2+} (Chelikani y col., 2004).



- Superóxido dismutasa (SOD): cataliza la dismutación del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 y O_2 utilizando como cofactores iones metálicos (Cu^{+1} , Zn^{+1} o Mn^{+2}). De esta forma, el enzima protege a la célula de las reacciones dañinas del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$.

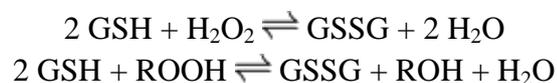


En humanos existen tres formas de este enzima: SOD1 localizado en el citoplasma, SOD2 mitocondrial y SOD3 del líquido extracelular. El primero es un dímero, mientras que los otros dos son tetrámeros. SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 posee manganeso en su centro reactivo (Peskin y Winterbourn, 2000).

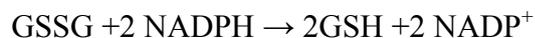
Su papel protector frente a la oxidación se ha constatado en numerosos trabajos científicos. Por ejemplo, se ha comprobado que una deficiencia parcial de este enzima (SOD2) en ratones transgénicos (Tg19959) con enfermedad de Alzheimer, incrementa la patología amiloide de la enfermedad (Dumont y col., 2009). Por otra parte, una sobreexpresión del enzima SOD2 en un modelo de ratones transgénicos (Tg2576) con EA, reduce la concentración de radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ en el hipocampo y previene déficits de memoria en dichos ratones (Massaad y col., 2009).

- Glutación peroxidasa (GPx), cataliza la reacción de descomposición del H_2O_2 (generado por la SOD en citosol y mitocondria) en H_2O en presencia de glutación, oxidando el glutación desde su forma reducida (GSH) a su forma oxidada (GSSG) (Halliwell, 2001). Su principal función es proteger al organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos y lipoperóxidos (L-OOH) formados de forma endógena. Existen dos isoformas de GPx: una tetramérica dependiente de selenio, la cual descompone los hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos, utilizando como cofactor selenio, y otra, independiente de selenio, dimérica, que cataliza la descomposición de los hidroperóxidos orgánicos (glutación transferasas) (Valko y col., 2006).

El enzima GPx dependiente de selenio está compuesto por 4 subunidades idénticas entre sí y cada una de ellas contiene un átomo de Se unido covalentemente a una molécula de cisteína. En el organismo, se han encontrado en los diferentes tejidos cuatro tipos del enzima glutación peroxidasa dependiente de selenio: GPx1, es un homotetrámero y su localización celular es el citoplasma. Está presente fundamentalmente en el cerebro y en la mayoría de células del organismo; GPx2, es un homotetrámero localizado en el citoplasma celular, se expresa mayoritariamente en el hígado y tracto gastrointestinal, reduce el peróxido de hidrógeno y los alquil hidroperóxidos peróxidos en el tracto gastrointestinal para evitar las absorción de estas moléculas dañinas en el organismo; GPx3, es extracelular y se encuentra en plasma; GPx4 o glutación peroxidasa fosfolípido hidroperóxido, ubicado en membranas celulares, ayuda a mantener la integridad de estas (Aoyama y Nakaki, 2013) .



- Glutación reductasa (GR), acoplado a la anterior, se encarga de reciclar el glutación oxidado originado, manteniendo así el balance redox de la célula. Es un flavoenzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH).



Es un enzima homodimérico compuesto por dos subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro. El enzima GR permite mantener concentraciones de GSH en la célula, no sólo para ser utilizado por el GPx en la eliminación del H_2O_2 , sino para la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfatocoferol), además de participar en la eliminación de RL generados *in situ* o a distancia. El GSH interviene además en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxiribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular (Cisneros Prego, 1995), además de participar en la maduración de los grupos Fe-S en las proteínas y como señal de transducción que comunica el medio ambiente con la maquinaria de transcripción celular (Aquilano y col., 2014).

- NAD(P)H quinona oxidoreductasa: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), enzima localizado principalmente en el citosol de la célula aunque en situaciones de estrés oxidativo puede migrar al núcleo, es otro sistema de detoxificación de especies reactivas en el organismo. Es un flavoenzima capaz de reducir quinonas a hidroquinonas, a través de la donación de dos electrones, evitando la generación de intermediarios semiquinónicos reactivos e inestables, capaces de reaccionar con el oxígeno para dar lugar a superóxido (Jódar-Montilla, 2010; Siegel y col., 2012). Este enzima utiliza indistintamente NADPH o NADH como donador de electrones y es inhibido eficientemente por dicumarol. Es un enzima de fase II, que se encarga junto a otros, del mantenimiento de la homeostasis y del estado redox a nivel celular (Gradinaru y col., 2012).

En el cerebro, este enzima se localiza en neuronas dopaminérgicas y principalmente en astrocitos. Durante la autooxidación de la L-Dopa, se forman quinonas perjudiciales para el organismo y es en ese momento cuando la NQO1 transforma estas quinonas lábiles en hidroquinonas, que son moléculas más estables y más fáciles de excretar por el organismo (Van Muiswinkel y col., 2000).

1.2.2. Enzimas Intranucleares: Enzimas reparadores de ADN, enzimas que retiran los ácidos grasos oxidados de las membranas, destruyen proteínas dañadas por RL, etc.

1.2.3. Compuestos Extracelulares e Intracelulares: α -tocoferol, ascorbato, urato, glutatión (GSH). Estas moléculas eliminan RL reaccionando directamente con ellos de forma no catalítica.

- Glutatión (GSH): es un tripéptido tiol no proteico, derivado de aminoácidos (L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina). Es el antioxidante más abundante del SNC. Su función principal es el mantenimiento de la homeostasis redox del cerebro, en donde se encuentra en concentraciones que varían entre 2 y 3 mM dependiendo de la región cerebral (en el córtex se encuentra en mayor concentración) y del tipo celular (microglía > astrocitos > neuronas). Por ejemplo, las células gliales son ricas en cisteína (Cys), glicina y glutamato, que son dos sustratos intracelulares para la síntesis de GSH (Robert y col., 2014).

Como se ha comentado, el glutatión es fundamental en el organismo ya que el enzima GPx lo utiliza como sustrato para la detoxificación del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos. En neuronas, en condiciones fisiológicas, es este enzima el que controla la detoxificación del H_2O_2 (el valor de K_M para el enzima CAT es alto mientras que el de GPx es bajo). Anomalías en el funcionamiento del glutatión parecen estar relacionadas con la etiología de distintas enfermedades neurodegenerativas (EA, EP, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), parálisis supra espinal progresiva (PSP) y esclerosis múltiple (EM) (Aoyama y Nakaki, 2013).

- Ascorbato: se encuentra en el cerebro en concentraciones micromolares. Aparece mayoritariamente en neuronas, en glía y astrocitos, se encuentran en bajas concentraciones. Desempeña diferentes funciones en el cerebro, aunque

todas ellas relacionadas con su capacidad como donador de electrones (Harrison y May, 2009). Así por ejemplo, es sustrato del enzima ascorbato peroxidasa (APx) que transforma el H_2O_2 en agua (Bielen y col., 2013).

- **α -Tocoferol:** inhibe la peroxidación lipídica ya que es capaz de captar radicales peroxilo ($LOOH\cdot$). Estos radicales reaccionan 100 veces más rápido con los tocoferoles que con los ácidos grasos. El grupo hidroxilo del tocoferol reacciona con el radical peroxilo, dando lugar a un hidrolipoperóxido y a un radical de tocoferol. Este puede reaccionar con la vitamina C u otro donador de electrones, retornando a su estado reducido (Traber y Stevens, 2011). El α -tocoferol se absorbe de forma activa en el tejido cerebral ejerciendo un efecto protector de las membranas celulares (Bourre, 2006).
- **Urato:** El ácido úrico es el metabolito final del catabolismo de las base púricas. Es uno de los antioxidantes más importantes que existe en los fluidos biológicos en el hombre, ya que es capaz de neutralizar el 50% de los radicales encontrados en el torrente sanguíneo (Álvarez-Lario y Macarrón-Vicente, 2011). Es capaz de neutralizar radicales $ONOO^-$ e hidroxilo, evitando que se oxiden o nitren otras moléculas biológicas (Suzuki, 2007).

1.2.4. Proteínas transportadoras: Transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, albúmina, hemopexina y haptoglobina. Estas proteínas captan iones hierro y cobre, evitando las reacciones en cadena con radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1990; Gutteridge y Stocks, 1981).

1.3. DAÑO OXIDATIVO

Cuando la generación de ROS supera la capacidad de las defensas antioxidantes para neutralizarlas (estrés oxidativo), proteínas, lípidos, ADN y otras macromoléculas se convierten en dianas susceptibles de ser oxidadas (Ischiropoulos y Beckman, 2003). El resultado más común del estrés oxidativo es el aumento del daño de las membranas lipídicas, del ADN y de las proteínas, lo que se traduce en el desarrollo de diferentes patologías como por ejemplo el cáncer (Kaur y col., 2014). El daño oxidativo conduce a la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, inicia un deterioro acumulativo de sus funciones que se traduce en una reducción en el potencial electroquímico y en un incremento de su permeabilidad.

Otra de las consecuencias del daño oxidativo es el incremento mantenido de la concentración de Ca^{2+} intracelular que origina la activación de proteasas, lipasas y endonucleasas. La activación de proteasas dependientes de Ca^{+2} puede dañar el citoesqueleto y las proteínas de membrana. La activación de lipasas cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, como ocurre con la fosfolipasa A_2 (FLA₂), enzima que interviene en la liberación del ácido araquidónico y sus metabolitos, responsables del daño oxidativo en varios trastornos clínicos. Además, la activación de las endonucleasas

dependientes de Ca^{+2} , provoca la fragmentación del ADN relacionada con los procesos de la muerte celular por apoptosis (Dorado Martínez y col., 2003).

La apoptosis, a diferencia de la necrosis, es un proceso activo, no inflamatorio, que origina la muerte celular. Un estímulo externo (estrés oxidativo, NO) y la privación de factores de supervivencia celular, como un aumento del Ca^{+2} intracelular, (Takuma y col., 2004), caspasas, genes apoptóticos, enzimas líticas, etc. (Dorado Martínez y col., 2003), pueden activar la apoptosis celular. Así, la translocación al núcleo del factor nuclear *kappa*-B (NF κ B), a su vez inicia cambios morfológicos en el núcleo: condensación de la cromatina en agregados bien delimitados, de formas y tamaños diversos en la superficie externa de la membrana nuclear; la formación de nucléolos remanentes y fragmentación del núcleo. Posteriormente, en el citoplasma celular, las mitocondrias sufren cambios morfológicos, los ribosomas se desprenden del retículo endoplásmico rugoso y de los polirribosomas y, por último, se produce una fragmentación celular en cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados por macrófagos o por células vecinas (Girón, 2008).

La necrosis es un fenómeno pasivo que se presenta como consecuencia de alguna agresión y que lleva a un exceso en el flujo de Ca^{+2} . Generalmente va acompañada de una respuesta inflamatoria aguda que implica cambios metabólicos progresivos, con una importante reducción de ATP, edema celular y mitocondrial, ruptura de membranas, dilatación de las cisternas en retículo endoplásmico, liberación de hidrolasas, ruptura de lisosomas, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN por endonucleasas (Dorado Martínez y col., 2003).

La excitotoxicidad es “en esencia, un efecto exagerado del efecto excitatorio provocado por los receptores glutamérgicos” (Olney y col., 1974). Esta teoría se basa en el hecho de que los análogos de glutamato que tienen un efecto excitatorio sobre las neuronas, son también neurotóxicos y además su potencia excitatoria es correlativa con su potencia neurotóxica. Así, el glutamato y otros aminoácidos, son capaces de aumentar la entrada de calcio en las neuronas favoreciendo la entrada de calcio en la mitocondria, lo cual provoca la generación de ROS, la despolarización de la mitocondria, la inducción de la desregulación del calcio y una degeneración neuronal (Lai y col., 2014).

Las ROS, además de generarse durante el proceso de respiración aeróbica en la mitocondria, se generan también durante los procesos inflamatorios como un método de defensa del organismo. Una excesiva producción de ROS durante un proceso inflamatorio crónico, contribuye de forma significativa a situaciones patológicas. Durante la inflamación se producen una serie de citocinas capaces de inducir la activación del enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y por tanto, la síntesis de NO (Von Bernhardt, 2007). El NO, no solo puede reaccionar con otras ROS, sino que también puede dar lugar a reacciones de nitrosilación, las cuales modifican los residuos tiol de las proteínas para formar nitrosotioles. Esta modificación de las proteínas, regula la transcripción de genes, el tráfico vesicular, al receptor mediador de transducción de señales y la apoptosis (Tsang y Chung, 2009).

Un exceso en la producción de NO induce la muerte neuronal ya que ocasiona daño en la cadena de transporte mitocondrial, interrumpiendo la síntesis de ATP en la neurona, lo que provocaría asimismo un aumento en la generación de ROS (Fig. 1). Por ejemplo, el NO producido por la microglía y por los astrocitos, podría reaccionar con el anión $O_2^{\cdot-}$, producido por la NADPH oxidasa (NOX), generando el radical $ONOO^{\cdot-}$, el cual inhibe la respiración mitocondrial e induce apoptosis (vía caspasa), excitotoxicidad dependiente de glutamato y por último, muerte neuronal (Vauzour, 2012).

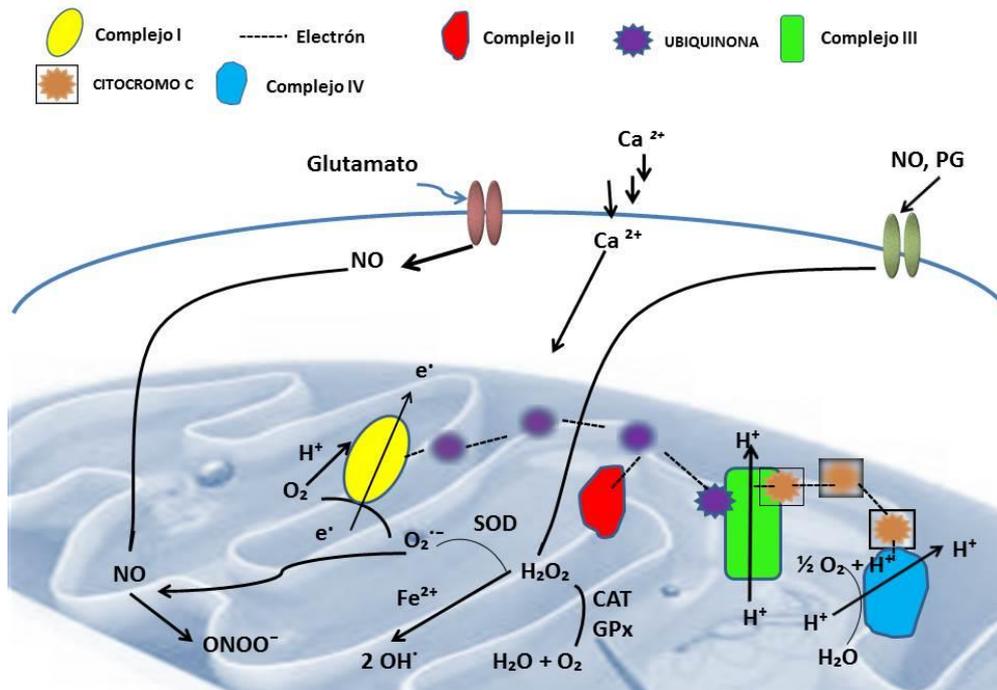


Figura 1- Cadena de transporte mitocondrial y formación de algunas ROS en la mitocondria (A. López Cid).

Normalmente, durante la respiración, el oxígeno que llega a la mitocondria se transforma por efecto de la cadena de transporte electrónico en agua, pero existe un pequeño porcentaje de moléculas de oxígeno que pierden un electrón formándose el radical superóxido. Éste, por acción de la SOD, se transforma en peróxido de hidrógeno, que a su vez por la acción de los enzimas CAT y GR se transforma en agua y oxígeno. En situaciones de neuroinflamación la neuroglia se activa, dando lugar a ROS y a la formación de NO por la iNOS, los cuales se liberarán al medio y difundirán a neuronas generando en ellas más ROS y RNS. Así mismo, en presencia de Fe^{2+} , el peróxido de hidrógeno se convierte en radical hidroxilo a través de una reacción tipo Fenton. Un exceso de glutamato induce la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y por tanto, la liberación de óxido nítrico, el cual en presencia del radical superóxido se transformará en la ROS $ONOO^{\cdot-}$, el cual puede dar lugar a OH^{\cdot} y NO_2 , que continuarán las reacciones de oxidación y nitración (Tsang y Chung, 2009).

2. NEURODEGENERACIÓN

La neurodegeneración parece ser provocada por eventos multifactoriales, que incluyen el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la neuroinflamación, los incrementos en hierro y/o el agotamiento de antioxidantes endógenos. Un estado de estrés oxidativo causa en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (Limón y col., 2010; Von Bernhardt, 2007; Quintanilla y col., 2012). Estos eventos hacen totalmente vulnerable al SNC y conllevan un inevitable deterioro funcional.

Todos los tejidos del organismo sufren daño oxidativo, pero el cerebro, es especialmente sensible a este daño debido a una serie de circunstancias:

- Su elevado consumo de oxígeno (elevado consumo de ATP por las neuronas).
- Gran consumo de glutamato como neurotransmisor. Cuando éste se encuentra en alta concentración en el cerebro, puede provocar la muerte celular por excitotoxicidad. Este proceso está mediado por receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) que son capaces de permitir un aumento en la afluencia de iones calcio, dando lugar a un proceso neurodegenerativo en las neuronas con hiperactivación de la FLA_2 , de la actividad de calpaína y de la actividad nNOS. Como consecuencia de todo ello, se produce un incremento en la liberación de NO, peroxidación de ácidos grasos y proteólisis.
- Además, este aumento del glutamato y la activación de receptores NMDA implica la producción de ROS mediada por NADPH-oxidasa (Girouard y col., 2009). Las ROS liberadas actúan sobre diferentes proteincinasas activadas por mitógenos (MAPKs), favoreciendo la apoptosis e induciendo inflamación (Da Rocha y col., 2011).
- Muchos de los neurotransmisores son moléculas autooxidables.
- Las defensas antioxidantes en el cerebro son más bien modestas.
- El hierro almacenado en diferentes áreas cerebrales, aunque en concentración elevada, se encuentra en forma de ferritina lo cual limita su capacidad para catalizar el daño oxidativo.
- Las membranas cerebrales contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que son moléculas extremadamente sensibles a la oxidación. Su peroxidación inicia un deterioro acumulativo de sus funciones: disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y aumento de la permeabilidad de la membrana para diferentes iones, entre los que destaca el Ca^{2+} . Como ya se ha comentado, el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular por periodos prolongados de tiempo, activa proteasas, lipasas, endonucleasas y especialmente la nNOS, responsable de sintetizar el NO,

molécula importante para el progreso del estrés oxidativo que causa degeneración neuronal.

- Algunas de las células que constituyen la microglía son células tipo macrófagos capaces de producir $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 y, en algunos casos, NO. Cuando se activan tienen además la capacidad de segregar citocinas proinflamatorias.
- Finalmente las ROS reaccionan con intermediarios del ciclo del citocromo P450 de ciertas regiones cerebrales, generando peróxido de hidrógeno y anión superóxido (Halliwell, 2001).

Por tanto, los procesos inflamatorios también desempeñan un papel crucial en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Tanto en modelos experimentales de dichas enfermedades, como en tejidos de pacientes, se ha observado que las células del cerebro que inician el proceso neuroinflamatorio son las células gliales (Choo y col., 2013). Se ha demostrado que la activación de las células gliales (astrocitos y microglía) conduce a la liberación prolongada de citocinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación como interleucina 1β (IL- 1β), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferón γ (IFN- γ) y prostaglandinas, que pueden contribuir a la activación progresiva de la apoptosis y provocar la muerte de las neuronas. Su liberación desencadena una cascada de eventos moleculares en la propia glía y también en las neuronas, activando la respuesta inflamatoria así como los mecanismos para la producción de ROS.

Sin embargo, los mecanismos no son sencillos ya que por ejemplo la IL- 1β , agente proinflamatorio que induce la expresión de iNOS y la producción de NO mediada por la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y por NF- κ B, puede tanto contribuir como limitar la neurotoxicidad (Von Bernhardt, 2007). Hay que tener en cuenta que el NF κ B responde a la señalización de la proteína activada por mitógeno p-38 (p38) y por tanto, a la inducción de la iNOS, lo cual sugiere que existe una interacción entre vías de señalización, factores de transcripción y producción de citocinas, en la respuesta inflamatoria del SNC (Bhat y col., 2002).

Las enfermedades neurodegenerativas de mayor prevalencia en la actualidad son:

- **Enfermedad de Alzheimer (EA)**: En España se calcula que existen de 500.000 a 800.000 afectados (Static, 2013). Algunos estudios apuntan a que dentro de 15 años podrían existir casi siete millones de enfermos, por lo que su prevención debería ser una prioridad sanitaria para nuestro país. En un 98% de los casos, el inicio de la enfermedad suele ocurrir entre los 65-69 años de edad, no obstante, cuando la enfermedad está relacionada con un componente genético (autosómico dominante), aproximadamente en un 2% de los casos, el inicio es más temprano (30-40 años de edad).

Descrita por primera vez en noviembre de 1907 por el médico alemán Alois Alzheimer, sus síntomas clínicos característicos son alteraciones cognitivas severas,

desorientación, pérdida de memoria, afasia, desilusión y comportamiento impredecible (Möller y Graeber, 1998). A nivel del tejido cerebral se manifiesta por la aparición en el espacio extracelular de depósitos de proteína β amiloide ($A\beta$) en forma de placas, la formación de haces neurofibrilares compuestos por proteínas anormalmente fosforiladas (proteína *tau*), la degeneración de las sinapsis y la pérdida pronunciada de neuronas corticales y subcorticales (hipocampo, áreas de asociación de la corteza y núcleo basal de Meynert). Estos cambios patológicos están asociados a procesos inflamatorios, generación de radicales libres y a un déficit del factor de crecimiento neuronal (FCN) (Martin-Carrasco, 2009). Igualmente se ha observado una relación entre la pérdida de ramificaciones dendríticas y axonales, y la deficiencia de estrógenos lo que podría contribuir a la progresión de la enfermedad.

A nivel bioquímico, se ha observado una disminución importante en las concentraciones de algunos neurotransmisores, fundamentalmente acetilcolina (ACh), así como también noradrenalina y serotonina. Igualmente se observa una reducción, aunque menor, de glutamato, dopamina y sustancia P.

En cuanto al origen de la enfermedad, existen en la actualidad diversas teorías, no quedando aún claro si la acumulación en exceso de proteína $A\beta$ y de proteína fosforilada *tau* son causa o efecto de la misma (Castellani y Perri, 2014). En la actualidad se proponen diversas teorías para explicar la enfermedad de Alzheimer, siendo las más aceptadas la teoría amiloide, la teoría basada en el envejecimiento y la hipótesis colinérgica.

- La **“teoría amiloide”** propone como origen de la enfermedad que el incremento en la formación de las placas $A\beta$ asociado al aumento de la fosforilación y división de la proteína *tau*, da lugar a especies tóxicas que perjudican el funcionamiento neuronal. Efectivamente se ha comprobado que en los enfermos de Alzheimer, el péptido $A\beta$ produce daño neuronal y fallo cognitivo a través de la generación de ROS, RNS, deterioro mitocondrial, desregulación en la comunicación intracelular (sinapsis fallidas) y procesos inflamatorios (Quintanilla y col., 2012).
Parece ser que en los inicios de la enfermedad juega un papel importante la disfunción mitocondrial. Cuando la mitocondria está dañada produce RL que incrementan el estrés oxidativo (Zhu y col., 2007).
- La **“teoría basada en el envejecimiento”** propone que existe una clara conexión entre la edad y la EA, ya que durante el envejecimiento se produce un declive de las neuronas del *locus coeruleus*, así como un aumento de densidad de las placas neuríticas con formación de placas $A\beta$ y ovillos neurofibrilares (Armstrong, 2013).
- La **“hipótesis colinérgica”** está basada en que durante la EA se producen pérdidas significativas de ACh en el cerebro que están relacionadas con una reducción significativa de los niveles de ACh-transferasa en el córtex cerebral. Se ha comprobado la existencia de una correlación entre los niveles de este

enzima y la aparición de placas amiloides. Asimismo parece existir una correlación entre la concentración del enzima en el hipocampo y la densidad de ovillos neurofibrilares. Esta teoría también propone que la degeneración de la EA se extiende a través de las sinapsis neuronales y de la transmisión de sustancias entre neuronas (Armstrong, 2013).

- **Intervención genética** (EA familiar): Un pequeño porcentaje de casos de EA está ligado a mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora de A β , mutaciones en los genes de presenilina y variaciones en el alelo de la apolipoproteína E (Apo E) (Armstrong, 2013).
- **Otras teorías** que también se proponen como origen de la enfermedad son la posible incidencia de factores ambientales (exposición al aluminio, en la actualidad desechada) o de agentes infecciosos, deficiencias fisiológicas (malnutrición), alteraciones del sistema inmune, existencia de un trauma cerebral, la teoría basada en la disfunción mitocondrial en la cual serían las ROS las causantes del daño mitocondrial, mermando sus funciones y por lo tanto dando lugar al envejecimiento (Quintanilla y col., 2012) y la teoría de la disfunción de la barrera hematoencefálica (la degeneración de los vasos sanguíneos o difusión de las sustancias desde los vasos podría influir en la formación de depósitos A β).

Aunque las tres primeras teorías son las más aceptadas pues existe una clara relación entre la enfermedad, el envejecimiento, la formación de placas y ovillos y la disfunción colinérgica, el trauma cerebral y la malnutrición son realmente factores de riesgo. Por el contrario, los cambios inmunológicos y la disfunción mitocondrial podrían ser en realidad consecuencias de la enfermedad.

Armstrong (2013) define la EA como una enfermedad multifactorial en la que factores externos e internos aceleran el ritmo del envejecimiento. Como consecuencia de la degeneración de las vías neuronales, así como de los vasos sanguíneos, se forman agregados anormales de proteína A β y ovillos neurofibrilares de proteína *tau*, los cuales se extienden desde el lóbulo temporal medial a otras zonas del cerebro de célula a célula.

En la actualidad, se está trabajando intensamente en el diseño de pruebas diagnósticas que permitan la identificación temprana de la enfermedad, antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos. Por ejemplo, se propone la tomografía por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa (FDG-PET) para medir el contenido de proteína amiloide en el cerebro, resonancia magnética por imágenes (MRI) para realizar medidas volumétricas y el análisis del fluido cerebroespinal (CSF) para determinar en él A β y *tau* (Castellani y Perri, 2014).

- **Enfermedad de Parkinson (EP)**: Tradicionalmente se define como un trastorno principalmente motor. James Parkinson, en 1817, declaró que sus síntomas más

característicos son: “*el movimiento tembloroso involuntario con posturas anormales y una pérdida del control muscular voluntario*” (García-Ruiz y col., 2014). Estos síntomas motores son consecuencia de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta*.

En cuanto a la etiología de la enfermedad, son numerosos los experimentos que confirman la relación entre esa pérdida de neuronas dopaminérgicas y el estrés oxidativo, los bajos niveles de GSH y los altos niveles de hierro y calcio en la sustancia negra. Además, se ha observado que en estas situaciones de estrés, aparecen elevadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales dan lugar a una peroxidación lipídica y por tanto, al incremento de compuestos tóxicos para el cerebro. Existen pruebas fehacientes que indican que el estrés oxidativo y el daño mitocondrial dan lugar a una cascada de eventos que desembocan en la degeneración de estas neuronas dopaminérgicas. Estos datos se corroboran mediante el análisis *post mortem* del cerebro de enfermos de Parkinson (Dias y col., 2013).

Por otro lado, la microglía está constituida por células del cerebro que forman parte del sistema inmune del SNC, son células fagocíticas. Se activan por daño cerebral o por estimulación inmunológica. Estudios *post mortem* revelan la presencia de iNOS en la microglía activada de la sustancia negra (Hirsch y col., 2003), lo cual induciría un aumento de los niveles de NO. Esto a su vez origina la inhibición de diferentes enzimas de los complejos I y IV de la cadena de electrones mitocondrial. Dicha inhibición da lugar a la formación de ROS, las cuales activarán posteriormente la microglía (Dias y col., 2013). Se ha observado la activación de microglía y astrogliá utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* en los que el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) actúa como tóxico. La activación de dichas células conduce a un deterioro neuronal ya que producen un amplio espectro de moléculas neurotóxicas, como citocinas, quimocinas, prostaglandinas, gran cantidad de ROS y RNS (Niranjan y col., 2012). Por otra parte, esta neurodegeneración se ve favorecida por el aumento de los niveles de glutamato y del TNF α . Esta situación de degeneración neuronal, provoca a su vez una nueva activación de la microglía, la cual genera otra vez ROS y RNS además de citocinas, y una disminución de la secreción de los factores tróficos responsables de mantener los niveles normales de viabilidad neuronal. Así pues, se genera un círculo vicioso de neurotoxicidad que genera la destrucción paulatina de las células del cerebro (Dias y col., 2013).

- **Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)**: Es una enfermedad neurodegenerativa, de progresión rápida, que afecta a las motoneuronas superiores e inferiores. Existen cuatro estadios en esta enfermedad definidos por el número de regiones afectadas. En los tres primeros se observa una afectación de la región bulbar del cerebro, de las neuronas motoras del tracto corticoespinal y de la espina dorsal, que funcionalmente conlleva disfasia, disartria, espasmos, debilidad o pérdida muscular. El estadio

cuatro implica la dificultad para tragar y una dificultad respiratoria que requiere intervención (afectación del tronco encefálico) (Balendra y col., 2014).

La etiología de la enfermedad no está completamente elucidada. En pacientes con ELA se han encontrado altos niveles de hierro y una alteración en su homeostasis en la espina dorsal, esto parece ser la causa de la alteración de las motoneuronas en esta enfermedad. Además, en un 2% de los pacientes parece existir una mutación en el gen que codifica para el enzima SOD1 (Inglese y Petracca, 2013).

En estos enfermos también se ha observado daño y disfunción mitocondrial, y activación de la glía (astrocitos y microglía) como en el caso de las enfermedades anteriores. En cuanto a la activación de la microglía y la astrogliosis, se ha encontrado en pacientes que padecen esta enfermedad, así como en modelos de ratones, que estas células al igual que las células T se ven aumentadas y adheridas a las vénulas de los capilares sanguíneos del tallo cerebral y de la espina dorsal. Aunque parece que esta activación de la microglía y astrogliosis es posterior al daño de las neuronas motoras (Inglese y Petracca, 2013).

- **Esclerosis múltiple (EM)**: Es una enfermedad inflamatoria crónica del SNC caracterizada en la fase inicial por la infiltración masiva de células leucocitarias, entre ellas las CD4⁺T, activación de la microglía, desmielinización de los axones de las neuronas y por lo tanto degeneración neuronal, y atrofia del cerebro que se va incrementando a medida que la enfermedad avanza. Esta enfermedad es más frecuente en la segunda y tercera década de la vida, por ello se diagnostica antes que el resto de enfermedades neurodegenerativas y además sirve de modelo para estudiar la patogénesis de otras enfermedades neurodegenerativas (Inglese y Petracca, 2013).

Todavía no se ha esclarecido su etiología, no obstante, se han encontrado depósitos de hierro en el cerebro en las placas de desmielinización, materia blanca mielinizada, materia gris de la microglía, venas, etc., aunque no está claro el mecanismo por el cual se acumula el hierro (Inglese y Petracca, 2013).

Por otra parte, se ha observado que se produce un fallo mitocondrial debido a un desequilibrio entre la producción y demanda de energía. Al inicio de la enfermedad, parece ser que hay un aumento de densidad mitocondrial a nivel de los axones neuronales y de los astrocitos, mientras que la actividad del complejo IV de la cadena de transporte electrónico está disminuida. Por el contrario, cuando la enfermedad se hace crónica, se produce un aumento de la actividad de este complejo provocándose un desequilibrio en la formación de ATP, lo cual afecta a los canales voltaje dependientes de sodio y de forma secundaria, al intercambio sodio/calcio que se produce en los axones neuronales (Inglese y Petracca, 2013; Rossi y col., 2010).

- **Parálisis supraespinal progresiva (PSP)**: Es una enfermedad degenerativa de rápido progreso que se caracteriza por distonía en la nuca, inestabilidad postural con pérdida del equilibrio, oftalmoplejía supranuclear vertical, parkinsonismo que no responde a la levodopa, parálisis pseudobulbar y deterioro cognitivo. Por lo general los enfermos de PSP desarrollan disfagia progresiva y disartria (Owolabi, 2013). Parece estar causada por una degeneración heterogénea del tallo cerebral, ganglios basales y cerebelo (Aoyama y col., 2006; Owolabi, 2013).

3. ASTROCITOS: FUNCIONES FISIOLÓGICAS EN EL SNC

Los astrocitos son las células más abundantes del cerebro y principales componentes del tejido glial. Tienen forma estrellada, constan de un cuerpo celular que contiene el núcleo y de prolongaciones citoplasmáticas diversamente ramificadas. Se caracterizan por contener abundantes microfilamentos, presentes tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones citoplasmáticas, y por la presencia frecuente de gránulos de glucógeno. Las prolongaciones astrocitarias establecen contactos entre ellas mismas y con las sinapsis neuronales, los capilares sanguíneos y las leptomeninges. Estas prolongaciones emiten pequeñas lengüetas citoplasmáticas que rodean las sinapsis y los capilares sanguíneos y forman parte de la superficie del SNC (la cara externa de las prolongaciones citoplasmáticas astrocitarias entran en contacto, por mediación de una lámina basal continua con el líquido cefalorraquídeo) (Fig. 2).

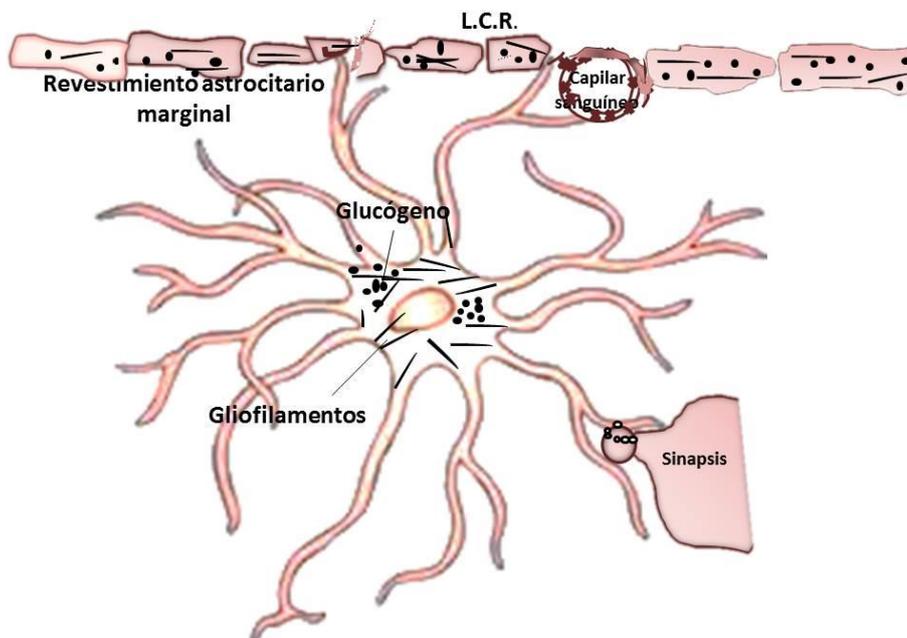


Figura 2.- Diagrama morfofuncional de los astrocitos (Modificado de <http://hipocampo.org>).

De esta forma, intervienen en la selectividad de la transmisión nerviosa al impedir la difusión de neurotransmisores; en la regulación de los intercambios entre sangre y SNC; y en los intercambios entre líquido cefalorraquídeo y SNC. Los astrocitos desempeñan además una función de soporte estructural en el SNC como consecuencia de la red tridimensional que forman sus prolongaciones citoplasmáticas (Poirier, 1985). Existe una lógica interconexión entre neuronas y tejido glial, ya que la microglía sintetiza numerosas citocinas responsables de la regulación autocrina y la comunicación entre neuronas y astrocitos (Von Bernhardi, 2007).

La homeostasis del SNC se mantiene por una relación entre neurona-microglía-astrocito (Fig. 3). En respuesta al daño celular, astrocitos y microglía liberan al medio factores de

crecimiento y citocinas proinflamatorias (IL1, IL3, IL6, TNF α , IF γ). Estas citocinas estimulan la producción de NO y ROS. Por su parte, los astrocitos liberan al medio factores solubles (TGF α e IL1 β) que modulan la activación de la microglía, inducen la expresión de iNOS y la producción de NO mediada por ERK y NF κ B. Las neuronas también modulan la actividad de astrocitos y microglía regulando la producción de factores solubles y proteínas asociadas a la gliosis reactiva. Mientras las neuronas en condiciones normales disminuyen la activación glial, cuando están dañadas, inducen la activación glial mediada por la producción de mediadores inflamatorios (Von Bernhardi, 2007).

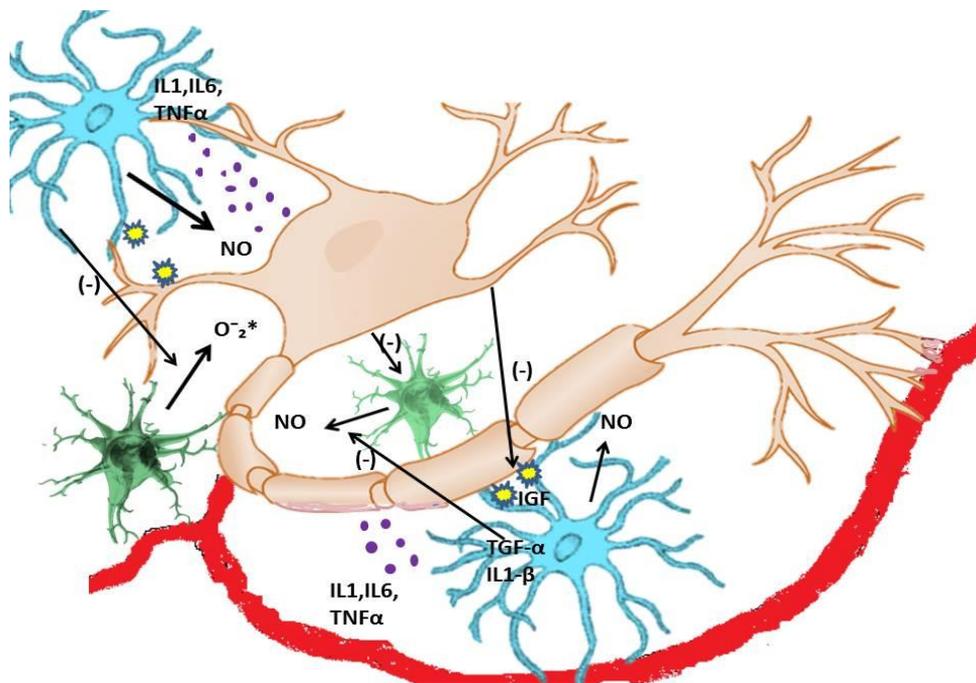


Figura 3.- Relación neuronas-astrocitos-microglía (A. López Cid).

Las células gliales son mucho más resistentes que las neuronas al daño mitocondrial. Entre las posibles explicaciones para este fenómeno figura su elevado contenido intracelular de glutatión, potente antioxidante intracelular y la posible existencia de mecanismos particulares de prevención del daño mitocondrial cuando el contenido en glutatión resulta insuficiente para neutralizar a los RL. Por ejemplo, se ha comprobado que astrocitos y microglía son menos sensibles a la acción tóxica del NO, mientras que los oligodendrocitos sufren daño celular llegando a necrosis (Takuma y col., 2004, Maragakis y Rothstein, 2006). Además, los astrocitos son capaces de disminuir la reactividad de la microglía hacia la proteína A β , disminuir la secreción de NO, modular la actividad de macrófagos, prevenir la apoptosis en neuronas, disminuir la secreción de TNF α y disminuir la producción del anión superóxido (Tichauer y col., 2007).

Por otra parte, los astrocitos son más resistentes a las condiciones isquémicas que las neuronas debido a que el aumento de la concentración extracelular de ion potasio o glutamato no induce un excesivo influjo de iones sodio, a diferencia de lo que ocurre en el tejido neuronal.

Como ya se ha comentado, los astrocitos juegan un papel importante en la protección de las neuronas frente al estrés oxidativo. Esto es debido a que en el interior de los astrocitos existen elevadas concentraciones de antioxidantes de bajo peso molecular (ácido ascórbico, glutatión y tocoferoles) y de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GR y GPx) (Takuma y col., 2004). Por otra parte, los astrocitos son capaces de generar y aportar a las neuronas el precursor del glutatión, el péptido cisteína-glicina, así como proporcionar a dichas neuronas factores tróficos que mantienen su homeostasis. Se ha comprobado que en caso de daño astrocitario se produce una disminución en la producción de factores tróficos y por tanto, se induce una apoptosis neuronal.

Cuando las neuronas sufren un daño, los astrocitos regulan los iones extracelulares, los niveles de neurotransmisores, reparan la matriz extracelular, hacen de soporte trófico de las neuronas y controlan la interfase sangre-SNC. Además, regulan el metabolismo energético del cerebro ya que constituyen la mayor reserva energética en forma de glucógeno.

Teniendo en cuenta esa participación activa en el control de los procesos oxidativos del SNC, y por tanto en las enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos han sido y son células ampliamente empleadas en el estudio de la eficacia antioxidante y antiinflamatoria de productos naturales. Por lo general se utilizan cultivos primarios de astrocitos de roedores, pero ya que estos proliferan difícilmente y además exige una gran demanda de animales, se utilizan líneas celulares de astrocitoma murino (IMA 2.1, C6, CHB, etc.) y humano (U 373-MG, U 87-MG, U 251-MG, etc.) (Lee y col., 2010).

Las células tumorales benignas (U373 MG) de astrocitoma humano presentan una mayor proliferación que las células normales y se caracterizan por su autonomía de respuesta a los sistemas endocrino y nervioso, y a la regulación tisular de la proliferación celular. Son células que mantienen muchas características de las células originarias, incluso la expresión de marcadores propios de la estirpe celular, aunque en general resultan ser células con un mayor grado de indiferenciación.

Por tanto, se puede considerar que los astrocitos son una buena herramienta para el estudio de algunos de los mecanismos de acción implicados en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas y por tanto, para la evaluación de la eficacia de productos naturales en la prevención y reversión de estas enfermedades.

4. LOS ALIMENTOS EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO: LEGUMBRES Y SUS PROCESADOS

Los organismos vivos están sometidos, en todo momento, a la acción de estímulos externos o internos que producen estrés, a través de diferentes procesos fisiológicos, físicos o químicos. Una de las consecuencias más relevantes del estrés es el desencadenamiento de procesos oxidativos e inflamatorios que pueden afectar al ADN, a los ácidos grasos de las membranas biológicas y a las proteínas, y dar lugar a enfermedades como el cáncer, la diabetes, procesos ateroscleróticos y enfermedades neurodegenerativas (Ergin y col., 2013). Por ello, en los últimos años, se está haciendo un gran esfuerzo en investigación para hallar compuestos capaces de prevenir, reducir y revertir dichos procesos oxidativos.

Una forma natural de combatir estos procesos oxidativos podría ser la alimentación, pues son numerosos los alimentos en cuya composición figuran productos naturales con potente actividad antioxidante, como ocurre con diversas frutas, semillas (frutos secos y legumbres) y verduras (Wahlqvist, 2013).

Entre los componentes alimentarios que poseen actividad antioxidante, ocupan un papel preponderante los de estructura polifenólica. Diversos estudios científicos relacionan ese potencial antioxidante con la estructura química, en particular con la presencia y posición de los hidroxilos fenólicos libres. Por ejemplo, se ha comprobado que, en el caso de los flavonoides, la actividad antioxidante es superior en aquellos compuestos que poseen hidroxilos libres, frente a lo que ocurre con sus correspondientes formas glicosiladas (Fig. 4) (López-Amorós y col., 2006).

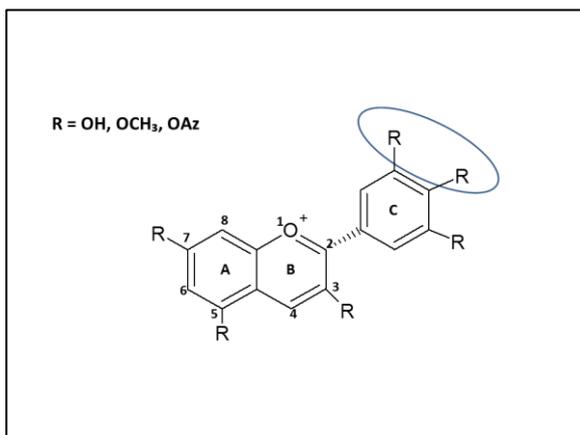


Figura 4.- Estructura general de un flavonoide.

La utilización de las legumbres para la alimentación tanto del ser humano como de los animales se remonta a tiempos inmemoriales. Su elevado contenido proteico las convierte en una importante fuente de interés nutricional. En estudios recientes se ha

observado que además de nutrir, también pueden ser beneficiosas en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades (Kingman, 1991; Zulet y Martínez, 1995; Frühbeck y col., 1997) como por ejemplo enfermedades neurodegenerativas (EP, ELA, PSP, EA...) (Xu y col., 2007), diabetes (Geil y Anderson, 1994) y cáncer (Persky y Van Horn, 1995; Rao y Sung, 1995). Constituyen junto a las verduras y el vino uno de los pilares básicos de la denominada “dieta mediterránea”.

En España, las legumbres más utilizadas en alimentación son las lentejas (*Lens culinaris* Medik. = *Lens esculenta* Moench.), judías (*Phaseolus vulgaris* L.) y garbanzos (*Cicer arietinum* L.).

Los principales componentes de estas legumbres son carbohidratos, proteínas y enzimas, fibra alimentaria, lípidos, vitaminas y minerales (Belitz y col., 2011) (Tabla 2). También poseen saponinas, compuestos fenólicos y, en algunas especies, heterósidos cianógenos.

Tabla 2.- Porcentaje de los principales componentes nutricionales de *Lens culinaris* Medik, *Phaseolus vulgaris* L. y *Cicer arietinum* L. (Modificado de: Tabla de Composición química de legumbres, Belitz y col., 2011).

% Composición total	<i>Lens culinaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cicer arietinum</i>
Carbohidratos	57,6	54,1	54,6
Proteínas	28,6	24,1	22,7
Fibra	11,9	19,2	10,7
Lípidos	1,6	1,8	5,0

Entre los componentes fenólicos se han identificado flavonoides, cumarinas y ácidos fenólicos (hidroxibenzóicos e hidroxicinámicos). Los flavonoides mayoritarios corresponden a flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianos y catequinas, estas últimas condensadas en forma de proantocianidinas. Proantocianidinas y antocianos se encuentran localizados principalmente en la testa de las semillas (Dueñas y col., 2003; Monagas y col., 2003).

Parece claro que el contenido en componentes polifenólicos determina su capacidad antioxidante, sin embargo, no se mantiene constante durante el procesado de las semillas, en especial durante la cocción y la germinación, que son procesos comúnmente utilizados para su consumo en alimentación:

- **Cocción:** Durante la cocción se originan modificaciones importantes en la composición de las legumbres, pero no únicamente por el propio proceso sino también por las condiciones previas y posteriores al mismo. En el caso de las judías negras se produce una disminución en el contenido de fenoles totales y flavonoides. También disminuye el contenido de antocianos. Por el contrario, considerando

los diferentes subtipos de ácidos fenólicos y flavonoides, los derivados de quercetina y kaempferol y los ácidos fenólicos no disminuyen significativamente (Ranilla y col., 2009). En el caso de las judías pintas se ha observado que la composición fenólica varía mucho en función de las condiciones previas a la cocción (humectación), de la temperatura a la cual se realiza (100°C o 121°C) y de si se han sometido o no a un proceso de escurrido posterior. Estudios recientes con este tipo de leguminosas muestran que se obtiene una mayor concentración de fenoles totales evitando el remojo previo y el escurrido posterior, probablemente, porque se evita la pérdida de compuestos hidrosolubles tanto en el agua de remojo como en el agua de cocción (Ranilla y col., 2009). En el caso de las antocianidinas totales, de los derivados de quercetina y de kaempferol, y ácido ferúlico, se obtienen mejores resultados si la cocción se realiza a 121°C, no se humedecen previamente y no se escurren al final del proceso. Por el contrario, en el caso de los ácidos fenólicos totales, flavonoides totales y derivados de ácido hidroxicinámico, se obtienen mejores resultados a 100°C.

En algunos casos se ha observado una menor influencia de las condiciones del proceso de cocción en el contenido fenólico, tal como indican Vidal-Valverde y col. (1994), tras el estudio de la composición fenólica de diferentes variedades de *Lens culinaris* L. Los autores concluyen que durante la cocción se produce un aumento en la concentración de taninos y catequinas libres, independientemente de si las semillas se han humedecido previamente o no con agua, ácido cítrico o bicarbonato sódico.

- **Germinación:** La germinación de las legumbres es un tratamiento sencillo y económico, que da como resultado un producto igual de natural que el de origen, permite además eliminar o inactivar ciertos factores antinutricionales y aumenta la digestibilidad de las proteínas y almidones (Dávila y col., 2003). También aumenta los niveles de aminoácidos libres y carbohidratos disponibles (López-Amorós y col., 2006). Los cambios metabólicos que se producen durante la germinación y que, lógicamente afectan a la composición, dependen de las condiciones del proceso, principalmente de la intensidad lumínica y de la duración del mismo.

Se han publicado diferentes estudios acerca de las modificaciones que se originan en los componentes de la matriz de la legumbre durante la germinación, observando que la composición varía de forma diferente dependiendo del tipo de leguminosa de que se trate. También se ha comprobado la importancia de humedecer las semillas previamente al proceso de germinación para permitir el desarrollo correcto del mismo (López-Amorós y col., 2006).

Se ha constatado que en lentejas, como consecuencia del proceso de germinación, se observa en general una variación en el contenido de ácidos fenólicos, aumentando los derivados hidroxicinámicos y disminuyendo ligeramente los derivados hidroxibenzóicos (López-Amorós, 2000; López-Amorós y col., 2006). En compuestos de tipo flavonoide también se han observado cambios importantes, destacando un incremento en la formación de glucósidos de flavonoles en judías

(López-Amorós y col., 1998) y la disminución de proantocianidinas (dímeros y trímeros) en lentejas (López-Amorós y col., 2006), debido a la condensación de éstas con otras unidades monoméricas (catequinas) por la acción de la polifenol oxidasa (Bartolomé y col., 1997).

Por otra parte, la germinación ejerce una gran influencia en el contenido en vitaminas ya que estimula la biosíntesis de determinadas vitaminas hidrosolubles, dando lugar en algunos casos a la aparición de vitamina C en lentejas (Frías y col., 2002).

El conocimiento de estas variaciones en la composición química es fundamental puesto que, aunque la cocción es el proceso más habitual al que se someten las legumbres, actualmente está adquiriendo gran importancia el consumo de semillas germinadas, como es el caso de la soja. Además, las variaciones en la concentración de los compuestos con actividad biológica originados como consecuencia de la germinación, se traducen en la modificación de su capacidad antioxidante. Por ello, la identificación y cuantificación de estos compuestos, puede emplearse para predecir los posibles efectos beneficiosos para la salud de las leguminosas germinadas (Dueñas y col., 2001).

5. POLIFENOLES Y PREVENCIÓN DE LA OXIDACIÓN

Los compuestos fenólicos se definen como derivados no nitrogenados cuyo ciclo o ciclos aromáticos proceden principalmente del metabolismo del ácido sikímico y/o de un poliacetato. Por tanto, biogenéticamente derivan de la ruta metabólica del ácido sikímico que conduce a la biosíntesis de ácidos fenólicos con la participación posterior de la vía del acetato malonato que contribuye a la elongación de dichos ácidos mediante la incorporación de una o varias unidades de acetilCoA (Fig. 5).

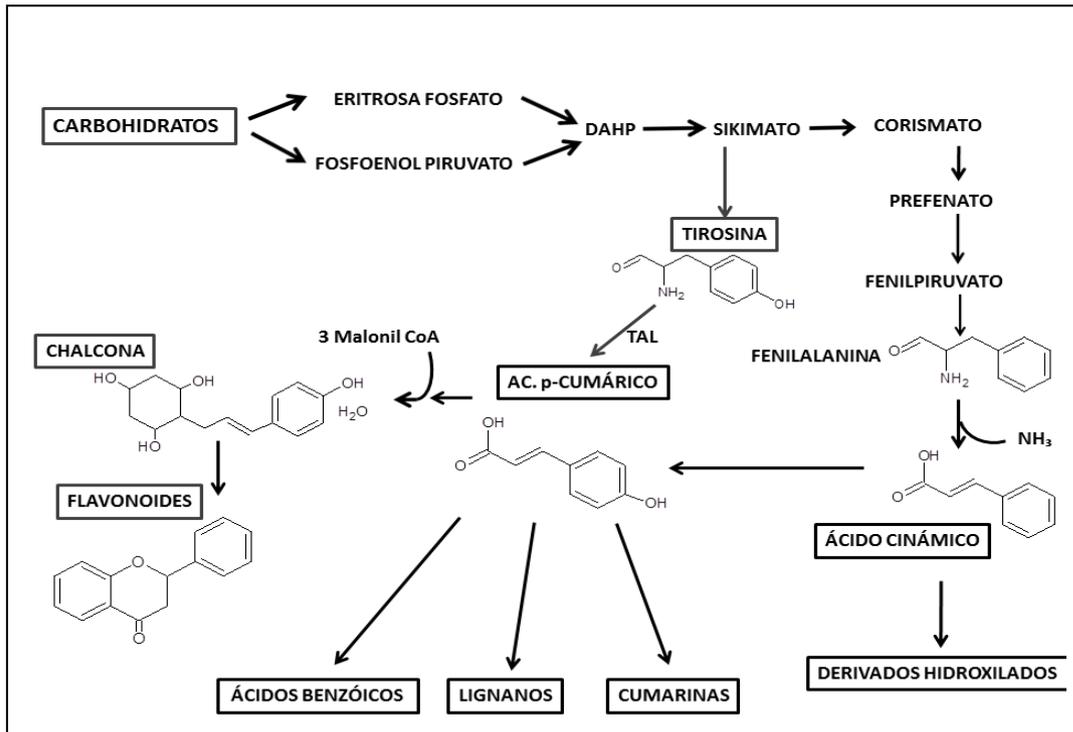


Figura 5.- Principales procesos implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos de origen vegetal.

Los flavonoides como grupo incluyen compuestos constituidos por dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono la cual forma parte, en la mayoría de ellos (excepto en el caso de las chalconas y auronas), de una estructura piránica. La clasificación en subgrupos de flavonoides se basa en el grado de oxidación de esa cadena intermedia y del patrón de hidroxilación de la estructura (Bruneton, 2001) (Fig. 6).

Casi todos los flavonoides están representados en los alimentos. Se han identificado flavonas (apigenina, luteolina, etc.) por ejemplo en el perejil y el apio; flavonoles (quercetina, kaempferol, etc.) en cebollas, brócoli y puerro, entre otros alimentos; isoflavonas (genisteína, daidzeína, etc.) en las semillas de soja; flavanonas (hesperetina, naringenina, etc.) en cítricos, orégano y vino; flavanoles (catequina, epicatequina, epigallocatequina, etc.) tanto en forma de monómeros como oligómeros o polímeros (taninos catéquicos) en las hojas de té, vino tinto, chocolate, etc. Por último, las

antocianidinas, como responsables de algunas coloraciones de los vegetales, se han identificado en frutos (arándanos, fresas, etc.), hojas y bulbos (cebolla roja).

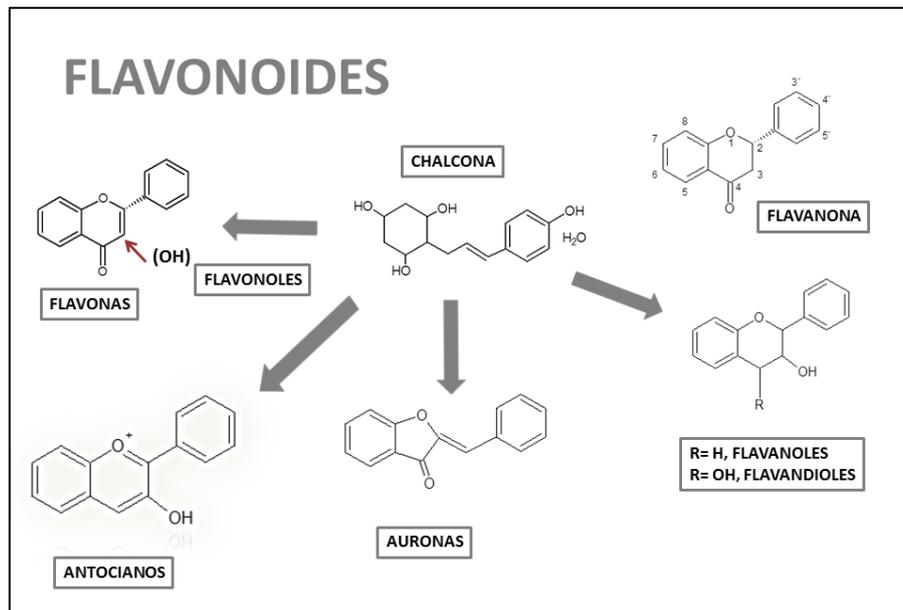


Figura 6.- Principales subgrupos de flavonoides.

Son numerosos los estudios científicos que demuestran la eficacia antioxidante de los compuestos polifenólicos y de los flavonoides en particular, y sus posibles beneficios para la prevención y tratamiento de enfermedades que cursan con procesos oxidativos, como son las neurodegenerativas, las cardiovasculares y los procesos inflamatorios. Los compuestos fenólicos son capaces de captar radicales libres y, por tanto, evitar la oxidación de las moléculas del organismo.

Heo y Lee (2005), demostraron que la capacidad antioxidante de diferentes frutas variaba en función de sus componentes fenólicos (fresa > plátano > naranja). Por ejemplo, en un estudio posterior realizado *in vitro* sobre *Physalis peruviana*, *Vaccinium corymbosum* y *Vaccinium macrocarpon*, se demostró que era *V. corymbosum*, el que contenía mayor cantidad de compuestos polifenólicos y por tanto, mayor actividad antioxidante y de unión a la albúmina plasmática (Namiesnik y col., 2014).

Investigaciones realizadas con extractos obtenidos a partir del fruto del granado (*Punica granatum* L.), muy rico en compuestos polifenólicos, han verificado sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Estos extractos son capaces de disminuir la expresión de enzimas como iNOS y ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) e inhibir la activación del NF- κ B y la fosforilación de las proteínas MAPKs (Tavasoli y col., 2014).

En cuanto a los posibles beneficios de los polifenoles en la prevención de alteraciones del SNC, diversos trabajos refieren su eficacia para corregir desórdenes mentales y enfermedades neurodegenerativas, probablemente como consecuencia de su potencial antioxidante.

Así por ejemplo, la cúrcuma, condimento alimentario muy utilizado en la cocina india, rico en curcumina, compuesto resultante de la condensación de dos unidades fenil propánicas [(1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona], ha demostrado ser capaz de reducir los depósitos de proteína A β en el cerebro de ratones, prevenir la pérdida de neuronas postsinápticas y prevenir la deficiencia de memoria espacial inducida en un modelo de EA en ratones (Da Rocha y col., 2011).

Los polifenoles interactúan con las diferentes cascadas de señalización que existen en las neuronas; inducen la angiogénesis y el crecimiento de nuevas neuronas en el hipocampo; y son capaces de reaccionar directamente con ROS y con agentes proinflamatorios que se generan en el cerebro durante el metabolismo normal de éste así como durante el envejecimiento. Se ha comprobado que reducen el estrés oxidativo y protegen frente a los depósitos de la proteína A β (Spencer, 2010). Además podrían actuar como reguladores de la neurotransmisión colinérgica y serotoninérgica.

Khan y col. (2012), en un estudio realizado en ratones tratados con estreptozotocina, como modelo experimental de EA, observaron que la naringenina era capaz de contrarrestar el daño oxidativo y la disminución de los niveles de las enzimas CAT, GPx, GR y SOD inducidos por esta sustancia.

Algunos ensayos clínicos parecen confirmar que los polifenoles reducen el riesgo del desarrollo de demencia. En un estudio observacional en el que participaron adultos mayores sanos (≥ 60 años), se comprobó que tras la administración durante 12 semanas de zumo de arándano, con elevado contenido polifenólico, mejoraba significativamente su capacidad memorística (Crews y col., 2005). Los extractos de *Ginkgo biloba* L, ricos en flavonoides y diterpenos, inducen efectos positivos en la memoria, el aprendizaje y la concentración, aunque los mecanismos farmacológicos por los cuales se producen estos efectos no están del todo claros, se postula que podrían estar relacionados con una reducción de los niveles de ROS, la mejora del metabolismo neuronal, el incremento del flujo sanguíneo en el cerebro por su actividad antiagregante plaquetaria, la modulación de la permeabilidad de la membrana, la posible interacción con receptores muscarínicos, la protección del sistema dopaminérgico del núcleo estriado y la regulación de los canales de calcio, cloro y glutamato (Vauzour, 2012).

Por tanto, el consumo de alimentos y bebidas ricas en polifenoles podría reducir o atenuar la neurodegeneración relacionada con diferentes enfermedades (EA, EP) y con ello, prevenir o revertir alteraciones del rendimiento cognitivo.

De todos los compuestos flavonoídicos, los antocianos son compuestos sobre los que se está focalizando el interés de numerosos grupos de investigación en la actualidad.

6. ANTOCIANOS

Los antocianos son compuestos polifenólicos de origen vegetal, ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en plantas medicinales como en alimentos vegetales, responsables de los colores rojo, azul, malva, rosa, púrpura y violeta de diferentes frutos y flores. Se encuentran en diferentes concentraciones en casi todas las angiospermas, excepto en algunas familias del orden Caryophyllales. También pueden encontrarse ocasionalmente en brácteas (Bromeliaceae), hojas (*Coleus* spp.), peciolo (rapóntico), raíces (rábanos) o bulbos (cebolla roja). Sus funciones fisiológicas en los vegetales podrían estar relacionadas con un mecanismo de defensa para protegerse de la luz ultravioleta (hojas) o con la atracción de insectos polinizadores en el caso de las flores.

Numerosos estudios científicos han constatado sus propiedades saludables, principalmente relacionadas con sus actividades antiinflamatoria y antioxidante a nivel de diferentes tipos de células y tejidos.

Como consecuencia de su carácter polifenólico y de esas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, los antocianos podrían proponerse como candidatos potenciales para la prevención y tratamiento de la neurodegeneración. Sin embargo, aunque existen estudios científicos *in vitro* que evidencian sus efectos neuroprotectores sobre células y tejidos, hasta hace relativamente poco tiempo no se había evidenciado su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, así como su cinética de distribución en los tejidos cerebrales, por lo que se cuestionaba su eficacia en la prevención de los procesos del envejecimiento cerebral (Joseph y col., 2000; Youdim y col., 2004; Andrés-Lacueva y col., 2005).

6.1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Son compuestos fenólicos biosintetizados a través del metabolismo del ácido sikímico. Como ocurre con el resto de flavonoides, su estructura es consecuencia de la elongación del fenilpropano con tres unidades de malonilCoA, dando lugar a la chalcona correspondiente (Fig. 5). A partir de ésta, tras varias reacciones de ciclación, hidroxilación y reducción (reductasa NADPH dependiente) y la intervención final de transferasas (UDP-transferasas), se originan los antocianósidos.

En las plantas se encuentran en forma de heterósidos (antocianósidos o antocianinas). Al ser sus geninas (antocianidinas) derivadas del catión 2-fenilbenzopirilio (ión flavilio), algunos autores les otorgan categoría propia, fuera del grupo de los flavonoides.

Son compuestos inestables en medio neutro y alcalino, así como en presencia de oxígeno, a temperaturas elevadas y tras su exposición a luz UV. En forma de heterósidos son solubles en agua y en alcoholes, no así la mayoría de sus geninas. En

disolución, se encuentran en equilibrio cuatro formas: catión flavilio, base quinoidal, base hemiacetal y chalcona. La cantidad de cada una de estas formas en equilibrio depende del pH y de la estructura de la antocianidina. En la naturaleza, las antocianidinas a $\text{pH} < 2$ se presentan en forma de catión flavilio, característica única de estos compuestos que determina su absorción, metabolismo, biodisponibilidad y por tanto su acción biológica (Bruneton, 2001) (Fig. 7).

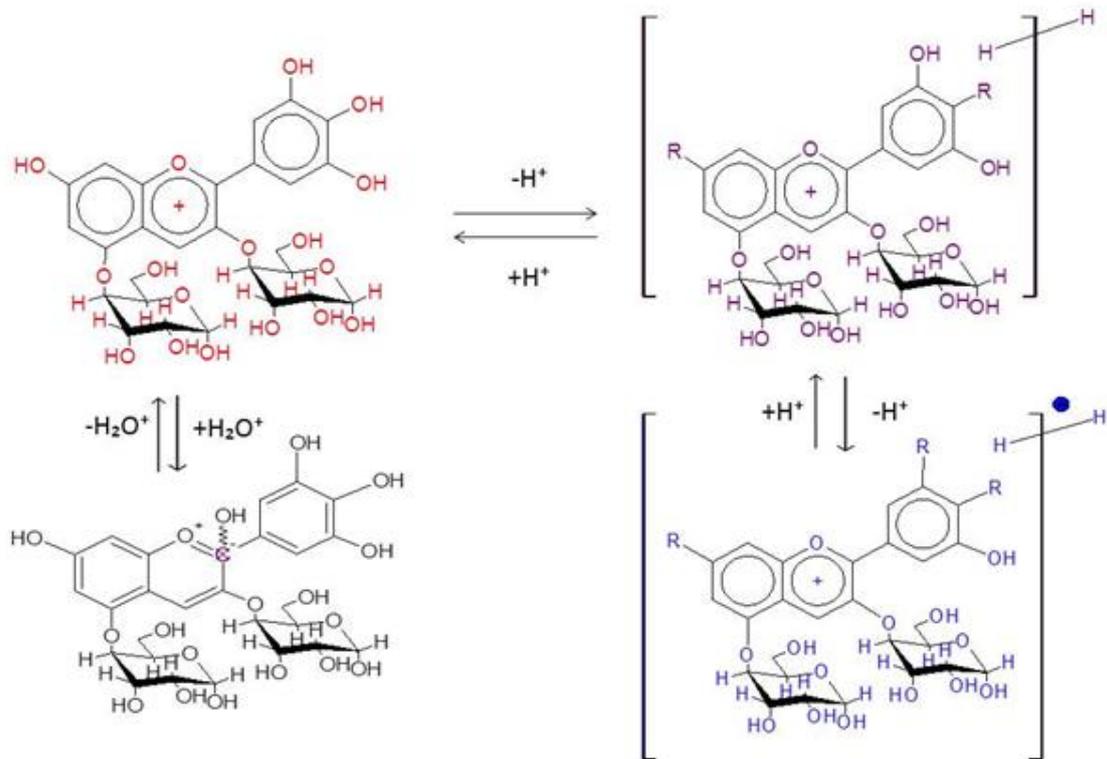


Figura 7. -Estabilidad de la estructura de las antocianinas a diferentes pH en solución acuosa. Pseudobase (incolora), ion flavilio (rojo), anhidro base (morado), anión anhidro base (azul) (Modificado de Yoshida y col., 2009).

Por lo general, las antocianidinas establecen una unión heterosídica mediante el hidroxilo dispuesto sobre el C-3 del anillo C (Fig. 8). No obstante, en casos especiales, dicha unión se realiza sobre los hidroxilos situados en C-5 o C-7 del anillo A. También se han observado glicosidaciones en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B. Los azúcares más frecuentes son glucosa, ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa, en forma de mono u oligosacáridos, principalmente di- y trisacáridos. Estos azúcares pueden estar también acilados con un amplio rango de ácidos aromáticos o alifáticos, aunque lo más frecuente es la acilación por ácidos cinámicos. La gran variabilidad de sustituyentes puede dar lugar a más de 600 antocianinas naturales diferentes cuyos pesos moleculares pueden variar entre 400 y 1200 (Prior y Wu, 2006).

Las antocianidinas más abundantes en la naturaleza son cianidina, pelargonidina, malvidina, delphinidina, peonidina y petunidina (Fig. 8). Se ha comprobado que la coloración depende del tipo de sustituyentes incluidos en el anillo B. El color es más intenso a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo libres, disminuyendo cuando éstos se encuentran metilados (Tsuda, 2012).

Estos compuestos fenólicos son susceptibles de oxidarse dando lugar a un radical fenoxi, estabilizado por la posibilidad de resonancia, lo que le confiere propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres, así como de protección a los tejidos frente a la peroxidación lipídica (Bruneton, 2001).

Compuesto	R ₁	R ₂
Cianidina	OH	H
Pelargonidina	H	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OH	OCH ₃

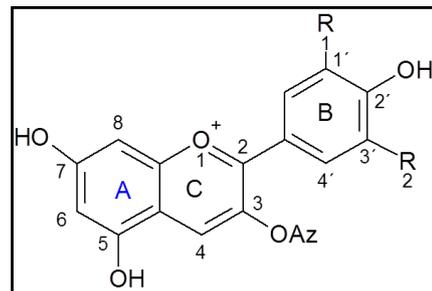


Figura 8.- Estructura de las principales antocianidinas.

6.2. ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Las actividades farmacológicas atribuidas a los antocianos son numerosas, sin embargo, hasta finales del siglo XX, sus principales indicaciones terapéuticas se limitaban al tratamiento de síntomas ligados a la fragilidad capilar-venosa, ya que disminuyen la permeabilidad de los capilares y aumentan su resistencia. También, algunos extractos con alto contenido en antocianos se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades beneficiosas en el mantenimiento de la visión (Bruneton, 2001).

Actualmente en España, los antocianos aislados no se incluyen en ningún tipo de medicamento. Lo que si se emplean son plantas medicinales y extractos obtenidos de las mismas, que tienen en su composición estos compuestos. Es el caso por ejemplo del arándano (*Vaccinium myrtillus* L.), cuyos frutos maduros y frescos, que según la Real Farmacopea Española deben contener como mínimo un 0,3% de antocianinas expresadas en cianidina-3-glucósido, se utilizan para la obtención de extractos ricos en antocianósidos indicados en insuficiencia venosa, hemorroides, varices, flebitis y fragilidad capilar. También con un contenido abundante de antocianósidos se encuentran los brotes y frutos de grosellero negro (*Ribes nigrum* L.), indicados en problemas asociados con la insuficiencia venosa (CGCOF, 2011). Tanto a los frutos de *Vaccinium myrtillus* como a los de *Ribes nigrum*, se les atribuyen tradicionalmente efectos beneficiosos para el tratamiento de alteraciones oculares como retinitis pigmentaria, retinopatías sean o no de origen diabético, miopía y glaucoma.

Tras la realización de diferentes estudios experimentales y ensayos clínicos en humanos, se podría decir que los antocianósidos de ambas especies reducen la fatiga ocular, mejoran la adaptación a la oscuridad y la visión nocturna, restauran la agudeza visual tras la exposición a luz intensa y mejoran el flujo sanguíneo en la retina en casos de glaucoma (Tsuda, 2012; Shim y col., 2012; Vanaclocha y Cañigüeral, 2003).

En la actualidad, la Agencia Europea del Medicamento solo ha aprobado el uso tradicional de las hojas de *Ribes nigrum*, ricas en flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, para el tratamiento de dolores articulares leves y para favorecer el flujo urinario en alteraciones urinarias también leves (EMA, 2010a). Por el contrario, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011) no ha admitido la alegación de salud relacionada con la mejora de la adaptación visual a la oscuridad para los antocianinas de *Ribes nigrum* (delfinidina-3-rutinósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido), debido a una insuficiente constatación científica de sus efectos en el hombre.

Además del grosellero negro, la EMA (2010b) ha aprobado el uso bien establecido del extracto seco de la hoja de *Vitis vinífera* L. por vía oral, para el tratamiento de la insuficiencia venosa caracterizada por la presencia de venas varicosas, dolor, cansancio, picor, hinchazón, sensación de pesadez y tensión y calambres en las pantorrillas. También ha aprobado el uso tradicional por vía oral o en aplicación tópica para aliviar los síntomas relacionados con alteraciones menores de la circulación venosa, mejorar la sensación de picor y quemazón debidas a hemorroides, y para mejorar la fragilidad capilar cutánea.

Según diferentes autores, una gran parte de las actividades farmacológicas descritas hasta el momento para los antocianósidos podrían estar relacionadas con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Vauzour, 2012; Rendeiro y col., 2012; Limón y col., 2010).

6.2.1 Actividad Neuroprotectora

Estudios realizados en cultivos celulares de astrocitos y microglía estimulados por lipopolisacáridos (LPS), indican que algunos polifenoles como quercetina, catequina y galato de epigallocatequina (EGCG) son capaces de bloquear la respuesta inflamatoria al inhibir la iNOS y la expresión de la COX-2, inhibiendo la producción de NO, la liberación de citocinas proinflamatorias y la generación de ROS. Parece ser que los flavonoides podrían manifestar estos efectos a través de la modulación directa de las vías de señalización de las cinasas dependientes de proteínas y de lípidos. Así por ejemplo, se ha comprobado que inhiben las cascadas de señalización de las MAPKs

como la proteína p38 y las ERK 1 y 2, las cuales regulan, en células gliales estimuladas, la expresión de iNOS y de TNF α (Vauzour y col., 2008a; 2008b).

Como se ha comentado anteriormente, la inflamación es un proceso que aparece en numerosas enfermedades neurodegenerativas. El factor NF κ B juega un papel importante como regulador en la expresión de genes que afectan a procesos inmunológicos, inflamatorios y apoptóticos. Es por ello, que en numerosos estudios se ha observado como diferentes antocianidinas y extractos ricos en antocianinas son capaces de interactuar en la vía del factor NF κ B. Así las antocianinas inhiben la translocación del NF κ B y por tanto disminuyen la expresión de la iNOS y COX-2 (Pascual-Teresa, 2014).

Las antocianidinas podrían regular la vía NF κ B a través de otro mecanismo: el sistema del proteasoma. La actividad proteasoma controla la degradación de las proteínas celulares y además está muy ligada a la transducción de señales, desarrollo y progresión del ciclo celular, procesamiento de antígenos, respuesta inmune, inflamación y protección contra el estrés oxidativo (Pascual-Teresa, 2014). Fallos en este sistema podrían contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA o la EP. En un estudio realizado en células de leucemia promielocítica humana se evaluó el efecto producido por algunas antocianinas y antocianidinas, sobre la actividad proteasoma inducida por quimotripsina. Se observó que todas las antocianinas y antocianidinas eran capaces de inhibir dicha actividad proteasoma en este modelo, siendo pelargonidina y su derivado metoxilado, las que presentaron mayor actividad (Dreiseitel y col., 2008).

También se han realizado algunos estudios sobre los efectos neuroprotectores de los antocianos tanto *in vivo* como *in vitro*. No obstante, como ya se ha comentado, en la mayoría de las investigaciones se han empleado extractos de composición química compleja, siendo muy escasos los trabajos en los que se utilizan antocianos aislados. En cuanto a los efectos inducidos en el hombre, solamente se han publicado algunos trabajos de investigación clínica en los que se han empleado extractos de frutos, zumos o plantas medicinales ricos en estos compuestos. A continuación se comentan los mas relevantes:

6.2.1.1. Ensayos *in vitro*:

En un estudio realizado con células de neuroblastoma humano, se ha evaluado el efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, de una mezcla de antocianinas aisladas y purificadas de la testa de semillas de soja (*Glycine max* (L.) Merr., cv Cheongja). Se evaluó además el posible efecto neuroprotector frente el estrés oxidativo de los ácidos siálicos libres celulares liberados por glicoproteínas o gangliósidos, así como la posible relación entre los efectos de éstos y las antocianinas. Los resultados demostraron que la mezcla de antocianinas (delfinidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-glucósido y petunidina-3-*O*-glucósido) es capaz de disminuir el daño

oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno de una forma concentración dependiente, así como disminuir la generación intracelular de RL. Para identificar su mecanismo de acción antioxidante, se midieron los niveles de expresión de las cinasas ASK1-JNK y p38 que, como ya se ha comentado, participan en la vía de señalización de las MAPKs y regulan la muerte celular por apoptosis (Kim y col., 2012a). Las antocianinas fueron capaces de inhibir la fosforilación inducida por peróxido de hidrógeno de las diferentes MAPKs, impidiendo la muerte celular por apoptosis. Se comprobó además que estimulaban la expresión de la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO1) y la posibilidad de reclutar ácidos siálicos libres en las células neuronales por activación de la Neu-1 sialidasa.

También se ha estudiado la actividad neuroprotectora de varios extractos de frutos consumidos en alimentación (naranja, plátano y fresas), sobre cultivos de células neuronales PC₁₂. Se comprobó que los extractos que contenían una mayor concentración de fenoles totales y antocianinas, principalmente cianidina-3-glucósido, correspondientes a las fresas, presentaban una mayor eficacia antioxidante e inhibidora de la apoptosis celular inducida por estrés oxidativo (Heo y Lee, 2005).

En un estudio realizado sobre células de glioblastoma humanas (U87) sometidas a una privación de glucosa y oxígeno para simular las condiciones de isquemia *in vivo*, se comprobó que extractos de antocianinas obtenidos de semillas negras de soja (*Glycine max* L.), ejercían un efecto protector sobre la viabilidad celular (Kim y col., 2012b).

En otro estudio realizado sobre células BV₂ de microglía de ratón, se observó que las antocianinas aisladas de la testa de semillas de soja negra, eran capaces de inhibir significativamente la inflamación inducida por LPS, mediante la disminución de la sobreexpresión de iNOS, COX-2, TNF- α e IL-1 β . Además, se evidenció su capacidad para inhibir la translocación nuclear del NF κ B, a través de la disminución de la degradación del inhibidor del NF κ B, así como la fosforilación extracelular de cinasas (Jeong y col., 2013).

Recientemente, en un estudio realizado en un modelo de Parkinson con cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas de rata, se observó que extractos ricos en antocianinas y proantocianinas ejercían un mayor efecto neuroprotector frente a la toxicidad inducida por rotenona, que extractos con mayor concentración en otros tipos de polifenoles. Se emplearon en el estudio extractos enriquecidos en antocianinas, proantocianinas y ácidos fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* L., *Morus alba* L., *Ocimum basilicum* L., *Prunus domestica* L., *Ribes nigrum* L., *Vaccinium corymbosum* L. y *Vitis vinifera* L. Los extractos de las dos últimas especies produjeron una mejoría en la disfunción mitocondrial, vía cadena de transporte electrónico. También se observó que el extracto de *V. corymbosum* L., con antocianinas y proantocianinas, era capaz de evitar el proceso neuroinflamatorio asociado a la activación microglial en la línea celular BV2 de microglía de ratón (Strathearn y col., 2014).

También se ha confirmado que las antocianinas activan el factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nfr2) en células β , cuando estas están sometidas a un proceso de estrés oxidativo. Por su parte, Nfr2/HO-1 regulan negativamente el proceso de autofagia de las células β , por lo que se incrementa la viabilidad de éstas. El Nfr2 tiene como misión la neutralización de la acción negativa de metabolitos endógenos y toxinas medioambientales, ya que es el encargado de regular la transcripción de los genes que codifican enzimas antioxidantes como GPx, NQO1, HO-1, etc. Por tanto, este factor participa activamente en la detoxificación celular de ROS (Pascual-Teresa, 2014).

6.2.1.2. Ensayos *in vivo*

En estudios realizados en ratones se ha observado que el consumo de arándanos, ricos en antocianos, tiene un efecto positivo sobre la memoria tanto a corto como a largo plazo, después de ocho semanas de administración. También parece ser eficaz para revertir el déficit en la funcionalidad motora relacionada con el envejecimiento y la memoria espacial (Barros y col., 2006). Estos beneficios sobre la memoria podrían estar más relacionados con un incremento en la fosforilación de las cinasas extracelulares reguladas por señales ERK-1 y 2, que con una interacción con calcio-calmodulina-cinasas (CaMK II y CaMK IV) o con proteincinasa A (Fig. 9) (Williams y col., 2008).

También se ha evaluado la capacidad de las antocianinas para modular la actividad y expresión de enzimas antioxidantes en animales. En un estudio realizado con ratas Wistar macho, alimentadas con antocianinas obtenidas de un extracto de mora (*Rubus fruticosus* L.), se determinaron las actividades GPx, SOD y CAT, los niveles de glutatión y la peroxidación lipídica en tejido cerebral. Se observó que, en comparación con el grupo control, la peroxidación lipídica en tejido cerebral disminuía en un 34% y los niveles de glutatión se incrementaban significativamente (1,6 veces más) en el grupo de ratas tratado con el extracto de antocianinas. En cuanto a la actividad sobre los sistemas enzimáticos antioxidantes, se observó un ligero incremento en la actividad SOD total y un incremento de la actividad GPx. Por el contrario, la actividad CAT no se vio afectada (Hassimotto y Lajolo 2011).

En otro estudio realizado con 6 ratones de 7 días de vida a los que se indujo un cuadro neurotóxico con etanol, la administración intraperitoneal de cianidina-3-glucósido purificada (99%) mejoró significativamente el cuadro tóxico. Esto parece ser consecuencia de un efecto inhibitorio de la activación de la caspasa-3 mediada por etanol, así como del cuadro neurodegenerativo provocado por este agente tóxico y de la activación microglial en el córtex cerebral de los animales tratados. En este estudio se comprobó que la cianidina-3-glucósido es capaz de inhibir la actividad de la glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK 3β), mediador potencial de la neurotoxicidad inducida por etanol, mediante un mecanismo que implica un incremento en la fosforilación de un residuo de serina 9 y una disminución en la fosforilación de tirosina 216. Se observó

además que disminuye la liberación del malondialdehído (MDA) originado como consecuencia de la peroxidación lipídica inducida por etanol (Ke y col., 2011).

Por otra parte, teniendo en cuenta que la administración de etanol induce un incremento drástico en la expresión de la proteína p47-phox (proteína que actúa como reguladora de la actividad de uno de los enzimas que participan en la liberación de ROS en el cerebro, la NADPH oxidasa) (Fig. 9), la disminución observada en la expresión de dicha proteína, tras la administración de cianidina-3-glucósido, podría ser uno de los mecanismos implicados en la protección que ejercen las antocianidinas sobre el daño cerebral oxidativo inducido por el agente neurotóxico (Ke y col., 2011).

En diferentes estudios realizados en ratones viejos, se ha observado que el consumo de frutos de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) que contienen antocianósidos, entre otros compuestos fenólicos, disminuye la progresión de enfermedades neurodegenerativas así como la pérdida de la funcionalidad de los tejidos neuronales, modulando además las respuestas inflamatorias (Pappas y Schaich, 2009).

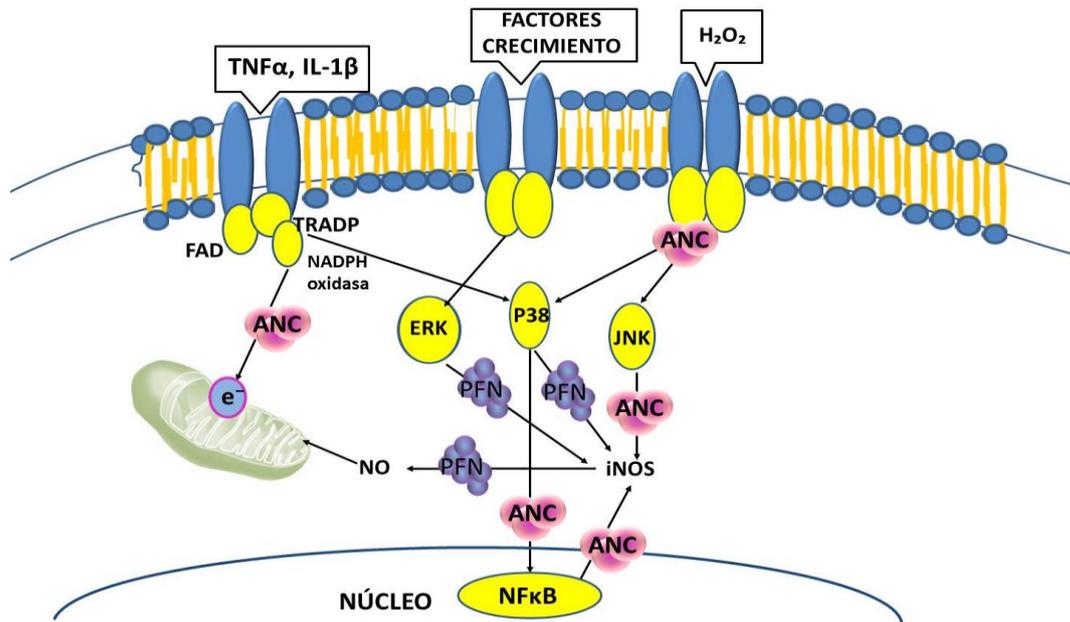


Figura 9.- Mecanismos de acción implicados en los efectos de las antocianinas sobre la neurodegeneración provocada por estrés oxidativo-inflamación. En un estado de estrés o daño celular, las células gliales se activan liberando al medio citoquinas proinflamatorias (IL β , TNF α), especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y factores de crecimiento, que actúan sobre las neuronas dañándolas a largo plazo. ANC (antocianinas), PFN (polifenoles), e⁻ (cadena de electrones mitocondrial), P38, JNK, ERK (MAPK, proteincinasas).

Con objeto de estudiar la eficacia de estos compuestos en la prevención y tratamiento de la EA, se han diseñado modelos experimentales con animales. Por ejemplo, la administración intracerebroventricular de estreptozotocina en ratas, origina un cuadro de demencia similar al observado en esta enfermedad: metabolismo de glucosa alterado, disminución del aprovechamiento celular de glucosa, y altos niveles de moléculas fosforiladas, lo que deriva en un déficit progresivo de la memoria y del aprendizaje. Gutierrez y col. (2014), utilizando el modelo citado, investigaron la capacidad de las antocianinas para prevenir los déficits de memoria inducidos experimentalmente en 10 ratas macho, así como los niveles de nitritos/nitratos y las actividades acetilcolinesterasa, Na^+/K^+ ATPasa y Ca^{2+} ATPasa, alterados en la enfermedad. Los animales se alimentaron con antocianinas por alimentación forzada (200 mg/kg/día) durante siete días. El grupo control recibió solución salina 2 ml/kg/día. En este estudio se observó que el pretratamiento con la dosis indicada de antocianinas, fue capaz de prevenir la pérdida de memoria inducida por la estreptozotocina (3mg/kg, inyección intracerebroventricular). Además, las antocianinas previnieron el incremento de la actividad acetilcolinesterasa, así como el incremento de la actividad Ca^{2+} ATPasa y la disminución de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, inducidas por esta sustancia.

6.2.1.3. Ensayos clínicos

En cuanto a los ensayos realizados en el hombre, los resultados no son del todo concluyentes. En un estudio doble ciego, controlado con placebo, con voluntarios sanos mayores de 50 años alimentados con zumo de arándano rojo durante seis semanas, no se observó correlación entre el consumo de dicho zumo y la mejoría de la función neuropsicológica. Sin embargo, sí que se observó una mejoría de las funciones memorísticas (Pappas y Schaich, 2009).

En otro ensayo clínico aleatorizado, cruzado, realizado con 12 sujetos sanos no fumadores, se observó que la administración de diferentes zumos ricos en antocianidinas no induce ningún cambio a nivel del sistema de defensa antioxidante en plasma, si bien el tamaño de la muestra no se considera suficientemente representativo (Ellinger y col., 2012).

Los ensayos clínicos más relevantes relacionados con las propiedades neuroprotectoras de las antocianidinas, realizados en los últimos 12 años, quedan reflejados en la Tabla 3.

Tabla 3.- Ensayos clínicos publicados sobre la eficacia de los antocianos sobre afecciones del SNC. Azai: frutos de *Euterpe oleracea*, Arecaceae; camu-camu: frutos de *Myrciaria dubia*, Myrtaceae.

AUTOR	Nº PACIENTES	TIPO ESTUDIO/DURACIÓN	PREPARADO	RESULTADOS
Engelhart y col., 2002	5395 adultos (> 55 años)	Poblacional de cohortes/6 años	Dieta rica en antioxidantes (espinacas, arándano rojo, etc.)	Disminución de la incidencia de EA
Pappas y Schaich, 2009	Adultos (>50 años)	Doble ciego, controlado con placebo/2 semanas	Zumo de arándano rojo	Mejoría en funciones memorísticas
Krikorian y col., 2010	16 ancianos (76,2 ± 5,2)	verum (9)-Placebo (7) /12 semanas	Zumo de arándano	Mejoría en la memoria
Gao y col., 2012	367 mujeres (30-45 años) 438 hombres (40-75 años)	Poblacional de cohortes /6 años mujeres /4 años hombres	Dieta rica en subclases de flavonoides (antocianinas)	Disminuye el riesgo de EP en hombres, pero no en mujeres
Ellinger y col., 2012	Adultos (18-50 años, no fumadores)	Ensayo cruzado aleatorizado y controlado	400 ml zumo (44% azai; 12% camu-camu; 44% mora)	Estabiliza el balance pro/antioxidante

Se han publicado diversos ensayos clínicos en los que se evalúan los beneficios de la administración de antocianinas para el tratamiento de otras enfermedades (cardiovasculares, cáncer, hiperlipidemia) o se valoran los procesos de su absorción y metabolización en el hombre (Ke y col., 2011; Czank y col., 2013; Tian y col., 2006).

6.2.2. Actividad cardiovascular

A nivel cardiovascular, parece confirmado que el consumo de frutos ricos en antocianidinas disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular asociada a la edad (Tsuda, 2012). Este efecto cardioprotector está relacionado posiblemente, entre otros factores, con una actividad protectora del daño endotelial inducido por TNF- α e implicado en el proceso inflamatorio aterosclerótico (Speciale y col., 2010). En estudios realizados con células endoteliales vasculares de aorta bovina y de arteria hepática de rata, se observó que la cianidina es capaz de bloquear la acción del TNF- α y por tanto la apoptosis celular en estas células a través de diferentes mecanismos, como la activación de proteínasas (Akt) y la expresión de enzimas óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y tioredoxina (Xu y col., 2007). A este nivel se demostró que la cianidina es capaz de inducir la expresión del factor Nfr2 en células endoteliales, así como de inducir la acción de la HO-1, por lo que se demuestra una acción beneficiosa sobre el sistema cardiovascular (Pascual-Teresa, 2014).

Se ha demostrado que en las lesiones ateroscleróticas las concentraciones de peroxinitrito son altas. Paixao y col. (2011), utilizando un modelo de toxicidad celular inducido por peroxinitrito en células endoteliales, comprobaron que delfinidina, pelargonidina y cianidina, disminuyen la defosforilación de Akt inducida por peroxinitrito. Por tanto, ejercen un efecto protector frente a la apoptosis vía inactivación

del fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K)/Akt, como mecanismo preventivo de aterosclerosis.

La delfinidina, como ocurre con otros compuestos fenólicos, también es capaz de inhibir la apoptosis de células endoteliales mediante el incremento de la expresión de eNOS a través de la activación de la proteincinasa activada por mitógeno 1 y 2 (MEK 1/2) y además, prevenir el proceso inflamatorio mediante la inhibición de mediadores de la inflamación (Martin y col., 2003). Esta antocianina inhibe además la agregación plaquetaria (Shim y col., 2012).

Asimismo, uno de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares es la obesidad. Se ha comprobado que las antocianidinas inhiben la acumulación de grasa corporal, probablemente a través de un efecto inhibitorio de la síntesis lipídica en hepatocitos y regulación de la distribución de colesterol en los distintos tejidos (Pascual-Teresa, 2014). También podría estar implicado un mecanismo relacionado con la capacidad de las antocianidinas para inhibir el enzima PI3K antes mencionada. Como se ha comprobado recientemente, este enzima regula el equilibrio entre anabolismo y catabolismo celular y su inhibición induce una disminución en el almacenamiento de depósitos grasos y un incremento en su consumo en forma de energía, consiguiendo la reducción de un 20% en el peso en animales de experimentación sometidos a dieta grasa (Ortega-Molina y col., 2015).

6.2.3. Otras actividades

Son numerosos los estudios dedicados a la comprobación de la actividad antioxidante de estos compuestos fenólicos, actividad que parece estar relacionada como ya se ha comentado, con las propiedades neuroprotectoras, anticancerosas y antiinflamatorias evidenciadas para estos compuestos (D'Archivio y col., 2010; Wang y col., 2009).

Diferentes estudios científicos han puesto de manifiesto que las antocianidinas poseen actividad antidiabética debido a su capacidad protectora de las células β pancreáticas (Zhang y col., 2011), normalizadora de niveles de glucosa plasmática e incrementadora de la sensibilidad de la insulina en los tejidos periféricos, evitando una gluconeogénesis excesiva (Tsuda, 2012).

6.3. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

Aunque la actividad antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora de los antocianos (antocianinas y antocianidinas) ha sido confirmada en diferentes tipos de células y tejidos, antes de poder recomendar su utilización para la salud humana, es importante comprobar si estas moléculas o sus metabolitos activos son absorbidos en el aparato

digestivo y una vez absorbidos, si pueden acceder a los tejidos cerebrales traspasando la barrera hematoencefálica.

Hasta hace pocos años se pensaba que los antocianos, tanto en sus formas heterosídicas como en forma de geninas, no se absorbían cuando eran ingeridos por medio de la dieta. Posteriormente, se ha verificado dicha absorción tanto en animales como en el hombre. Las antocianinas son polifenoles que se absorben intactos, detectándose en plasma en la misma forma en la que aparecen en los vegetales (heterósidos), si bien la cantidad absorbida es relativamente baja (Wallace, 2011).

Efectivamente, estudios realizados en humanos con extractos y zumos de distintos tipos de bayas coloreadas ricas en antocianos han puesto de manifiesto que, tras su administración oral, las formas heterosídicas pueden detectarse en plasma, siendo posteriormente excretadas a través de la orina. Aunque esta absorción es rápida, el porcentaje de compuestos absorbido es bajo y depende del tipo de antocianina. En general, se ha observado que las antocianinas cuya genina es la cianidina se absorben más, siendo mayor la absorción cuanto mayor es la glicosidación de la genina (Prior y Wu, 2006).

Muchas antocianinas parecen ser estables en el medio ácido del estómago por lo que las formas glicosiladas podrían absorberse a ese nivel, siendo posteriormente excretadas a través de la bilis de forma intacta o como metabolitos resultantes de sulfoconjugación y glucuronización (Fang, 2014). Por ejemplo, se ha comprobado que la cianidina-3-glucósido se metaboliza mediante metilación y conjugación con ácido glucurónico (Talavera y col., 2003; Felgines y col., 2005; Wu y col., 2005). Por el contrario, la delphinidina-3-glucósido es inestable en el tracto gastrointestinal superior, por lo que parece probable que se metabolice o se transforme en sus respectivos ácidos fenólicos. Se ha confirmado que el 59,3% de esta antocianina se metaboliza antes de llegar al intestino grueso (Fang, 2014).

En un estudio realizado en ratas a las cuales se les administró durante 15 días una dieta enriquecida en antocianinas procedentes de moras, se observó que la concentración de antocianinas en tejido gastrointestinal era mucho mayor que las concentraciones halladas en sangre. Además, fue en el yeyuno donde se localizaron concentraciones mayores de cianidina-3-glucósido y de sus formas conjugadas (metiladas y glucuronizadas). En otro ensayo llevado a cabo en células intestinales humanas en monocapa (Caco-2), se observó que las antocianidinas son capaces de atravesarla, lo que sugiere que podrían ser metabolizadas a este nivel antes de acceder a la circulación sistémica (Fang, 2014).

En ratas anestesiadas se ha evidenciado que, tras la administración por perfusión en el yeyuno e íleon de dos extractos de moras y arándanos enriquecidos con cianidina-3-glucósido, un 19% de la cantidad perfundida se absorbe intacta, detectándose posteriormente en orina una pequeña concentración de la misma, así como de sus metabolitos (Talavera y col., 2004).

En el caso de la delfinidina-3-rutinósido, su administración por vía oral e intravenosa en ratas, originó un incremento rápido en la concentración plasmática hasta conseguir un máximo de absorción a los 30 minutos de su ingestión. A los 120 minutos se detectó en plasma la presencia de un metabolito metilado (4'-*O*-metil-delfinidina-3-rutinósido). Los parámetros farmacocinéticos estimados para esta antocianina fueron: $T_{\text{máx}} = 26,3$ min y $C_{\text{máx}} = 0,285 \pm 0,071$ μmol , siendo la biodisponibilidad de la delfinidina-3-rutinósido de un 0,49% por vía oral y 18,14% por vía intravenosa. Este compuesto se excreta mayoritariamente por orina y su derivado metilado a través de la bilis. De los resultados de esta investigación se deduce que el 99,5% de la antocianina ingerida vía oral no se absorbe a nivel digestivo y se elimina en heces. No obstante, según indican los autores del trabajo, esta absorción puede verse modificada si la ingestión se realiza en ausencia de otros alimentos y si la motilidad intestinal es reducida (Matsumoto y col., 2006).

Parece pues que el aclaramiento de antocianidinas es rápido, de hecho, después de 6 horas, prácticamente no se detectan cantidades de estas moléculas en sangre. El porcentaje de excreción, aunque variable en función de la cantidad ingerida, parece ser inferior al 0,1%. No obstante, ese porcentaje también puede variar según la estructura química de la antocianina, generalmente en función del tipo de azúcar que lleve unido a la genina (glucosa, arabinosa, galactosa, rutinosa) (McGhie y col., 2003).

En un estudio publicado en 2009 se confirmó, que 6 horas después de la ingestión por vía oral de zumo de naranja sanguina rica en cianidina-3-glucósido, una pequeña parte de este compuesto se puede detectar en plasma y heces. Sin embargo, a las dos horas de la ingestión, lo que se encuentra en plasma son cantidades elevadas de un posible metabolito, el ácido protocatéquico (correspondiendo aproximadamente a un 72% de la cantidad de cianidina-3-glucósido ingerida). Dicho metabolito procede probablemente de la deglicosidación en el intestino delgado de la antocianina (mediante β -glicosidas) y posterior transformación en el lumen intestinal o en sangre, en el ácido fenólico. Parece descartado que el ácido protocatéquico detectado en plasma pueda ser derivado de la degradación microbiana intestinal de la antocianidina y su posterior absorción en el colon (Pappas y Schaich, 2009). Apoyando esta teoría, Dreiseitel y col., (2009) confirman la absorción mayoritaria de antocianinas a nivel del intestino delgado, señalando como mayor zona de absorción el yeyuno.

En cuanto al mecanismo implicado en la absorción a nivel del tracto gastrointestinal, parece probable la intervención de uno o varios transportadores de mayor o menor especificidad como son el gluco-transportador sodio dependiente SGLT1, que transporta glucósidos a través del intestino delgado (Dreiseitel y col., 2009; Walton y col., 2006), o la proteína de alta afinidad bilitranslocasa, localizada en las células endoteliales de la mucosa gástrica (Passamonti y col., 2002). En un estudio realizado por Talavera y col., (2005) se ha confirmado que las antocianinas sin metabolizar se absorben en el estómago a través de la bilitranslocasa, mientras que a nivel del yeyuno se encuentran las formas metiladas y glucuronidadas, así como los glucósidos de éstas,

aunque en menor concentración ya que a pH fisiológico son inestables. En estudios posteriores con ratas tratadas mediante perfusión intestinal con antocianinas de mora, se identificaron en plasma estas formas metiladas y glucuronidadas.

Estudios realizados en humanos, en los cuales se administró zumo de uva roja y vino tinto, se observó que la biodisponibilidad de las antocianinas es baja, por lo que los autores propusieron la búsqueda de otras fuentes de antocianinas que aumenten la biodisponibilidad de las mismas (Frank y col., 2003). No obstante, Manach y col. (2005), indican que en esa valoración se podrían haber ignorado las concentraciones de algunos metabolitos importantes, o que los métodos utilizados para dicho análisis no fueron suficientemente optimizados, teniendo en cuenta las diversas estructuras químicas que adoptan las antocianinas en equilibrio a diferentes pH. En la mayor parte de los estudios, los análisis se han realizado utilizando técnicas de espectrometría UV, ya que las antocianinas en medio ácido se transforman en cationes flavilio coloreados, sin embargo es posible que algunas estructuras existan a pH neutro y no se conviertan en catión flavilio, o que se establezcan combinaciones con componentes del plasma u orina (Yoshida y col., 2009).

Por ejemplo, algunas antocianinas como la pelargonidina-3-glucósido, parecen ser estables al pH neutro del intestino delgado. En un ensayo *in vitro*, realizado en una suspensión fecal humana, a la que se añadió una suspensión de antocianinas de fresa (principalmente pelargonidina-3-glucósido), se observó que la descomposición que sufre este compuesto es mínima cuando se incubaba a 37°C y a pH 7, durante 48 h (Fang, 2014).

En relación con la accesibilidad de estos compuestos al SNC, estudios realizados con animales de experimentación (cerdo y rata) han confirmado la distribución inespecífica de polifenoles en diferentes regiones cerebrales, si bien las concentraciones detectadas se sitúan por debajo de 1 nmol/g de tejido. Ensayos efectuados *in vitro* mediante modelos de paso por barrera hematoencefálica, han demostrado que la permeabilidad de los polifenoles depende, como es lógico, del grado de lipofilia de los compuestos, de su interacción con los transportadores de difusión y de su estereoquímica (Vauzour, 2012).

Los primeros ensayos *in vivo* se refieren a ratas alimentadas con extractos de frutos de arándano, observando que pasados 30 minutos de su administración oral ya se pueden identificar, tanto los antocianos como las formas metiladas (producto de su metabolismo hepático), en los cerebros de los animales tratados (Talavera y col., 2005). Por ejemplo, la concentración de la cianidina-3-glucósido en el cerebro, principalmente distribuida en áreas relacionadas con la memoria y aprendizaje, superó incluso la concentración obtenida en plasma, lo cual indica una buena biodisponibilidad de estos compuestos a nivel del SNC. En varias regiones cerebrales, incluido el cerebelo, córtex, hipocampo y cuerpo estriado de ratas adultas alimentadas durante diez semanas con una dieta que contenía un 2% de arándanos, se identificaron, además de cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, malvidina-3-glucósido,

malvidina-3-galactósido, malvidina-3-arabinósido, peonidina-3-arabinósido y delphinidina-3-galactósido.

Se ha comprobado además que las antocianinas de la uva alcanzan el cerebro solo unos minutos después de su absorción en el estómago (Andrés-Lacueva y col., 2005; Prior y Wu, 2006).

En un ensayo efectuado con ratas macho anestesiadas a las que se administró vía intragástrica antocianinas aisladas de *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet Sauvignon), se detectaron cantidades significativas en el cerebro, diez minutos después de su administración, lo que no es lógico, ya que el cerebro es impermeable a más del 98% de moléculas polares pequeñas del flujo sanguíneo. La explicación dada por los autores a este hecho es que la anestesia administrada a las ratas podría haber alterado la barrera hematoencefálica, aunque existen evidencias de que la anestesia *per se* no altera la integridad de dicha barrera, a no ser que se añadan a la anestesia otros tratamientos como soluciones osmóticas, soluciones salinas hipo- o hipertérmicas, o cambios en el pH del fluido cerebroespinal (Passamonti y col., 2005).

Posteriormente, en un estudio realizado con cerdos macho de 32-41 días de vida, alimentados durante 8 semanas con una dieta suplementada con un extracto de *Vaccinium corymbosum* L. (2%), se identificaron en tejido cerebral diferentes antocianinas, las mayoritarias, malvidin-3-galactósido, peonidina-3-glucósido y petunidina-3-glucósido. El hecho de que las dos últimas no se encuentren en concentración elevada en el extracto administrado, sugiere la existencia de procesos metabólicos antes de acceder al tejido cerebral o en el propio cerebro. En concreto, petunidina-3-glucósido podría ser un producto de la metabolización (metilación) de delphinidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, de cianidina-3-glucósido. En tejido cerebral también se identificaron antocianinas conjugadas con ácido glucurónico, principalmente delphinidina y metabolitos originados por metilación de cianidina (Milbury y Kalt, 2010).

En diversos ensayos realizados en ratas con el fin de evaluar el efecto neuroprotector de los constituyentes de un extracto de moras, se observó que el paso de las antocianinas existentes en el extracto a través de la barrera hematoencefálica, se podría realizar a través de un transportador parecido a la bilitranslocasa (Kusuhara y Sugiyama, 2002).

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica depende de los transportadores de difusión que se localizan en la superficie de las células endoteliales (Youdim y col., 2004). El transportador *ATP-binding cassette* (ABC) es una proteína transmembrana que pertenece a una superfamilia de transportadores de difusión, encargados de la translocación de varios substratos a través de diferentes membranas biológicas, como por ejemplo la distribución y eliminación de drogas en el SNC, absorción intestinal y excreción hepatobiliar (Manach y col., 2005). Entre ellos se encuentran la proteína MDR-1 (glicoproteína de resistencia a múltiples drogas) y la BCRP (proteína de resistencia al cáncer de mama), ambas ampliamente distribuidas en órganos importantes

de absorción (intestino delgado) y de distribución (placenta y barrera hematoencefálica). En un trabajo realizado por Dreiseitel y col. (2009), se demostró una afinidad de moderada a alta de las antocianinas (cianidina-3-5-diglucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido, delphinidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3,5-diglucósido, pelargonidina-3,5-diglucósido y peonidina-3-glucósido) y antocianidinas (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina y petunidina) por el transportador BCRP y en cambio una afinidad moderada a baja por el transportador MDR1 (Fig. 10).

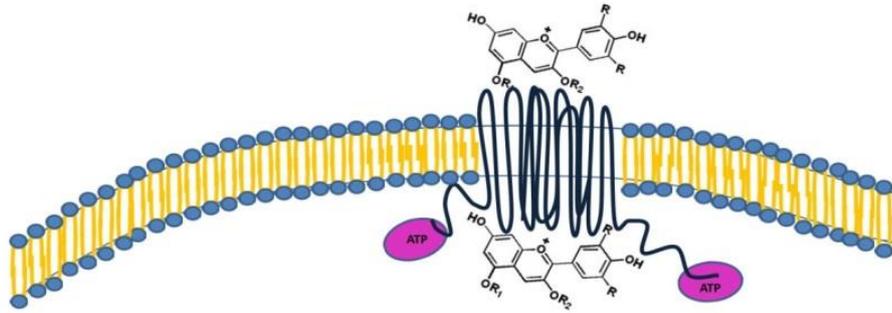


Figura 10.- Disposición del transportador ATP-Binding cassette a nivel de la membrana celular. Transportador MDR1.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la muy importante participación de las legumbres en la dieta mediterránea y no existiendo estudios previos sobre los beneficios que puede suponer su ingestión sobre la prevención de determinadas enfermedades que afectan al SNC, nos planteamos en esta tesis los siguientes objetivos:

- I. Analizar el contenido en compuestos fenólicos de las semillas de dos leguminosas muy utilizadas en la dieta mediterránea: lenteja pardina (*Lens culinaris* Medik. = *L. esculenta* Moench.) y judías de Tolosa (*Phaseolus vulgaris* L.).
- II. Evaluar la influencia del procesado: cocción y germinación sobre dicha composición fenólica.
- III. Evaluar la actividad neuroprotectora y antioxidante de los extractos obtenidos a partir de muestras de semillas de leguminosas crudas y sometidas a cocción o germinación.
- IV. Analizar la actividad farmacológica y el mecanismo de acción neuroprotector de tres antocianidinas presentes en las muestras de legumbres analizadas: cianidina, malvidina y pelargonidina.

Para ello nos planteamos realizar un estudio de la actividad neuroprotectora y antioxidante sobre cultivos de astrocitos humanos sometidos o no a estrés oxidativo, con objeto de llegar a una aproximación sobre su posible mecanismo de acción, mediante:

- Valoración de sus capacidades antioxidantes
- Estudio de sus efectos sobre la viabilidad celular
- Evaluación de sus efectos sobre la morfología celular de los astrocitos.
- Determinación de sus actividades sobre enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GR, GPx, NQO1) y glutatión.
- Evaluación de sus efectos protectores frente a marcadores de citotoxicidad celular: LDH, TBARS y MDA.
- Evaluación de sus actividades sobre la liberación de nitritos al medio inducida por interferón γ .
- Determinación de su incidencia en el proceso de muerte celular por apoptosis.
- Análisis de sus posibles efectos sobre un modelo de Parkinson *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCION DE EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS

Las leguminosas, lentejas del tipo pardina (*Lens culinaris* Medik., cv. Rubia de la Armuña proporcionadas por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Lenteja de la Armuña) y judías (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tolosana, Denominación de Origen Judías de Tolosa, proporcionadas por la Fundación KALITATEA, España), fueron procesadas para la obtención de las muestras crudas, cocidas y germinadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC, Madrid).

Hasta su utilización, las semillas crudas se limpiaron y se almacenaron en contenedores de polietileno a 4°C. Posteriormente, se trituraron en molino de bolas y la harina obtenida se extrajo a continuación con etanol/agua (80/20) con un extractor Dionex (ASE 200) acoplado a un evaporador Turbo vap (en atmósfera de nitrógeno) y posteriormente se desalcoholizaron y liofilizaron. A continuación, se pasaron por un tamiz de luz 0,5 mm. La harina obtenida se mantuvo al vacío en el interior de un desecador a 4°C y en ausencia de luz hasta su posterior análisis.

Para la obtención de las muestras de semillas cocidas, 500 g de lentejas o judías se sometieron a remojo en agua durante 16-18 h, a temperatura ambiente. El agua de remojo se desechó y posteriormente las semillas se cocieron en olla a presión durante 60 minutos con 3 litros de agua. Una vez cocidas, se separaron del agua de cocción, se molieron y liofilizaron siguiendo el mismo proceso que en el caso de las semillas crudas. La harina obtenida se almacenó al vacío en el interior de un desecador a 4°C y en ausencia de luz hasta su posterior análisis.

Para la obtención de las muestras germinadas, 200 g de semillas se sometieron a remojo con 1000 ml de hipoclorito sódico al 0,07% durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron hasta pH neutro con agua destilada y se dejaron sumergidas en 1000 ml de agua destilada durante 5 horas y media, agitándolas cada 30 minutos. Las semillas hidratadas se extendieron sobre un papel de filtro humedecido en una bandeja de germinación, cubriéndolas con otro papel de filtro igualmente humedecido. A continuación se introdujeron en un germinador (G-120 Snijders International S.L., Holland) cuya agua circulante, en contacto con el papel de filtro superior, permite que las semillas estén siempre humedecidas por capilaridad. Las semillas fueron germinadas en la oscuridad, a 20°C, durante 7 días. Los brotes se molieron, liofilizaron y tamizaron a través de un tamiz de 0,5 mm de luz; la harina obtenida se mantuvo al vacío, en un desecador a 4°C y en ausencia de luz hasta su análisis posterior.

2. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

Los liofilizados se disolvieron en metanol/agua (50:50 v/v) para su análisis cromatográfico. Todas las muestras se filtraron con un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm (Millipore) antes de la inyección. Las muestras se prepararon por duplicado.

Para llevar a cabo el análisis de los componentes fenólicos de las muestras de leguminosas, se ha utilizado un cromatógrafo HPLC-PAD Waters (Milford, Mass. USA), acoplado a un detector de fotodiodo (Photodiode array detector 2001), provisto de autoinyector, columna Nova-Pak C₁₈ (300 x 3,9 mm, 4 μm) y bomba de cuatro vías. Las condiciones del ensayo se basan en el protocolo descrito por Dueñas y col. (2006) con algunas modificaciones; la fase móvil está constituida por dos mezclas de disolventes: (A) agua/ácido acético (98:2 v/v) y (B) agua/acetonitrilo/ácido acético (78:20:2 v/v/v), en un gradiente de elución de 100% - 20% A de 0-55 min; 20% - 10% A de 55-70 min; 10% - 5% A de 70-80 min; 100% B de 80-100 min. El rango de flujo fue de 1 ml/min desde el principio hasta el minuto 55 y de 1,2 ml/min desde el minuto 55 hasta el final del análisis. Después de cada inyección, la columna se reequilibró con 10 ml de acetonitrilo y 25 ml de la fase móvil inicial. La detección se realiza analizando la absorción de las muestras entre dos longitudes de onda, 210 nm y 400 nm, a una precisión de adquisición de datos de 1s. El volumen de inyección de la muestra fue de 25 μl . Las muestras se analizaron por duplicado. Los disolventes de elución empleados fueron suministrados por Sigma Aldrich (España).

Para determinar el espectro de masas de los componentes se ha empleado un cromatógrafo Hewlett Packard 1100 MS (Palo Alto, CA) equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica (API) por electro-spray (ESI). El gradiente del disolvente y la columna empleada fueron iguales que para el análisis por HPLC-PAD. Las condiciones del ESI fueron las siguientes: análisis de modo ión-negativo; nebulizado con gas nitrógeno a 275 kPa, flujo del gas desecante 10 l/min y 340°C de temperatura; el voltaje a la entrada del capilar se estableció a 4000 V; y el voltaje de fragmentación variable de 100 V (m/z 200-1000) y 250 V (m/z 1000-2500). El espectro de masas registró moléculas de un rango de m/z comprendido entre 100-2500.

Para el análisis de antocianidinas, los extractos (100 μl) se filtraron previamente con una membrana de 0,45 μm y se inyectaron en una columna Nova Pak C₁₈ (150 mm x 3,9 mm, 4 μm), a temperatura ambiente, siguiendo el método de Monagas y col. (2003). La detección por espectrofotometría fotodiodo se ensayó entre 260 y 600 nm. El análisis del espectro de masas se realizó comparando con patrones de antocianinas, en modo ion positivo, empleando las mismas condiciones cromatográficas que en el estudio de los compuestos no antocianos.

Los picos del cromatograma se identificaron comparando los tiempos de retención con los de los compuestos patrón (ácidos *trans-p*-cumárico, *trans*-ferúlico y sinápico ; (+)-

catequina; hesperitina-7-*O*-neohesperidósido; naringenina-7-*O*-rutinósido; naringenina-7-*O*-neohesperidósido; quercetina-3-*O*-glucósido; kaempferol-3-*O*-glucósido; miricetina-3-*O*-glucósido; apigenina-7-*O*-glucósido; genisteína-7-*O*-glucósido; daidzeína-7-*O*-glucósido; biochanina A-7-*O*-glucósido; biochanina B-7-*O*-glucósido; malvidina-3-*O*-glucósido y cianidina-3-*O*-glucósido; Extrasynthese, Francia), así como por las características del espectro ultravioleta y el HPLC-ESI/MS. En el caso de los compuestos de los que no se disponía de patrones se realizó una tentativa de identificación teniendo en cuenta sus tiempos de elución, espectros UV (HPLC-PAD) y los datos obtenidos por la cromatografía acoplada a espectroscopia de masas (HPLC-ESI/MS) (Dueñas y col., 2009).

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método del patrón externo. Los derivados aldáricos de los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y sinápico se cuantificaron a través de las curvas correspondientes de los ácidos libres. Los dímeros y trímeros de procianidinas, en base a la curva obtenida para catequina. Los flavonoles, derivados de miricetina, quercetina y kaempferol, mediante las curvas de miricetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido, respectivamente. Las flavanonas, derivados de hesperetina y naringenina, con la hesperetina-7-*O*-neohesperidósido y naringenina-7-*O*-neohesperidósido, respectivamente. Para la cuantificación de las isoflavonas se emplearon las curvas de genisteína-7-*O*-glucósido y daidzeína-7-*O*-glucósido.

Para la cuantificación de las antocianinas se empleó igualmente la medición de las áreas bajo la curva a 530 nm, utilizando como área de referencia la de cianidina-3-*O*-glucósido.

Las curvas de calibración se realizaron con diferentes volúmenes de inyección de las soluciones stock, por encima del rango de concentraciones observado para cada compuesto. Se representó una regresión lineal de la suma de áreas frente a las concentraciones, bajo las mismas condiciones de las muestras analizadas.

Los compuestos no flavonoides o derivados de flavonoides desconocidos, se cuantificaron empleando curvas de calibración de compuestos correspondientes al mismo grupo de fenoles y con una estructura química similar.

3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN FENOLES TOTALES

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como compuesto de referencia (Singleton y col., 1999).

Procedimiento

En tubos de 50 ml, previamente forrados de papel aluminio para evitar reacciones de fotosensibilidad, se añadieron 500 µl del extracto de leguminosa disuelto en metanol (1 mg/ml) y 500 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu. Pasados 3 minutos se añadieron 10 ml de una disolución de carbonato sódico (75 g/l) y 14 ml de agua destilada, se agitaron varias veces y se dejó reposar durante 1 h. En cubetas de cuarzo, se midió la absorbancia de 1ml de la muestra a una λ de 760 nm en un espectrofotómetro (UVIKON 930, Kontron Instruments).

Con el fin de determinar la concentración en fenoles se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico (6,75-400 ppm). Al igual que con las muestras, se añadieron 500 µl de cada concentración de ácido gálico y se procedió de la misma forma.

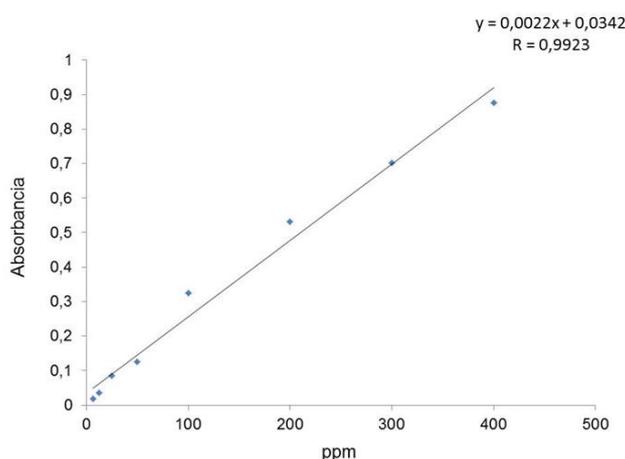


Figura 11. Curva de calibración de ácido gálico.

Los resultados correspondientes al contenido fenólico total de las muestras (**T**) se expresaron como ppm equivalentes de ácido gálico por mg de muestra [*gallic acid equivalent* (GAE)], extrapolando las concentraciones de los diferentes extractos a partir de la recta de regresión absorbancia/concentración del ácido gálico.

$$T = (C \times V \times DF) / m$$

Siendo **C**, la concentración de cada extracto obtenida de la recta de regresión; **V**, el volumen inicial en que se disuelve el extracto; **DF**, el factor de dilución y **m**, el peso del extracto.

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (ORAC)

La actividad captadora de radicales libres de los extractos se determinó por el método ORAC siguiendo el protocolo de Xu y Chang (2008a) con ligeras modificaciones, utilizando un espectrofluorímetro Optima Fluostar (BMG Labtechnologies Gmb, Offenburg, Alemania).

La metodología se basa en la pérdida de fluorescencia que sufre el compuesto fluoresceína en presencia de radicales peroxilo generados por descomposición térmica del APPH (2,2'-Azobis(2-dihidro cloro metilpropionamida) (Sigma-Aldrich España). Los compuestos con actividad antioxidante, son capaces de neutralizar los radicales peroxilo mediante la donación de un átomo de hidrógeno, evitando su reacción con la fluoresceína y por ello la disminución de fluorescencia.

Procedimiento

Los extractos de leguminosas se diluyen en metanol (1 mg/ml). A partir de esta solución, se ajustan las diferentes concentraciones a ensayar con tampón fosfato salino (K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Panreac, España) 75 mM, pH 7,4. Para la obtención de la recta de calibrado se utiliza Trolox (análogo biosintético hidrosoluble de la vitamina E: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma-Aldrich, España), diluido en la misma solución tampón, con un rango de concentraciones entre 1-8 μ M.

En placa de 96 pocillos de poliestireno negro (Biogen Científica S.L., Madrid, España) se disponen 20 μ l de las distintas concentraciones de leguminosas o 20 μ l de tampón fosfato (blanco) o distintas concentraciones de trolox. Se añaden a continuación 120 μ l de fluoresceína a todos los pocillos (concentración final 70 nM), manteniendo las placas en incubador a 37°C durante 10 minutos. Después de adicionar el radical iniciador APPH (60 μ l, concentración final 12 mM), se mide la fluorescencia durante dos horas y medida cada 90 segundos, a una λ de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm. Todas las muestras de reacción se prepararon por duplicado y se ensayaron independientemente al menos tres veces.

Las medidas de fluorescencia se normalizaron por diferencia entre el área bajo la curva de la muestra y el área bajo la curva del blanco. De las curvas normalizadas, el área bajo la curva de caída de fluorescencia (AUC) se calculó como:

$$AUC = 1 + \sum_1^{98} f_i / f_0$$

Donde f_0 es la lectura de fluorescencia inicial a 0 min y f_i la lectura de fluorescencia a tiempo i. El *netAUC* que corresponde a cada muestra se calculó de la siguiente manera:

$$\text{netAUC} = \text{AUC antiox} - \text{AUC blanco}$$

El valor ORAC se obtuvo dividiendo la pendiente de la recta de regresión correspondiente al área neta del compuesto antioxidante, entre la pendiente de la recta de regresión correspondiente al Trolox, obtenidos en el mismo ensayo. Los valores finales de ORAC se expresaron en μM equivalentes de Trolox por mg de leguminosa.

4.2. DETERMINACIÓN DEL RADICAL DPPH

Otro procedimiento para estimar la actividad antioxidante de las muestras es la utilización del radical libre estable 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). Se basa en la capacidad que tiene un compuesto antioxidante de donar átomos de hidrógeno al compuesto DPPH \cdot , pasando éste a su forma reducida:



La deslocalización del electrón desapareado otorga al DPPH \cdot una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de λ 520 ± 10 nm. La coloración desaparece cuando entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radicalaria (R \cdot), originándose la forma reducida DPPH-H o DPPH-R.

La pérdida de absorbancia de DPPH \cdot proporciona un índice para estimar la capacidad de los compuestos ensayados como captadores de radicales libres. Los resultados se expresan como concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀), que se define como la concentración de sustrato que causa un 50% de pérdida de absorbancia del DPPH \cdot (Molyneux, 2004).

Procedimiento

Las muestras a ensayar (extractos de leguminosas y antocianidinas aisladas) y el DPPH (Sigma Aldrich, España) se diluyeron en metanol (Panreac Quimica S. A. Barcelona, España). Se preparó una disolución stock de DPPH 700 μM que se mantuvo en frío (4°C) y oscuridad por un periodo máximo de una semana. En el caso de los extractos de leguminosas, se partió de una concentración inicial de 1 mg/ml de extracto disuelto en metanol. Para el estudio de antocianidinas se prepararon disoluciones madre en metanol que una vez alicuotadas se almacenaron en frío (4°C) y oscuridad.

Se utilizaron placas de 96 pocillos a los que se añadieron las diferentes muestras a ensayar hasta conseguir concentraciones finales entre 0,0625 y 0,25 mg/ml para los extractos de leguminosas y de 5, 10, 25, 50 y 100 μM para las antocianidinas, para un volumen final en pocillo de 220 μl . Como blanco se utilizó metanol. Las concentraciones finales óptimas de DPPH en pocillo, establecidas previamente mediante la realización de las curvas correspondientes, fueron de 50 μM para los extractos de leguminosas y de 63 μM para antocianidinas. Para medir la absorbancia a

tiempo cero se utilizó solo DPPH. Para la curva de calibración se utilizaron concentraciones de DPPH en un rango entre 6,25 μM – 400 μM . Todas las placas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante treinta minutos.

La pérdida de absorbancia del DPPH se midió a una λ de 530 ± 10 nm, a temperatura ambiente, en un espectrofluorímetro Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemania). Cada muestra se ensayó por duplicado y los resultados se expresaron como la media de tres experimentos independientes.

5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.1. CULTIVOS CELULARES

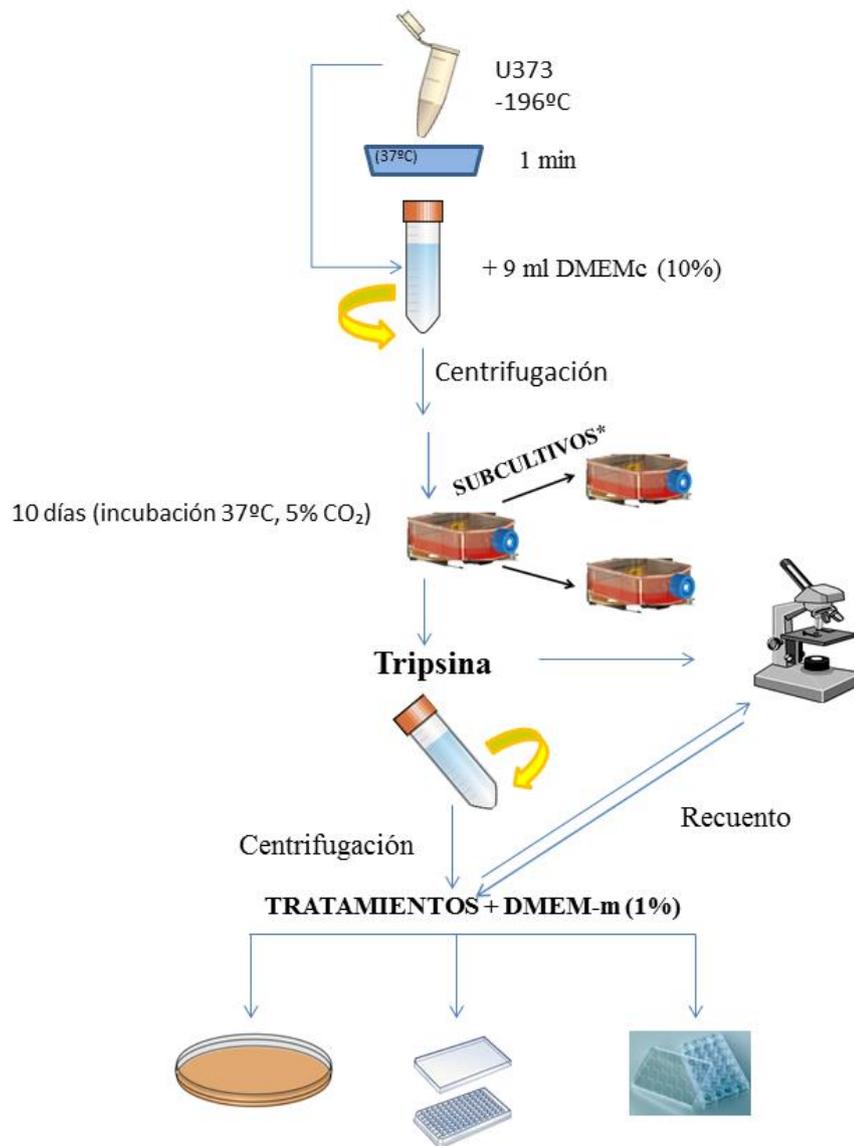
Se utilizaron cultivos celulares de astrocitos de glioblastoma humano de grado III, línea celular U-373, obtenidos del CAI Medicina Biología: Unidad de Cultivos Universidad de Alcalá (Carretera Madrid-Barcelona, km. 33,600. Alcalá de Henares). Se trata de células de aspecto estrellado, que se adhieren bien a los frascos de cultivo utilizados y cuyo crecimiento se produce en monocapa.

Las células mantenidas para su conservación a -196°C , en viales de 2 ml, se descongelan de forma rápida para evitar la formación de cristales. Para ello se introducen en un baño a 37°C , agitando durante un tiempo máximo de 1 m. En campana de flujo laminar, se introduce el contenido del vial en un tubo Falcon de 50 ml que contiene 9 ml del medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-c) libre de piruvato: 4,5 g/l de glucosa, L- glutamina y 25 mM HEPES, con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y 0,5% de gentamicina (50 mg/ml). Se resuspende bien con pipeta y se centrifuga a 800 rpm durante 5 min. A continuación, se retira el medio y se añaden de nuevo 10 ml de medio DMEM-c. Se siembran dos frascos de cultivo y se mantienen en un incubador (Heracell 150) a 37°C , 5% CO_2 . El medio de cultivo se cambia a las 24 h de la descongelación para retirar las células muertas y los restos de glicerol que puedan afectar al crecimiento. El medio DMEM y los suplementos fueron suministrados por Invitrogen S.A. (España) (Fig. 12).

Pasados diez días de la descongelación, las células estuvieron preparadas para ser utilizadas en los diferentes ensayos. En todos los casos, el mantenimiento de los cultivos se realizó cambiando el medio del cultivo cada 2 o 3 días. Se trabajó con pases de células entre 1 y 29. Para mantener la supervivencia celular durante los tratamientos con las diferentes muestras se utilizó medio DMEM de mantenimiento (DMEM-m) de igual composición al de crecimiento excepto por contener 1% de FBS.

Una vez preparadas las células para su uso, se retira el medio de cultivo con pipeta Pasteur y se lavan las células con 5 ml de PBS exento de calcio y magnesio (los iones calcio y magnesio inhiben la acción de la enzima tripsina). Para despegar las células de su soporte (frasco de cultivo), después de retirar el PBS se añaden 1600 μl de tripsina-EDTA y se mantiene el frasco en el incubador durante 3-4 minutos. Pasado este tiempo, se observa al microscopio de contraste de fases el cambio en la morfología celular (de forma estrellada a forma redondeada) como indicador de su desprendimiento. Se añaden a continuación 10 ml de DMEM-c para inactivar la acción de la tripsina. La suspensión de células se centrifuga en tubo Falcon a 800 rpm durante 5 min, se retira el sobrenadante y el pellet se resuspende en 10 ml de DMEM-c. De esta forma, la suspensión celular queda preparada para la realización de los diferentes ensayos.

Si las células no van a ser empleadas inmediatamente, es conveniente realizar subcultivos de forma que puedan mantenerse en condiciones de crecimiento adecuadas. En este caso, cuando las células llegan al 80% de confluencia en los frascos de cultivo, se retira el medio, se lavan las células con PBS exento de calcio y magnesio, y se trypsinizan siguiendo el protocolo antes descrito. Después de centrifugar a 800 rpm durante 5 min se retira el medio y se añade medio nuevo. Esta nueva suspensión celular se reparte en dos o tres nuevos frascos de 75 cm². El medio de cultivo se cambia cada 2 o 3 días hasta llegar a una nueva confluencia.



* Si el frasco está en confluencia

Figura 12. Descongelación y desdoblamiento de cultivos celulares.

Para la conservación de las células no utilizadas, tras constatar su buen funcionamiento, se procede a su congelación en medio constituido por una mezcla de FBS con glicerol al 10%. El glicerol es un medio crioprotector que favorece el proceso de vitrificación, proceso de congelación por el cual se solidifica el agua sin que se formen cristales, evitando el daño celular (Ameigeiras y Gil-Lozaga, 2011).

En una primera etapa los viales de congelación se introducen en un congelador a -20°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se trasladan a un congelador de -80°C (Hetofrig CL410, Escandinavia) donde se almacenan durante un tiempo no inferior a una semana ni superior a ocho. Para conservaciones más prolongadas se introducen en tanque de nitrógeno líquido (-196°C).

Recuento celular: el número de células necesario para cada ensayo puede ser diferente, por lo que antes de comenzar cada protocolo de experimentación se ha de realizar un conteo de células. A $90\ \mu\text{l}$ de la suspensión celular se le añade azul tripán (Sigma-Aldrich) en relación 1:10. El azul tripán es un coloide que accede al citoplasma celular cuando existe una ruptura de la membrana celular. Las células vivas, al no captar este coloide, se observan refringentes al microscopio óptico de contraste, facilitando su visualización.

El recuento celular se realiza empleando una cámara de Neubauer. El cálculo del número de células totales (**NCT**) en un volumen de suspensión dado, se realiza aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{NCT} = (\mathbf{X} \times 10^4 \times \mathbf{d} \times \mathbf{v}) / 5$$

Siendo **X**, el número de células contadas en los cinco cuadrantes sombreados de la cámara de Neubauer dispuestos en L; 10^4 , el factor de conversión de la cámara; **d**, el factor de dilución (10) y **v**, el volumen total de suspensión en ml.

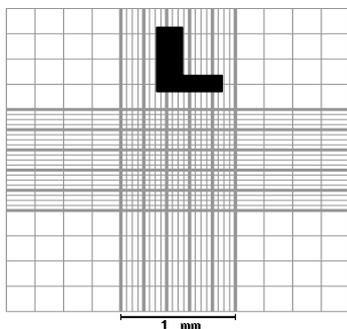


Figura 13.- Esquema de la cámara de Neubauer.

5.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para realizar la evaluación de la actividad biológica de las muestras, los extractos liofilizados de leguminosas se reconstituyeron con tampón fosfato salino (PBS) exento de calcio y magnesio (Invitrogen S.A., España). La cantidad de liofilizado empleado se ajustó en cada caso al rendimiento obtenido durante el proceso de extracción de las semillas molturadas. Se prepararon distintas diluciones para obtener unas concentraciones finales equivalentes a las consideradas activas para algunos de sus componentes, de acuerdo a estudios científicos anteriores (Schippers y Prop, 1978; Xu y col., 2007).

Se estudiaron igualmente las actividades de diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 μM) de antocianidinas: cianidina, malvidina y pelargonidina en forma de sal (Extrasynthese, Francia). Las concentraciones a ensayar se prepararon a partir de soluciones madre 1 mM en PBS exento de calcio y magnesio, disolviendo previamente los compuestos en 10 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac, España). Las soluciones madre se mantuvieron a -20°C y protegidas de la luz.

En los ensayos de evaluación de las actividades enzimáticas, marcadores de citotoxicidad celular, caspasas y determinación de nitritos, se utilizó como control positivo Trolox en una concentración 0,5 mM diluido en PBS (sin Ca^{2+} y Mg^{2+}).

5.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE LA TÉCNICA DEL MTT

Esta técnica se basa en la modificación del color originado como consecuencia de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán (Takahashi y col., 2002). Las células vivas poseen deshidrogenasas mitocondriales que son capaces de transformar la sal de MTT en un derivado, el formazán, que adopta la forma de cristales de color azul-violáceo. La intensidad de la coloración está en relación directa con la viabilidad celular y puede ser medida por colorimetría a 550 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad, considerando el 100% de viabilidad la media de las absorbancias de los pocillos correspondientes a las células no tratadas. Como control negativo se empleó tritón X-100 (Sigma-Aldrich, España) tóxico que provoca mortalidad celular.

Procedimiento

Se cultivaron las células en placas de 96 pocillos, con una densidad de 5×10^4 células por pocillo, en 100 μl de medio DMEM-c durante 24 h. Posteriormente, se trataron con diferentes concentraciones (0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 mg/ml) de las muestras de leguminosas crudas y procesadas (cocción y germinación) y diferentes concentraciones de antocianidinas (5, 10, 25, 50 y 100 μM). Se incubaron durante 24 h, añadiendo a continuación 100 μl de MTT (2 mg/ml) a cada pocillo. Posteriormente, se incubaron

(incubador Heraeus D-6450 Hanu, Alemania) en ausencia de luz durante 1 h, a 37°C, para favorecer la formación de los cristales azules oscuros de formazán. Para medir la intensidad de coloración de los cristales, se adicionaron 100 µl de DMSO, midiendo en lector de placas la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm.

5.4. EVALUACIÓN DEL DAÑO CELULAR

Para el establecimiento de un modelo de daño celular por oxidación en los cultivos de astrocitos y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios previos realizados por el grupo investigador, las células fueron tratadas con reactivo de Fenton ($\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) en PBS (exento de Ca^{2+} y Mg^{2+}) a una concentración de 0,5 mM FeSO_4 y 1 mM H_2O_2 . La solución del tóxico oxidante ha de prepararse inmediatamente antes del experimento.

Procedimiento

Las células (5×10^4 células/pocillo) se incubaron durante 24 h en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 µl de medio DMEM-c por pocillo. A continuación, se trataron con las diferentes concentraciones de muestras de leguminosas crudas y procesadas (cocción y germinación) o de las antocianidinas en su caso, y se incubaron durante otras 24 h. Posteriormente se sometieron a estrés oxidativo mediante la adición del reactivo de Fenton a la concentración descrita anteriormente, incubando las placas durante 45 min a 37°C y 5% de CO_2 . Pasado ese tiempo, el medio de cultivo se sustituyó por medio DMEM-m incubando las placas durante 24 h. Al cuarto día del inicio del experimento, se retiró el medio y se añadió a cada pocillo 100 µl de MTT (2 mg/ml). Las placas se incubaron entonces en ausencia de luz durante 1 h a 37°C. Tras añadir a cada pocillo 100 µl de DMSO, se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 550 nm. En todos los casos, los resultados se compararon con un grupo control.

5.5. MEDIDA DE LA GENERACIÓN INTRACELULAR DE ROS

Se utilizó la técnica de la diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), molécula fotosensible que se degrada en presencia de luz. La DCFH-DA atraviesa la membrana celular y es desacetilada por esterasas mitocondriales al anión carboxilato (DCFH), producto no fluorescente que reacciona con ROS (oxidación de 2 electrones) y se transforma en DCF, compuesto fluorescente (Wang y Joseph, 1999). La cantidad de ROS presente en las muestras será proporcional a la intensidad de la fluorescencia. Las medidas se realizaron en un fluorímetro (Fluorímetro FLx800 microplate fluorescent reader Bio-Tek, Instruments, In, USA) a una longitud de onda de excitación y de emisión de 480 nm y 510 nm, respectivamente.

Procedimiento

Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células por pocillo, y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO_2 . Pasado este tiempo se les

adicionó una disolución de DCFH-DA (0,01 M en DMSO) con PBS glucosado (180 mg glucosa/100 ml PBS estéril). Se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Después del lavado con PBS glucosado (dos veces), se adicionaron los diferentes tratamientos (leguminosas crudas o procesadas, o antocianidinas a las concentraciones citadas anteriormente). A continuación se realizó la lectura de la emisión de fluorescencia a tiempo cero, cada 10 minutos durante la primera hora, y cada 15 minutos durante la segunda.

El análisis de la liberación de radicales libres de oxígeno en un modelo de toxicidad celular, se realizó siguiendo la metodología anterior, pero con pequeñas modificaciones: una vez añadido el tratamiento, se adicionan 20 µl del tóxico oxidante (FeSO₄ 0,5 mM/H₂O₂ 1 mM; Martín y col., 2006). Finalmente, se realizaron medidas en el fluorímetro cada 10 minutos la primera hora y cada 15 la segunda.

5.6. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

La observación de la morfología de las células vivas en cultivo, tratadas y sin tratar con las antocianidinas y trolox, en presencia o ausencia del tóxico oxidante, se realizó mediante la utilización de un microscopio de contraste de fases que permite su visualización sin tener que realizar tinciones que podrían originar cambios fisiológicos en las propias células.

La adquisición de imágenes se llevó a cabo con una cámara digital (Moticam 2500, 5.0 MP Live Resolution) acoplada al microscopio y el tratamiento de las mismas con el programa Motic Images Plus 2.0.

5.7. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CITOSÓLICOS

Se prepararon extractos citosólicos para la realización de los siguientes ensayos:

- Determinación de TBARS
- Determinación de la concentración de MDA por HPLC
- Determinaciones enzimáticas
- Determinación de los niveles de glutatión

Procedimiento

Para ello, se sembraron las células en placas de Petri de 75 cm² y se dejaron crecer hasta confluencia. A continuación, los astrocitos se trataron con las diferentes concentraciones de antocianidinas (5, 25 y 100 µM) disueltas en medio DMEM-m (1%) y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Una vez recogidas las células mediante raspado en tubos Falcon de 15 ml, las suspensiones celulares se centrifugaron (800 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez retirado el sobrenadante, se lavaron los sedimentos con 1 ml de PBS, introduciendo a continuación los contenidos en tubos Eppendorf de 1,5 ml, siendo nuevamente centrifugados a 800 rpm durante 5

min a temperatura ambiente. Los sedimentos se emplearon inmediatamente o se conservaron, en su caso, a -20°C para su posterior utilización.

A la hora de ser utilizados, se realizó un lisado celular empleando un tampón de lisis (TRIS 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%) (Sigma-Aldrich, España) en agua destilada, ajustando el pH a 7,4. A 5 ml del tampón se le adicionaron distintas antiproteasas (100 μl de leupeptina a una concentración de 1mg/ml en agua destilada; 175 μl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración 0,5 mM en isopropanol (Panreac, España); 50 μl de pepstatina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml en metanol) para evitar el deterioro de proteínas y enzimas. A cada Eppendorf con la muestra de células se añaden 300 μl de esta mezcla de tampón de lisis y antiproteasas, manteniéndolos en frío (hielo triturado) durante todo el proceso de lisado (20 min).

A continuación, las muestras se sonicaron (dos ciclos a 80 Hz) también en frío para evitar la desnaturalización de las proteínas y se centrifugaron en ultracentrífuga refrigerada (Sollvall RL-5B, Dupont Instruments, USA) a 15.000 rpm durante 10 min a 4°C , obteniéndose un sobrenadante que corresponde con el extracto citosólico.

En el modelo de toxicidad celular, los astrocitos cultivados, después de ser tratados 24 h con las antocianidinas, se incubaron con el reactivo de Fenton (0,5 mM FeSO_4 y 1 mM H_2O_2 en DMEM-m hasta un volumen en placa de 4 ml) durante 45 min. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el tóxico, añadiendo a continuación DMEM-m siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

5.8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCÓNICO)

La concentración en proteínas se determinó siguiendo el método colorimétrico del ácido bicincónico (Smith y col., 1985). Para ello, en un primer paso, es preciso extraer el extracto citosólico de la suspensión celular.

Procedimiento

En placa de 96 pocillos se añadieron 5 μl del extracto citosólico de cada una de las muestras, completándose el volumen hasta 25 μl con agua destilada. A cada uno de los pocillos se añadieron 200 μl de una mezcla de ácido bicincónico y sulfato de cobre (14 ml: 275 μl) (coloración verde). Cada muestra se analizó por triplicado. Se incubó la placa a 37°C durante 1 h, protegido de la luz. Al cabo de este tiempo los pocillos tornaron a una coloración morada. Se analizó la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 550 nm.

La concentración de proteínas se obtuvo tras la extrapolación de los datos de absorbancia obtenidos de una curva patrón de albumina (0-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

5.9. VALORACIÓN DEL ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

El LDH es un enzima citoplasmático medible que puede emplearse como biomarcador del daño celular originado por ruptura de la membrana celular. Su determinación se realiza por espectrofotometría siguiendo el método de Koh y Choi (1987). Este enzima cataliza la reducción de piruvato a lactato, utilizando NADH como cofactor. La disminución de la absorbancia debida a la oxidación del NADH a NAD⁺ es proporcional a la actividad enzimática.

Procedimiento

Para la valoración de este enzima se siembran los astrocitos en placas de 24 pocillos (2×10^5 células por pocillo), añadiendo 1 ml de medio DMEM-c por pocillo e incubándose en las condiciones descritas en el punto 5.1 hasta llegar a confluencia. A continuación se trataron con los extractos de leguminosas, antocianidinas y con trolox 0,5 mM (control positivo), durante 24 h. Pasado ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes en tubos Eppendorf de 2 ml (muestra **A**). En caso de no ser analizadas inmediatamente, se procede a su congelación a -20°C hasta su posterior análisis.

A los pocillos que contenían las células se añadieron 200 μl de una mezcla de tampón fosfato potásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$; Panreac S.A.) 0,1 M, pH 7,4 con tritón (Tritón X-100, Sigma-Aldrich) en una proporción 2:1 respectivamente. A continuación, se despegaron las células mediante raspado y se recogieron en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Como en el caso anterior, se congelaron a -20°C hasta su análisis.

A 100 μl de la muestra **A** se le adicionaron 50 μl de piruvato sódico 80 mM. En el momento de la lectura se adicionaron 50 μl de NADH (Sigma-Aldrich, 2 mg/ml en el tampón fosfato potásico anterior) a cada pocillo.

Los tubos Eppendorf con la suspensión de células se centrifugaron a 13000 rpm en ultracentrífuga refrigerada, durante 10 min, recogiendo el sobrenadante (muestra **B**). A cada pocillo se añadieron 25 μl del sobrenadante, 75 μl de tampón fosfato sin tritón, 50 μl de piruvato sódico y, en el momento de realizar la lectura, 50 μl de NADH (2 mg/ml).

Para las medidas de absorbancia se utilizaron placas de 96 pocillos y un espectrofluorímetro (Optima Fluostar, BMG) midiendo a una longitud de onda de 340 nm cada min, durante 10 min, a 37°C . Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Para calcular la cantidad de LDH liberado (%LDH_{lib}) se calculó la pendiente (x) de la recta de absorción de cada muestra (x_s : pendiente de la recta de absorción de la muestra **A** y x_c : la pendiente de la recta de absorción de la muestra **B** y la cantidad de LDH liberada en el caso de mortalidad celular total (**100% MC**) causada por el tóxico tritón.

$$100\% \text{ MC} = (x_s \times 5) + (x_c \times 4)$$

$$\% \text{LDH}_{\text{lib.}} = [(x_s \times 5) \times 100] / 100\% \text{MC}$$

5.10. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Como consecuencia de los efectos oxidantes de los ROS sobre las membranas celulares, se producen procesos de peroxidación lipídica que ocasionan la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados y la aparición de productos de peroxidación como el MDA. Estos compuestos pueden a su vez reaccionar con distintos grupos químicos como los tioles e interferir con proteínas y ácidos nucleicos.

Se han utilizado dos métodos para determinar este compuesto. En ambos se emplearon extractos citosólicos de las células tratadas con los compuestos a analizar en presencia o ausencia del tóxico oxidante, previa determinación de la cantidad de proteína por extracto, siguiendo la metodología expuesta anteriormente (ver apartado 5.8.).

5.10.1. Ensayo de TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)

Este ensayo se realizó siguiendo el método de Scheiber y col., 2010, con algunas modificaciones. Mediante este método no solo se mide la concentración de MDA sino además, la de otros compuestos originados durante la peroxidación.

Procedimiento

Una vez determinada la cantidad de proteínas, a 50 μl de cada una de las muestras de células tratadas con antocianidinas, en ausencia o presencia del reactivo de Fenton, se añadieron 100 μl del reactivo: ácido tiobarbitúrico (TBA)/ácido tricloroacético (TCA)/HCl (75,3 mg/7,5 ml 40%/1ml), disuelto en 11 ml de agua miliQ. En baño termostaticado se calentaron las muestras a 100°C durante 20 a 45 min. Durante el calentamiento se formó un cromógeno de color amarillo rosado, indicando la formación del aducto con el TBA. La reacción se detuvo introduciendo los tubos Eppendorf en hielo durante 15 minutos. Después de centrifugar a 3000 rpm durante 10 min, 100 μl de los sobrenadantes se dispusieron por duplicado en placas de 96 pocillos. La intensidad de la coloración se midió en lector de placas, por colorimetría, a 530 nm. El resultado se expresó como % de TBARS, siendo el 100% el máximo de formación de productos de peroxidación producidos por el reactivo de Fenton. El TBA procede de Sigma-Aldrich, el TCA y el HCl de Panreac Química S.A.

5.10.2. Determinación de MDA por HPLC

Para la determinación de la formación de MDA en los cultivos celulares, también se ha utilizado la técnica de HPLC, según el método de Grotto y col. (2007), con ligeras modificaciones. Los resultados se expresaron en nmoles de MDA por mg de proteína.

Condiciones del método analítico (HPLC)

- Cromatógrafo Agilent 1260
- Detección: Detector de diodos DA 1260, a λ 268 y 532 nm, simultáneamente
- Columna: Agilent eclipse plus C18 (100 x 4,6 mm; 3,5 μ m partícula)
- T^a horno: 40°C
- Fase móvil: H₂O/MeOH (50/50 V/V) en elución isocrática
- Flujo: 0,5 ml/min
- t de análisis: 20 minutos

Procedimiento

Se preparó una disolución madre 3 mM de MDA en agua destilada para realizar la curva de calibrado (5 - 40 μ M).

Los extractos citosólicos se obtuvieron en las mismas condiciones descritas anteriormente (apartado 5.7.) previa determinación de proteínas (apartado 5.8.).

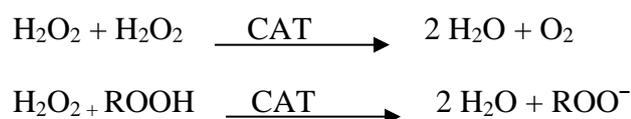
Antes de proceder a la inyección, las muestras se filtraron mediante filtros de acetato de celulosa de 0,22 μ de tamaño de poro, manteniéndolas a 4°C hasta el momento del análisis.

5.11. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES

En todos los casos se han empleado extractos citosólicos (apartado 5.7.) tras la determinación de proteínas según se indica en el apartado 5.8.

5.11.1. Determinación de la actividad del enzima catalasa (CAT)

El enzima CAT cataliza dos tipos de reacciones, la descomposición de H₂O₂ en agua y oxígeno y la oxidación de donadores de hidrógeno con el consumo de una molécula de peróxido.



La actividad CAT se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 240 nm, observándose la descomposición del peróxido de hidrógeno incorporado a la

muestra, durante un minuto, a una temperatura de 25°C, siguiendo el método de Barja de Quiroga y col. (1989), con alguna modificación.

Procedimiento

Inmediatamente antes de realizar la medida, en cubeta de cuarzo de 1 cm y un volumen de ensayo de 700 µl, se añadieron 30 µl de los extractos citosólicos correspondientes a las células tratadas o no con las antocianidinas, en presencia o ausencia del tóxico oxidante, y una solución de H₂O₂ en tampón fosfato 50 mM (K₂HPO₄ y KH₂PO₄ a pH 7,4) para obtener una concentración en cubeta de 1 mM. Se utilizó una cubeta como blanco fija con 700 µl de tampón fosfato. Previo a la medición de la cinética con las muestras problema, se realizó una medida de la disolución de tampón fosfato con H₂O₂. Se utilizó un espectrofotómetro UVIKON 930.

La determinación de la actividad enzimática total (**U**), se evaluó utilizando la siguiente fórmula:

$$U = (\Delta A_m - \Delta A_p) \times V / \epsilon \times D \times v \times C$$

Siendo ΔA_m el cambio en la absorbancia por minuto de la muestra; ΔA_p , el cambio en la absorbancia por minuto del H₂O₂; **V**, el volumen total en la cubeta; ϵ es el coeficiente de extinción molar de H₂O₂ (43,6.10⁻³ nmol⁻¹ cm⁻¹); **D**, es el paso de luz (1cm); **v**, el volumen de muestra y **C**, los mg de proteína por ml.

5.11.2. Determinación de la actividad del enzima superóxido dismutasa (SOD)

El enzima SOD localizado en la mitocondria y en el citosol, es uno de los mecanismos más importantes de defensa antioxidante. Cataliza la dismutación del radical superóxido en oxígeno molecular y H₂O₂:



Para la determinación de la actividad enzimática, se siguió el método de Marklund y Marklund (1974), con algunas modificaciones. Dicho método se basa en la habilidad que tiene SOD para inhibir la autooxidación espontánea del pirogalol en medio básico, mediante la transformación del anión superóxido en H₂O₂ y O₂. Al autooxidarse el pirogalol se transforma en pirogalina, sustancia de color amarillo que absorbe a una longitud de onda de 420 nm.

Procedimiento

En cubeta de cuarzo se dispusieron: 30 µl de los extractos citosólicos obtenidos tras el tratamiento de las células con las antocianidinas, en presencia o ausencia del tóxico antioxidante, cuyo contenido en proteínas ha sido evaluado previamente; 10 µl de pirogalol (Sigma-Aldrich) 2 mM en HCl 10 mM (preparado previamente y conservado

en frascos de vidrio topacio para evitar su autooxidación); y, hasta alcanzar un volumen en cubeta de 800 μl , tampón TRIS-DTPA (50 mM de tris clorhidrato de hidroximetilaminoetano que contiene dietilentriaminopentaacético dianhídrido 1 mM) (Sigma-Aldrich) a pH 8,2, mantenido en agitación al menos 20 min para favorecer su oxigenación. Se preparó un blanco con el tampón y la solución de pirogalol y se leyeron las absorbancias a 420 nm, durante 2 min a 25°C en espectrofotómetro UVIKON 930.

El porcentaje de inhibición será:

$$\% \text{INH} = [\Delta A_p - \Delta A_m] / \Delta A_p \times 100$$

Siendo ΔA_p la variación en la absorción del pirogalol y ΔA_m la variación en la absorción en la muestra.

Para el cálculo de la actividad enzimática (U) se consideró que una unidad enzimática es la cantidad de enzima capaz de inhibir la reacción en un 50%, y se expresó en UI/mg de proteína:

$$U = [(\% \text{INH}/50) \times (V/v)] / C$$

Siendo V el volumen total en la cubeta; v , el volumen de la muestra y C los miligramos de proteína.

5.11.3. Determinación de la actividad del enzima glutatión reductasa (GR)

El enzima GR, tiene una función muy importante en el organismo pues cataliza la reducción del glutatión oxidado de manera que en su forma reducida pueda ser utilizado por el enzima GPx para eliminar el H_2O_2 del organismo.



Para la evaluación de la actividad enzimática se siguió el método de Barja de Quiroga y col. (1990), basado en la oxidación del NADPH.

Procedimiento

En cubeta se añadieron 580 μl de tampón fosfato 50 mM (K_2HPO_4 y KH_2PO_4)/6,3 mM EDTA (Panreac Química S.A.) en agua destilada, a pH 7,4; 50 μl de los extractos citosólicos obtenidos tras el tratamiento de las células con las antocianidinas, en presencia o ausencia del tóxico antioxidante, cuyo contenido en proteínas ha sido evaluado previamente, atemperados antes de su análisis; y por último, 35 μl de glutatión

oxidado (80 mM) y 35 μ l de NADPH (Sigma-Aldrich) (6 mM), disueltos en tampón fosfato. Como blanco se utilizó tampón fosfato/EDTA 700 μ l.

Tras 60 segundos de reacción, se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 340 nm, durante cuatro minutos a 25°C. Se realizó también una medida con tampón fosfato, glutatión oxidado y NADPH para controlar la reacción no enzimática.

La actividad enzimática (U) se expresó en nmoles de NADPH por minuto y por milígramo de proteína:

$$U = [(\Delta A_m - \Delta A_b) \times V] / (\epsilon \times D \times v \times C)$$

Siendo ΔA_m la variación en la absorbancia de la muestra; ΔA_b , la variación en la absorbancia de la reacción no enzimática; V , el volumen total de la reacción; ϵ el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6,22 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); D , el paso de luz (1 cm); v el volumen de muestra y C los mg de proteína por ml.

5.11.4. Determinación de la actividad del enzima glutatión peroxidasa (GPx)

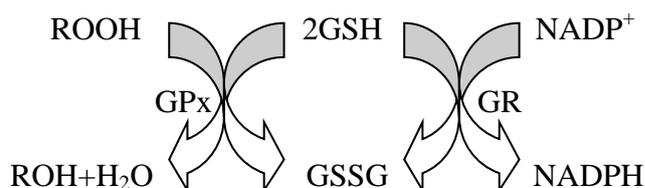
Los enzimas GPx, localizados en el citosol y la mitocondria, catalizan la siguiente reacción:



Existen dos formas básicas de peroxidasa: dependiente de selenio, tetramérica, encargada de descomponer hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos; e independiente de selenio, que descompone los hidroperóxidos orgánicos.

Para medir los dos enzimas se emplea la misma metodología, pero utilizando diferente sustrato. En el caso del enzima GPx dependiente de selenio se emplea como sustrato peróxido de hidrógeno. Para la determinación de la actividad GPx total se utiliza hidroperóxido de cumeno.

En ambos ensayos se valoró la actividad GPx evaluando el incremento de la absorbancia debido a la oxidación del NADPH a una longitud de onda de 340 nm, en presencia de un exceso de glutatión reductasa y glutatión reducido, según la siguiente reacción acoplada:



Para la determinación de esta enzima se siguió el protocolo descrito por Smith y Levander (2002), con algunas modificaciones.

Procedimiento

Para la realización del ensayo se prepararon dos soluciones reactivas: A, peróxido de hidrógeno (0,25 mM) más los reactivos indicados en la tabla siguiente y B, peróxido de cumeno (0,5 mM; Fluka) con los mismos reactivos, en las concentraciones que se detallan a continuación:

Reactivos	[concentración]
Tampón fosfato pH 7,4	50 mM
EDTA	5 mM
Azida sódica (Sigma-Aldrich)	1 mM
Glutatión reducido (Sigma-Aldrich)	2 mM
Glutatión reductasa (Sigma-Aldrich)	2 U/ml
NADPH	0,4 mM

La medida se realizó en placas de 96 pocillos. A 200 µl de solución reactiva se le añadió 50 µl de los extractos citosólicos obtenidos tras el tratamiento de las células con las antocianidinas, en presencia o ausencia del tóxico antioxidante, cuyo contenido en proteínas había sido evaluado previamente, atemperados antes de su análisis. Como blanco se utilizaron las mismas soluciones reactivas (200 µl) completando el volumen hasta 250 µl con tampón fosfato. Las medidas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 340 nm, a 37°C, durante 3 minutos, realizando medidas cada 15 segundos.

Para la determinación de la actividad enzimática GPx, calculada como micromoles de NADPH oxidados por minuto, se empleó la siguiente ecuación:

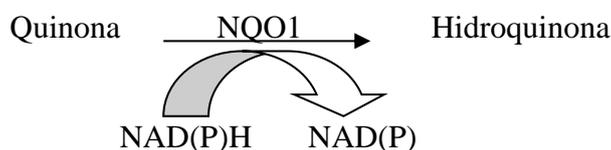
$$U_{GPx} = [(\Delta A_m - \Delta A_b) \times V] / \epsilon \times D \times v \times C$$

Siendo ($\Delta A_m - \Delta A_b$) la diferencia entre la absorbancia obtenida para las muestras problema y la obtenida para el blanco; V el volumen total en ml que contiene cada pocillo, $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ coeficiente de extinción molar del NADPH; v , el volumen de muestra que se añade al pocillo (50 µl); D , es el paso de longitud de onda en los

pocillos de las placas utilizadas (0,2411 cm); y **C** la concentración de proteínas en mg/ml.

5.11.5. Determinación de la actividad del enzima NADPH quinona reductasa (NQO1)

Este enzima se encuentra en el citosol de las células de un gran número de tejidos del organismo. Cataliza la reducción de quinonas y quinoneiminas, protegiendo al organismo de su toxicidad. En esta reacción tanto NADH como NADPH actúan como donadores de 2 electrones facilitando la reducción de la quinona a hidroquinona, la cual es susceptible de glucuronizarse facilitando su eliminación. Es un enzima de fase II que está coordinado con otros enzimas similares: glutatión S-transferasa y UDP-glucuronosil transferasa (Prochaska y Santamaría, 1988).



Para realizar este ensayo se siguió el protocolo descrito por Van Muiswinkel y col. (2000), con algunas modificaciones. Consiste en medir la inhibición de la actividad NQO1 por el dicumarol.

Procedimiento

En placa de 96 pocillos se añadieron 5 μl de albúmina en una concentración de 20 mg/ml; 50 μl de los extractos citosólicos obtenidos tras el tratamiento de las células con las antocianidinas, en presencia o ausencia del tóxico antioxidante, cuyo contenido en proteínas había sido evaluado previamente, atemperados antes de su análisis; tampón fosfato 50 mM pH 7,4 hasta completar un volumen en pocillo de 250 μl . Posteriormente, se añadió dicumarol (Sigma-Aldrich) disuelto en DMSO, para alcanzar una concentración final en pocillo de 10 μM . Se mantuvo la reacción durante 10 min en oscuridad. Posteriormente se añadió dicloroindofenol (Sigma-Aldrich) para alcanzar una concentración final en pocillo de 40 μM y NADPH disuelto en una solución de HCO_3Na (Panreac Química, S.A.) (0,1 g en 100 ml de agua destilada). En esta primera reacción se midió la inhibición de la actividad NQO1 inducida por el dicumarol.

Para evaluar la reacción no enzimática se siguió idéntico protocolo pero en ausencia de dicumarol. Como blanco se utilizó el tampón fosfato junto a las sustancias de reacción.

Cada muestra se analizó por triplicado a una longitud de onda de 610 nm, a 25°C, con 60 segundos de espera, durante 7 minutos.

La evaluación de la actividad se efectuó calculando la pendiente de la recta de inhibición de la actividad y la pendiente de la recta de la cinética no enzimática. A continuación, para calcular la actividad enzimática (U) se aplicó la siguiente fórmula:

$$U_{NQ01} = [(P_m - P_b) \times V] / \epsilon \times D \times v \times C$$

Siendo P_m la pendiente de la muestra; P_b , la pendiente del blanco; V el volumen total en ml que contiene cada pocillo; $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, coeficiente de extinción molar del NADPH; v , el volumen de muestra que se añade al pocillo (50 μ l); D , el paso de longitud de onda 0,2411 cm; y C la concentración de proteínas en mg/ml.

5.12. DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN

El glutatión es una molécula con actividad antioxidante que se encuentra en los tejidos cerebrales, especialmente en astrocitos, en concentración más elevada que en otros órganos. Para la determinación del GSH y del GSSG se siguió el método espectrofluorimétrico de Hissin y Hilf (1976), basado en la capacidad del fluoróforo o-ftaldehído (OPT) para reaccionar con aminas primarias en presencia de grupos tiol, sulfitos y ciano que generan un compuesto fluorescente (isoindol), detectado a una longitud de onda de excitación de 420 nm y 350 nm de emisión.

El OPT (Sigma-Aldrich) reacciona con el GSH a pH 8 y con GSSG a pH 12. Un nivel de pH mayor de 8 hace que el GSH se oxide; para prevenir este hecho, se añadió N-etilmaleimida (NEM) (Sigma-Aldrich), que forma un complejo con el GSH, previniendo interferencias en la medida del GSSG. Por último, se determinó el índice redox (GSSG/GSH).

Procedimiento

Tras la obtención de los extractos citosólicos y la evaluación de su contenido en proteínas (ver apartados 5.7. y 5.8.), los extractos se trataron con ácido perclórico (Panreac Química, S.A.) al 1% v/v, durante 5 min. A continuación se centrifugaron a 14.000 rpm, durante 10 min, a 4°C, para retirar las proteínas y emplear el sobrenadante para la determinación del GSH y GSSG.

- Determinación del glutatión reducido (GSH): En una placa de 96 pocillos se añadieron 50 μ l de cada muestra; 150 μ l de tampón fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M/EDTA 0,005 M en agua destilada a pH 8 y 20 μ l de una solución extemporánea de OPT en metanol (1 mg/ml). Se mantuvo la placa 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia en un fluorímetro (FLx-800) a una longitud de onda de excitación de 420 nm y de emisión de 350 nm.

Para elaborar la recta patrón del GSH se utilizó una disolución del mismo (Sigma-Aldrich) 9,7 mM en tampón fosfato/EDTA. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

- Determinación del glutatión oxidado (GSSG): En una placa de 96 pocillos se añadieron 50 µl de muestra y 3 µl de NEM (7,5 mM diluido en tampón fosfato/EDTA, pH 8, preparado diariamente), dejando las placas en oscuridad durante 5 min. A continuación, se añadieron a cada pocillo 150 µl de NaOH 0,1 N (Panreac España S.A.) en agua destilada, pH 12 y 20 µl de la solución de OPT, dejando las placas de nuevo en oscuridad durante 15 min. Paralelamente se realizó una curva patrón de GSSG (Sigma-Aldrich) 9,1 mM en solución de NaOH en agua destilada.

Las medidas de fluorescencia se obtuvieron, como en el caso anterior, a una longitud de onda de excitación de 420 nm y de emisión de 350 nm.

Tras la realización de las rectas de regresión de las curvas patrón, se extrapolaron los valores de absorbancia de las muestras problema, para hallar las concentraciones de GSH o GSSG para cada una de las muestras, según la siguiente ecuación:

$$\text{mg GSH o GSSG} = (\Delta A_m - b) / a \times C \times v$$

Siendo ΔA_m el valor de absorbancia de la muestra; b la ordenada en el origen de la recta patrón correspondiente; a , la pendiente de la recta; C la concentración de proteínas en mg/ml y v el volumen de la muestra (50µl).

Para determinar el índice redox (**IR**) se aplicó la fórmula:

$$\text{IR} = \text{GSH}/\text{GSSG}$$

5.13. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES CASPASA 3, 8 Y 9

La actividad caspasa en los astrocitos se determinó mediante un método fluorimétrico basado en la detección de los productos de la hidrólisis de sustratos selectivos: N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metil-cumarina (Ac-DEVD-amc), N-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-metil-cumarina (Ac-IETD-amc) y N-acetil-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-metil-cumarina (Ac-LEHD-amc), para las caspasas 3, 8 y 9 respectivamente.

En primer lugar, para establecer las condiciones óptimas para la evaluación de la actividad de caspasas, se realizaron diferentes ensayos modificando el número de células utilizadas (2×10^5 , 3×10^5 o 4×10^5 células por pocillo), la concentración del tóxico oxidante (H_2O_2 : 500 µM, 750 µM y 1 mM) y los tiempos de actuación del tóxico oxidante (24 o 48 h) (Fig. 14).

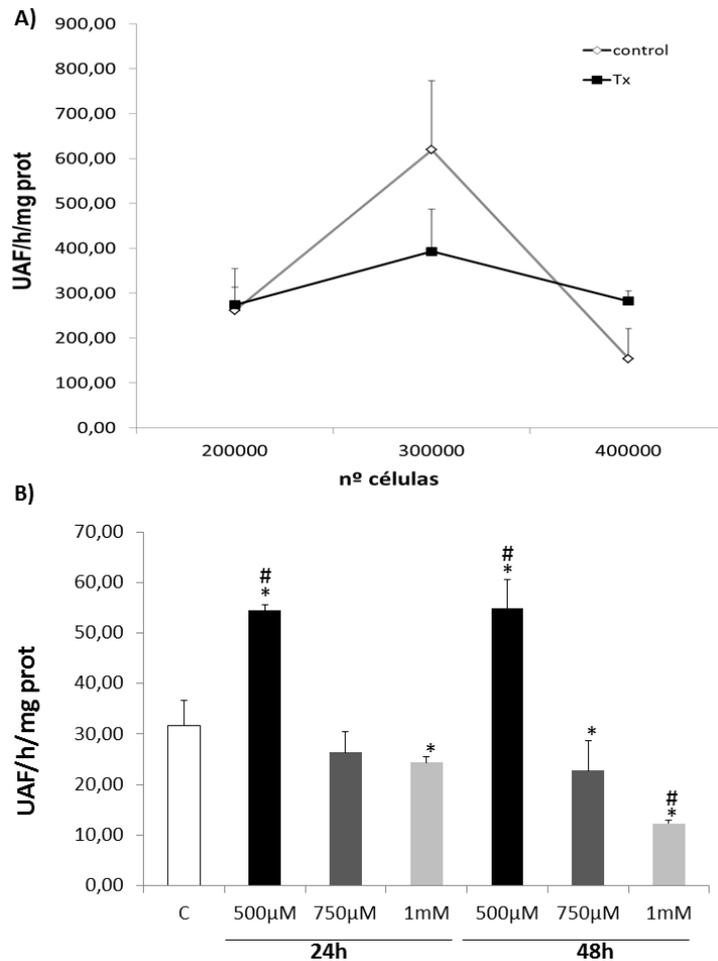


Figura 14. Variación de la actividad caspasa 3. A) Según el número de células utilizadas, en ausencia o presencia de un tóxico oxidante H_2O_2 [0,5 mM] diluido en DMEM-m B) Según el tiempo de reacción a 24 h y 48 h, con diferentes concentraciones de H_2O_2 : 500 μ M, 750 μ M y 1 mM. Los resultados se expresaron como media \pm DS (n=7) de tres experimentos independientes. *p< 0,005; # p<0,001 vs control.

Procedimiento

Se cultivaron las células en placas de 96 pocillos, con una densidad de 300.000 células por pocillo, en 100 μ l de DMEM-m durante 24 h. Posteriormente, se trataron con diferentes concentraciones de antocianidinas (5, 25 y 100 μ M) y se incubaron durante 24 h. A continuación se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 300 μ l de tampón de lisis (10 mM Tris, 130 mM de NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM pirofosfato sódico, 10 mM difosfato sódico; ajustando el pH a 7,5) al cual se adicionó en el momento de su utilización ditiotreitól (DTT) 2 mM (1,5 mg de DTT por 5 ml de tampón), para evitar la oxidación de los enzimas. Las células se recogieron mediante raspado o *scratching* en tubos Eppendorf manteniéndose a -20°C hasta su valoración.

Para determinar la actividad caspasa, se centrifugaron las suspensiones celulares a 13.000 rpm durante 10 min y se recogieron los sobrenadantes. Tras valorar su concentración de proteínas (apartado 5.8.), se realizó la valoración de las actividades enzimáticas.

En placas de 96 pocillos, se añadieron 100 µl de sobrenadante; 50 µl de tampón de reacción (20 mM HEPES, 10% glicerol; ajustar a pH 7,5; en el momento de su utilización se añadió DTT 2 mM como en el caso anterior); y 3,5 µl de los correspondientes sustratos para cada una de las caspasas. En los tres casos, los péptidos disueltos en PBS y liofilizados se reconstituyeron con DMSO (1mg/1ml).

A continuación, se midió la fluorescencia a tiempo cero y cada hora, durante 24 h. Entre lectura y lectura, se mantuvieron las células en incubador a 37°C. Las longitudes de onda para caspasa 3 fueron 360/40 nm excitación y 480/20 nm emisión a una sensibilidad de 60. Para caspasas 8 y 9, 360/40 nm de excitación y 528/20 nm de emisión, con una sensibilidad de 80. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los efectos de las antocianidinas sobre las actividades caspasa 3, 8 y 9 se cuantificaron hallando la pendiente de la recta para cada una de ellas (unidad arbitraria de fluorescencia [UAF]/h) a diferentes tiempos (0; 1; 2; 3; 4; 5; 22; 23; y 24 horas), refiriendo el valor a los mg de proteína que contienen:

$$\text{UAF/h/mg prot} = (\text{UAF/h} \times 1000) / \text{mg prot}$$

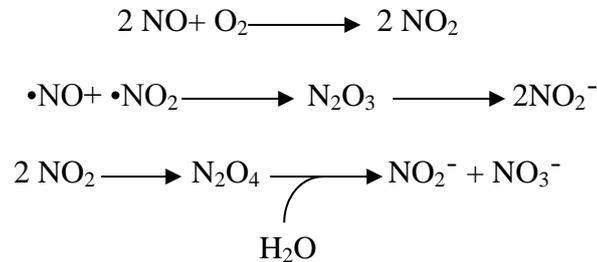
En las gráficas se representa el porcentaje de cada actividad caspasa con respecto al control (100%).

5.14. DETERMINACIÓN DE NITRITOS

A nivel del SNC, el NO actúa como modulador de procesos fisiopatológicos. Su producción está regulada por el isoenzima iNOS. En las células gliales, el iNOS se activa por diferentes estímulos. Estudios realizados en cultivos celulares de astrocitos y microglía de roedores, indican que tanto LPS como la combinación de determinadas citocinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α e INF-γ), son capaces de inducir su activación (Hewett y col., 1993; Simmons y Murphy, 1993). Por el contrario, en astrocitos humanos, la activación solo se produce en respuesta a la combinación de IL-1β, TNF-α e INF-γ y no en presencia de LPS solo (Hu y col., 1995; Zhao y col., 1998).

La actividad enzimática iNOS podría evaluarse cuantificando el NO producido, no obstante, al ser éste un gas altamente difusible con una vida media muy corta, resulta muy difícil. Por ello, se recurre a la valoración indirecta mediante la cuantificación espectrofotométrica de sus metabolitos estables, nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻), utilizando la reacción de Griess (Muñoz-Fuentes y col., 2003). Con este reactivo (5 ml de N-(1-naftil) etilendiamina al 0,1% + 5 ml sulfanilamida 1%, en H₃PO₄ al 5%), el

NO_2^- se convierte en ión diazonio que al acoplarse a la N-(1-naftil) etilendiamina forma un cromóforo azo-derivado de color rosa.



Para la determinación de nitritos se siguió la metodología de Muñoz-Fuentes y col. (2003), con varias modificaciones.

Procedimiento

En una placa de 96 pocillos, se sembraron 10^4 células por pocillo. Tras 24 h de incubación, se trataron con las diferentes concentraciones de antocianidinas utilizando medio DMEM-m. Se mantuvo el tratamiento durante 24 h en incubador a 37°C y 5% CO_2 . Sin retirar el medio de cultivo, se añadieron 160 U de $\text{INF-}\gamma$ y se dejó actuar durante 48 h.

Se tomaron 100 μl de cada pocillo y se llevaron a otra placa de 96, adicionando 100 μl de reactivo de Griess. Después de 30 min en la oscuridad, se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 550 nm. Las concentraciones de nitritos se calcularon mediante la extrapolación de las absorbancias obtenidas para cada una de las muestras a una curva patrón de nitrato sódico, con un rango de concentraciones entre 5 y 100 μM (Fig. 15).

Los resultados se expresaron como porcentajes de liberación o inhibición según las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{Lib} = (c_m \times 100) / c_{\text{fy}}$$

$$\% \text{Inh} = 100 - \% \text{Lib}$$

Siendo c_m la concentración extrapolada de cada una de las muestras y c_{fy} la concentración extrapolada del $\text{INF-}\gamma$.

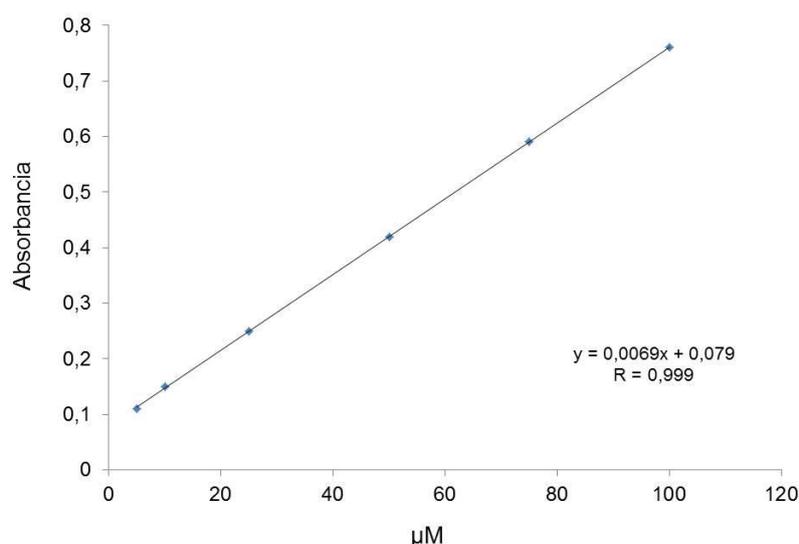


Figura 15. Recta de calibración de nitrato sódico (5-100 μM) a λ 550 nm.

5.15. MODELO DE PARKINSONISMO INDUCIDO POR MPTP

El compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), es un derivado meperidínico que posee la capacidad de inducir una alteración celular similar a la originada en una enfermedad neurodegenerativa como es la enfermedad de Parkinson.

Para determinar el efecto protector de las antocianidinas frente al daño inducido por MPTP se siguió el procedimiento descrito por Jia y col. (2009), evaluando la viabilidad celular por el método del MTT (apartado 5.3.).

Procedimiento

En placa de 96 pocillos se incuban los astrocitos (5×10^4 por pocillo), con medio DMEM-m durante 24h. Al cabo de ese tiempo se tratan las células con las muestras de antocianidinas o con tritón (10 μl) o con MPTP (Sigma-Aldrich) (1 mM) o con trolox (0,5 mM). A las 24 h, a las células tratadas con antocianidinas se les retira el medio y se tratan con MPTP (1 mM) en medio DMEM-m, incubándose de nuevo durante 24 h.

A continuación se realiza la evaluación de la viabilidad celular por MTT (apartado 5.3.). Todas las muestras y controles se analizan por triplicado.

5.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores se expresaron como media ± desviación estándar ($M \pm SD$) de al menos tres experimentos independientes. Para comparar el grupo control con los grupos tratados se utiliza el test ANOVA simple

seguido del test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Se calcularon las diferencias entre cada par de medias, mostrando diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0 (Martín Andrés y Luna del Castillo, 1989). En estos test se considera que un valor de $p < 0,05$ es estadísticamente significativo.

Los datos del ensayo ORAC se trataron estadísticamente utilizando el test de rango múltiple de Duncan.

3.17. APARATOS UTILIZADOS Y CONSUMIBLES

Aparatos

- Autoclave P. Selecta (España)
- Balanza D-600 Cobos y de precisión Metler AJ100 (Suiza)
- Baño termostático modelo Unitronic 320 OR, Selecta precistern (España)
- Cabinas de flujo laminar vertical modelo BV-100, Telstar Industrial S.L. Barcelona (España) y modelo Thermo Scientific (España)
- Centrífuga refrigerada Solvall RT 6000 D Dupont (USA)
- Congelador de -80°C Hetofrig CL 410 (Escandinavia)
- Cromatógrafo Agilent 1260
- Cromatógrafo Hewlett Packard 1100 MS (USA)
- Cromatógrafo HPLC-PAD Waters (USA)
- Espectrofluorímetro Optima Fluostar, BMG Labtechnologies GmbH (Alemania)
- Espectrofotómetro UVIKON 930 Kontron Instruments (USA)
- Evaporador Turbo Vap Zymark Corporation (USA)
- Extractor ASE 200 DIONEX Corporation (USA)
- Fluorímetro FLx800 microplate fluorescent reader Bio-Tek, Instruments, In (USA)
- Germinador G-120 Snijders International S.L. (Holanda)
- Lector de placas Digiscan microplate reader Asys Hitech GMBH (Alemania)
- Microscopio Nikon TMS de contraste de fase (Japón)
- Nevera (2° - 8°C) Balay con congelador (-20°C) Balay (España)
- Peachímetro pH meter basic 20, Crison Instruments S.A. 2002 (España)
- Sonicador UP-100H, Lab Net bioquímica (España)
- Tanque de nitrógeno líquido Taylor Wharton 35 VHC (Alemania)
- Ultracentrífuga refrigerada Solvall RL-5B refrigerated superspeed centrifuge Dupont Instruments (USA)
- Vortex: Heidolph REA x 2000 (Alemania)

Consumibles

- Tubos Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml y 2 ml, Sarstedt (Alemania)
- Filtros de $0,45\ \mu$ y $0,22\ \mu$ de acetato de celulosa. Millipore Co. Billerica (USA)
- Frascos de cultivo estériles de 75cm^2 , Sarstedt (Alemania)

- Pipetas estériles de 10ml, Sarstedt (Alemania)
- Placas de 96 pocillos negras, Sarstedt (Alemania)
- Placas de Petri y placas de 96 y 24 pocillos estériles Sarstedt (Alemania)
- Tubos Falcon estériles de 50ml y 15ml, Sarstedt (Alemania)

RESULTADOS

1. LEGUMINOSAS

1.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES FENÓLICOS DE LEGUMINOSAS CRUDAS Y PROCESADAS.

1.1.1. Judías de Tolosa (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tolosana)



(Resultados publicados en: López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chemistry 2013; 138(1): 547-55.)

Los compuestos identificados por HPLC-PAD y HPLC-ESI/MS, en base a su pico de absorción máxima (λ_{max}) y fragmentos moleculares, quedan reflejados en la tabla 4. Entre los ácidos fenólicos se ha constatado la presencia de los ácidos gálico, protocatéquico, *trans*-ferúlico, *trans* *p*-cumárico y sinápico y, sus derivados aldáricos (galactárico, altrárico o glutárico). Se han identificado igualmente numerosos flavonoides libres y derivados de los mismos: flavonas derivadas de apigenina; flavonoles derivados de quercetina, miricetina y kaempferol; flavanonas derivadas de naringenina y hesperetina; dímeros y trímeros de procianidinas; isoflavonas derivadas de genisteína, daidzeína, biochanina A y biochanina B; y antocianinas de delfinidina, cianidina, pelargonidina, petunidina y malvidina.

Se observan diferencias cualitativas y cuantitativas significativas entre las muestras crudas y procesadas (Tabla 5). Las diferencias cualitativas más importantes corresponden a las judías germinadas, ya que en éstas se observó la presencia de isoflavonas y sus derivados, y derivados de miricetina, prácticamente ausentes en las muestras crudas y cocidas. La cantidad total de isoflavonas en judías germinadas fue de 36,36 $\mu\text{g/g}$, mientras que en las muestras de judías crudas solo se encontró un derivado de genisteína en baja concentración (1,27 $\mu\text{g/g}$). Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados en semillas de soja (Lin y Lai, 2006).

Del grupo de las flavonas, solamente se detectó la presencia de un heterósido de apigenina en las muestras correspondientes a las judías sin procesar.

Las flavanonas más abundantes en las muestras de judías crudas fueron heterósidos de hesperitina (12,51 $\mu\text{g/g}$) y naringenina (17,28 $\mu\text{g/g}$), disminuyendo su concentración tras el procesado. Los derivados de hesperitina se redujeron a 9,36 $\mu\text{g/g}$ y 1,22 $\mu\text{g/g}$ tras la cocción o germinación respectivamente; y los derivados de naringenina a 3,84 $\mu\text{g/g}$ tras la cocción y a 9,18 $\mu\text{g/g}$ después de ser germinadas. Naringenina como genina libre solo se detectó en judías crudas.

También se observaron diferencias en la presencia y concentración de flavonoles. Como geninas libres, quercetina se detectó tanto en judías crudas como procesadas, kaempferol únicamente en crudas y germinadas, si bien parece ser más abundante en

estas últimas, y miricetina solo en judías germinadas. En forma de derivados heterosídicos, los compuestos más abundantes fueron los derivados de miricetina en muestras germinadas (54,06 µg/g), seguido de derivados de quercetina en muestras crudas (19,47 µg/g) y germinadas (20,08 µg/g) y, por último, los derivados de kaempferol (7,42 µg/g en crudas; 4,16 µg/g en cocidas y 11,06 µg/g en germinadas).

En judías no procesadas, los compuestos no antocianos que se encontraron en mayor concentración fueron los dímeros y trímeros de procianidinas (100,01 µg/g) (Tabla 5); este valor disminuyó significativamente en judías cocidas (11,48 µg/g), no detectándose dichos compuestos en muestras germinadas, debido probablemente a su polimerización en compuestos de mayor peso molecular. No obstante, si se ha descrito su presencia en otras leguminosas germinadas (López-Amorós y col., 2006).

En las muestras estudiadas se observó la presencia de formas isoméricas de los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, *p*-cumárico y sinápico) esterificados con ácidos aldáricos. En judías crudas, los derivados aldáricos del ácido ferúlico fueron los más abundantes (46,14 µg/g), encontrándose los derivados del ácido sinápico (17,34 µg/g) y del ácido *p*-cumárico (6,01 µg/g) en menor concentración. Después de procesar las semillas (cocción o germinación), se observó una disminución en la concentración de estos derivados, no obstante, tal como queda reflejado en la Tabla 5, los derivados del ácido ferúlico continuaron siendo los más abundantes.

Los ácidos hidroxicinámicos libres ferúlico, *p*-cumárico y sinápico, solamente fueron detectados en las muestras correspondientes a las judías cocidas. En judías crudas se apreció la presencia de ácido *trans*-ferúlico (7,37 µg/g), ausente en muestras procesadas.

Como representante del grupo de los estilbenos hay que mencionar la presencia de resveratrol (0,94 µg/g) exclusivamente en las muestras de judías germinadas.

Tabla 4.- Longitudes de onda máxima en el espectro ultravioleta e iones moleculares de compuestos fenólicos identificados en judías (*Phaseolus vulgaris* L.).

Compuestos no antocianos			
Compuestos	λ_{max}	[M-H]-	[M-H]-frag
Ácido gálico	273	169	
Ácido protocatéquico	256, 291	153	
Ácido ferulil aldárico	233, 326	285	209, 193
Ácido <i>trans</i> ferúlico	235, 322	193	
Ácido <i>p</i> -cumaril aldárico	233, 316	355	209, 173
Ácido <i>trans</i> <i>p</i> -cumárico	233, 314	173	
Ácido sinapil aldárico	235, 326	415	209, 223
Ácido sinápico	237, 323	223	
Dímero de procianidina	279	577	425, 289
Trímero de procianidina	279	865	577, 289
Hesperetina 7-neohesperidósido	287, 336sh	609	301
Hesperitina 7-rutinósido	288, 336sh	609	301
Hesperitina 7-glucósido	289, 334sh	463	301
Hesperitina derivado	288, 335sh		301
Naringenina 7-neohesperidósido	286, 332sh	579	271
Naringenina 7-rutinósido	286, 332sh	579	271
Naringenina 7-glucósido	286, 327sh	433	271
Naringenina-7-metil éter 2	287, 325sh	285	
Naringenina	288, 328sh	271	
Quercetina 3-rutinósido	256, 354	609	301
Quercetina 3-galactósido	257, 361	463	301
Quercetina 3-glucósido	256, 359	463	301
Acetato de quercetina 3-glucósido	257, 358	505	301
Quercetina	256, 374	301	
Kaempferol 3-glucósido	264, 348	447	285
Acil kaempferol 3-rutinósido	262, 347		593, 285
Kaempferol	264, 348	285	
Miricetina 3-glucósido	261, 354	479	317
Derivado de miricetina	261, 354	521	317
Miricetina	254, 372	317	
Apigenina 7-glucósido	267, 334	431	269
Biochanina B 7-glucósido	259, 305sh	429	267
Biochanina A 7-glucósido	261, 335sh	445	283
Derivado de daidzeina	261, 298sh		253
Genistéina hexosa	260, 327sh	431	269
Derivado de genistéina	259		269
<i>trans</i> Resveratrol glucósido	318	389	
Antocianinas			
Delfinidina 3-glucósido	278, 526	465	303
Cianidina 3-glucósido	275, 518	449	287
Pelargonidina 3,5-diglucósido	278, 526	595	271
Pelargonidina 3-glucósido	372, 503	433	271
Acil delfinidina glucósido	274, 526	479	303
Acil pelargonidina glucósido	278, 334sh, 528	447	271
Pelargonidina 3-malonilglucósido	278, 530	519	271
Petunidina feruloil glucosa	274, 340sh, 526	507	317
Derivado de petunidina	274, 528		317
Derivado de malvidina	271, 530		331

Tabla 5.- Concentración ($\mu\text{g/g}$) de los compuestos fenólicos en judías crudas, cocidas y germinadas.

COMPUESTOS FENÓLICOS [$\mu\text{g/g}$]	J. CRUDAS	J. COCIDAS	J. GERMINADAS
Apigenina 7-glucósido	$3,89 \pm 0,21$	nd	nd
Hesperitina 7-neohesperidósido	nd	$7,56 \pm 0,45$	nd
Hesperitina 7-glucósido	nd	nd	$1,22 \pm 0,09$
Hesperitina 7-rutinósido	$12,04 \pm 0,58$	$1,25 \pm 0,12$	nd
Hesperitina derivado	$0,47 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,04$	nd
Naringenina 7-neohesperidósido	$11,14 \pm 0,34$	$0,61 \pm 0,07$	nd
Naringenina 7-rutinósido	$3,93 \pm 0,31$	$0,98 \pm 0,08$	nd
Naringenina-7-metil-2-eter	$2,21 \pm 0,12$	$2,25 \pm 0,11$	nd
Naringenina 7-glucósido	nd	nd	$9,18 \pm 0,56$
Naringenina	$1,48 \pm 0,11$	nd	nd
Quercetina 3-galactósido	$1,33 \pm 0,14$	$6,13 \pm 0,32$	nd
Quercetina 3-glucósido	$8,51 \pm 0,57$	nd	nd
Acetato de quercetina 3-glucósido	$9,63 \pm 0,41$	nd	nd
Quercetina 3-rutinósido	nd	nd	$8,55 \pm 0,61$
Acetato de quercetina 3-glucósido	nd	nd	$11,53 \pm 0,41$
Quercetina	$3,41 \pm 0,21$	$1,54 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,06$
Kaempferol 3-glucósido	$7,42 \pm 0,36$	$4,16 \pm 0,21$	$7,57 \pm 0,35$
Kaempferol	$1,01 \pm 0,01$	nd	$9,14 \pm 0,64$
Acil kaempferol 3-rutinósido	nd	nd	$3,49 \pm 0,17$
Apigenina 7-glucósido	$3,89 \pm 0,21$	nd	nd
Miricetina 3-glucósido	nd	nd	$31,31 \pm 1,11$
Miricetina derivado	nd	nd	$8,28 \pm 0,43$
Miricetina derivado	nd	nd	$14,47 \pm 0,87$
Miricetina	nd	nd	$3,97 \pm 0,18$
Biochanina B 7-glucósido	nd	nd	$6,09 \pm 0,19$
Biochanina A 7-glucósido	nd	nd	$2,31 \pm 0,14$
Daidzeína derivado	nd	nd	$0,35 \pm 0,03$
Genisteína derivado	$1,27 \pm 0,06$	nd	$17,11 \pm 1,01$
Genisteína derivado	nd	nd	$10,15 \pm 0,95$
Genisteína hexosa	nd	nd	$0,35 \pm 0,02$
Procianidina dímero	$39,64 \pm 1,11$	$0,72 \pm 0,06$	nd

Procianidina dímero	49,89 ± 1,01	1,33 ± 0,05	nd
Procianidina dímero	7,76 ± 0,31	5,75 ± 0,31	nd
Procianidina dímero	nd	3,68 ± 0,21	nd
Procianidina trímero	2,72 ± 0,18	nd	nd
Ácido protocatéquico	0,21 ± 0,02	0,27 ± 0,03	nd
Ácido gálico	nd	nd	0,78 ± 0,05
Ácido feruloil aldárico	0,62 ± 0,07	0,58 ± 0,05	2,89 ± 0,17
Ácido feruloil aldárico	4,01 ± 0,32	0,38 ± 0,03	5,78 ± 0,22
Ácido feruloil aldárico	1,26 ± 0,11	3,92 ± 0,31	nd
Ácido feruloil aldárico	8,63 ± 0,34	6,07 ± 0,35	nd
Ácido feruloil aldárico	20,87 ± 1,07	6,32 ± 0,33	nd
Ácido feruloil aldárico	10,75 ± 0,52	nd	nd
Ácido ferúlico	nd	4,71 ± 0,33	nd
Ácido <i>trans</i> ferúlico	7,37 ± 0,26	nd	nd
Ácido p-cumaroil aldárico	1,49 ± 0,13	0,45 ± 0,03	0,45 ± 0,04
Ácido p-cumaroil aldárico	1,08 ± 0,07	1,54 ± 0,09	0,16 ± 0,01
Ácido p-cumaroil aldárico	3,44 ± 0,32	nd	1,11 ± 0,05
Ácido p-cumaroil aldárico	nd	nd	0,56 ± 0,04
Ácido p-cumaroil aldárico	nd	nd	1,13 ± 0,03
Ácido p-cumárico	nd	1,59 ± 0,07	1,13 ± 0,11
Ácido sinapil aldárico	0,94 ± 0,08	0,91 ± 0,08	3,08 ± 0,27
Ácido sinapil aldárico	6,68 ± 0,29	3,03 ± 0,20	nd
Ácido sinapil aldárico	9,72 ± 0,42	0,76 ± 0,07	nd
Ácido sinápico	trazas	5,03 ± 0,34	nd
Resveratrol glucósido	nd	nd	0,94 ± 0,05

(nd: no detectado)

Respecto al contenido en antocianos, detectados a una longitud de onda de 530 nm, su concentración se redujo de forma importante (68 %) tras la cocción. En las muestras crudas la concentración total de antocianinas fue de 143,68 $\mu\text{g/g}$, siendo las más abundantes cianidina 3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido (Tabla 6). Tras la cocción, aunque disminuyó la concentración total (46,45 $\mu\text{g/g}$), se mantuvo la relación porcentual entre ellas, manteniéndose como más abundantes los heterósidos de cianidina y pelargonidina.

Tras siete días de germinación, la concentración total de antocianinas fue muy similar a la encontrada en judía crudas (143,73), no obstante se identificaron nuevos compuestos como petunidina-feruloil-glucósido, pelargonidina-3,5-diglucósido, y dos compuestos que podrían ser derivados de petunidina y malvidina. El primero de ellos resultó ser el más abundante en estas muestras (58 $\mu\text{g/g}$).

Tabla 6.- Concentración ($\mu\text{g/g}$) de las antocianinas identificadas en judías crudas y procesadas.

COMPUESTO [$\mu\text{g/g}$]	J. CRUDAS	J. COCIDAS	J. GERMINADAS
Cianidina 3-glucósido	88,44 \pm 3,87	28,44 \pm 1,06	9,12 \pm 1,05
Pelargonidina 3-glucósido	50,72 \pm 2,42	14,25 \pm 1,58	nd
Pelargonidina 3-glucósido acilado	0,38 \pm 0,02	nd	nd
Pelargonidina malonil glucósido	0,48 \pm 0,03	1,45 \pm 0,11	nd
Pelargonidina 3,5-diglucósido	trazas	trazas	30,46 \pm 1,85
Delfinidina 3-glucósido	3,55 \pm 0,18	2,31 \pm 0,14	15,87 \pm 1,59
Delfinidina 3-glucósido acilado	0,11 \pm 0,02	nd	nd
Petunidina feruloil glucosa	nd	nd	58,76 \pm 2,38
Derivado de petunidina	nd	nd	11,88 \pm 1,08
Derivado de malvidina	nd	nd	17,64 \pm 1,67

(nd: no detectado)

1.1.2. Lenteja de la Armuña (*Lens culinaris* Medik. cv. Rubia de la Armuña)

Como en el caso de las judías, en lentejas crudas y procesadas, utilizando cromatografía HPLC-PAD y HPLC-ESI/MS y en base a los λ máx y fragmentos moleculares obtenidos en la espectroscopía de masas, se identificaron diferentes compuestos fenólicos como dímeros y trímeros de procianidinas y prodelfinidinas; galato de procianidinas; flavonoles como kaempferol y quercetina, y sus derivados; luteolina y derivados de la misma; heterósido de catequina; y ácidos fenólicos libres (ácido *trans p*-cumárico y protocatéquico) y sus correspondientes derivados (Tabla 7).

Tabla 7. Longitud de onda máxima de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) e iones moleculares de los compuestos fenólicos identificados en lentejas (*Lens culinaris* Medik.).

COMPUESTOS	$\lambda_{\text{máx}}$	[M-H]-	[M-H]-
Trímero de prodelfinidina (2GC-C)	276	897	593, 289
Dímero de prodelfinidina (GC-C)	276	593	289
Dímero de digalato de procianidina (P2 G2)	278	881	729, 289
Dímero de procianidina	278	577	289
Trímero de procianidina	278	865	577, 289
Ácido protocatéquico	255	153	
Dímero de procianidina	278	577	289
Derivado del ácido <i>p</i> -cumárico	312		163
Trímero de procianidina	280	865	577, 289
Catequina hexosa	280	451	289
Ácido <i>p</i> -cumaroil málico	308	278	163
Ácido <i>p</i> -cumaroil glicólico	314	220	163
Dímero de procianidina galato (P2 G1)	280	729	289
Dímero de procianidina	278	577	289
Derivado de dihidroquercetina	266		303
Trímero de procianidina	278	865	577, 289
Kaempferol ramnosa-hexosa-hexosa-ramnosa	266,348	901	755,285
Ácido trans- <i>p</i> -cumárico	309	163	
Kaempferol hexosa-hexosa-ramnosa	266, 348	755	593, 285
Kaempferol ramnosa-ramnosa-hexosa	268, 348	739	593, 284
Kaempferol xilosa-glucosa	266,350	579	285
Luteolina ramnosa-hexosa-hexosa	268, 340	755	285, 227
Kaempferol ramnosa-hexosa	266, 348	593	285
Kaempferol glucósido	265, 347	447	285
Kaempferol hexosa-ramnosa-hexosa (<i>p</i> -cumaroil)-hexosa	270, 314	1047	901, 285
Kaempferol hexosa-ramnosa-(<i>p</i> -cumaroil)-hexosa-hexosa	270, 316	1047	901, 755, 285
Luteolina ramnosa-hexosa	268, 338	593	431, 285
Luteolina glucósido	264, 340	447	285
Acetato de quercetina glucósido	262, 293sh, 358	505	301
Kaempferol	267, 367	285	
Luteolina	253, 352	285	

2GC-C= galocatequina-galocatequina-catequina; GC-C= galocatequina-catequina
 P2G1 = galato de procianidina dímero; P2G2 = digalato procianidina dímero

En el análisis cromatográfico de lentejas crudas y procesadas se observaron dos picos a λ 238 nm y 422 nm, que podrían corresponder a dos compuestos tipo aurona.

En algunos casos, la identificación se realizó empleando estándares comerciales analizados bajo las mismas condiciones y por el mismo método cromatográfico.

En la tabla 8 se muestran las diferencias cuantitativas y cualitativas observadas en la composición fenólica de las lentejas crudas y procesadas. En lentejas crudas los compuestos que se encuentran en mayor concentración (55,1 $\mu\text{g/g}$) son dímeros y trímeros de procianidinas, dímeros de prodelfinidinas y digalato de procianidina. Esta concentración se reduce significativamente tras la cocción, no detectándose en las muestras germinadas. En muestras de lentejas crudas también se encuentra en concentración elevada catequina en forma heterosídica (53,08 $\mu\text{g/g}$). Como en el caso anterior, se reduce significativamente en lentejas cocidas y desaparece en muestras germinadas.

Como representantes del grupo de las flavonas, se han identificado luteolina libre y sus derivados mono-, di- y tri-heterosídicos. Los derivados heterosídicos se encuentran en mayor cantidad en las muestras crudas (36,5 $\mu\text{g/g}$) en comparación con las lentejas cocidas (6,09 $\mu\text{g/g}$) o germinadas (11,88 $\mu\text{g/g}$). Por el contrario, la genina libre se encuentra en mayor concentración en las muestras cocidas (2,35 $\mu\text{g/g}$) y germinadas (1,87 $\mu\text{g/g}$), no detectándose en las lentejas crudas, lo que podría ser consecuencia de procesos hidrolíticos.

También se han identificado derivados del kaempferol con diferente grado de glicosilación, siendo los más abundantes los derivados del kaempferol tetraglicosilados, probablemente kaempferol ramnosa-hexosa-hexosa-ramnosa (743,4 $\mu\text{g/g}$ en crudas; 556,47 $\mu\text{g/g}$ en cocidas y 376,54 $\mu\text{g/g}$ en germinadas). El procesado parece influir en la presencia del resto de derivados pues, en la mayoría de los casos, se observa un incremento en su concentración en las muestras de lentejas cocidas y germinadas, respecto a las crudas. Es de destacar la mayor presencia de derivados *p*-cumaroil en las muestras germinadas.

A diferencia de lo que ocurre en judías, la presencia de derivados de quercetina en lentejas es muy baja.

Por último, en lentejas, los ácidos fenólicos se encuentran poco representados a excepción del ácido *trans-p*-cumárico, más abundante en lentejas cocidas (28,15 $\mu\text{g/g}$) que en crudas (9,70 $\mu\text{g/g}$) o germinadas, en donde no ha sido posible su detección; o el ácido *p*-cumárico, solo detectado en muestras de lentejas germinadas (5,14 $\mu\text{g/g}$).

Tabla 8. Concentración ($\mu\text{g/g}$) de los compuestos fenólicos identificados en lentejas (*Lens culinaris* Medik.), crudas y procesadas.

COMPUESTOS FENÓLICOS [$\mu\text{g/g}$]	L. CRUDAS	L. COCIDAS	L. GERMINADAS
Trímero de prodelfinidina (2GC-C)	3,03 \pm 0,24	nd	nd
Dímero de prodelfinidina (GC-C)	3,47 \pm 0,32	0,69 \pm 0,05	nd
Digalato de procianidina dímero (P2 G2)	0,89 \pm 0,07	nd	nd
Dímero de galato procianidina (P2 G1)	Nd	1,45 \pm 0,11	nd
Dímero de procianidina	25,03 \pm 1,07	0,19 \pm 0,02	nd
Dímero de procianidina	1,61 \pm 0,06	0,53 \pm 0,04	nd
Dímero de procianidina	0,69 \pm 0,03	3,83 \pm 0,17	nd
Dímero de procianidina	nd	3,48 \pm 0,21	nd
Trímero de procianidina	17,42 \pm 1,01	nd	nd
Trímero de procianidina	2,96 \pm 0,14	nd	nd
Catequina hexosa	53,08 \pm 1,03	8,87 \pm 0,34	nd
Luteolina	nd	2,35 \pm 0,12	1,87 \pm 0,09
Luteolina ramnosa-hexosa-hexosa	nd	3,58 \pm 0,14	nd
Luteolina ramnosa-hexosa	13,93 \pm 0,78	2,51 \pm 0,12	8,39 \pm 0,61
Luteolina glucósido	22,571 \pm 1,06	nd	3,49 \pm 0,15
Kaempferol	0,53 \pm 0,06	2,89 \pm 0,14	2,11 \pm 0,07
Kaempferol glucósido	0,51 \pm 0,02	6,05 \pm 0,23	13,76 \pm 0,87
Kaempferol rutinósido	nd	nd	8,61 \pm 0,43
Derivado de kaempferol	nd	nd	14,68 \pm 0,97
Kaempferol ramnosa-hexosa-hexosa ramnosa	743,43 \pm 15,02	556,47 \pm 13,48	376,54 \pm 12,17
Kaempferol hexosa-hexosa-ramnosa	0,41 \pm 0,03	1,28 \pm 0,11	4,15 \pm 0,15
Kaempferol ramnosa-ramnosa-hexosa	2,29 \pm 0,13	7,91 \pm 0,53	11,09 \pm 0,31
Kaempferol hexosa-ramnosa-hexosa-(<i>p</i> -cumaroil)-hexosa	6,65 \pm 0,24	9,81 \pm 0,44	93,85 \pm 12,81
Kaempferol, hexosa-ramnosa-hexosa-(<i>p</i> -cumaroil) hexosa	nd	nd	1,09 \pm 0,04
Kaempferol, hexosa-ramnosa-(<i>p</i> -cumaroil)-hexosa-hexosa	23,62 \pm 1,11	19,66 \pm 1,06	258,23 \pm 9,89
Kaempferol hexosa-ramnosa-(<i>p</i> -cumaroil)-hexosa-hexosa	nd	nd	11,87 \pm 0,46
Kaempferol xilosa-glucosa	nd	5,16 \pm 0,19	1,41 \pm 0,13
Kaempferol ramnosa hexosa	nd	nd	24,75 \pm 1,05
Kaempferol hexosa ramnosa	nd	nd	1,36 \pm 0,06
Acetato de quercetina glucósido	1,44 \pm 0,09	nd	nd
Derivado de dihidroquercetina	nd	nd	3,68 \pm 0,29
Ácido protocatéquico	nd	0,05 \pm 0,01	0,69 \pm 0,05
Ácido <i>p</i> -cumárico	nd	nd	5,14 \pm 0,18
Ácido <i>p</i> -cumaroil málico	0,44 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04	0,92 \pm 0,07
Ácido <i>p</i> -cumaroil glicólico	0,13 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	0,64 \pm 0,07
Ácido <i>trans-p</i> -cumárico	9,70 \pm 0,41	28,15 \pm 1,12	nd

nd: no detectado

1.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL EN POLIFENOLES DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS CRUDAS Y PROCESADAS

En la determinación de la cantidad total de polifenoles (Folin-Ciocalteu) se realizó una curva de calibración con un estándar de ácido gálico (6,75-400 ppm) obteniendo un coeficiente de regresión de 0,9923. Los valores obtenidos se expresaron en ppm de ácido gálico/mg de leguminosa. En la siguiente tabla (Tabla 9) se expresan los resultados obtenidos con los dos tipos de leguminosas ensayadas crudas y procesadas.

Se observaron diferencias entre las LC y sus diferentes procesados. Por el contrario, no se observaron diferencias entre lentejas cocidas y germinadas. En el caso de las judías solo se observaron diferencias significativas entre las semillas sin procesar y las germinadas.

Comparando entre los distintos tipos de leguminosas, las lentejas presentaron un contenido total de fenoles significativamente menor al obtenido en judías, tanto en el caso de las semillas crudas como en procesadas.

Tabla 9. Concentración de fenoles totales (ppm de ácido gálico/mg leguminosas) de judías de Tolosa (*Phaseolus vulgaris* L.) y lentejas (*Lens culinaris* Medik.), crudas, cocidas y germinadas. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n= 9); diferencias significativas ($p < 0,05$) **a:** crudas vs procesadas; **b:** cocidas vs germinadas; **c:** judías vs lentejas.

Compuestos	mg GA*/g leguminosa \pm SD		
	Crudas (C)	Cocidas (B)	Germinadas (G)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	51,42 \pm 7,74	44,57 \pm 8,65	33,65 \pm 7,96 ^{a, b}
<i>Lens culinaris</i> Medik.	39,93 \pm 4,5 ^c	26,48 \pm 6,92 ^{a, c}	19,16 \pm 4,07 ^{a, c}

*GA: ácido gálico.

1.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES PEROXILO (ORAC) DE EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS CRUDAS Y PROCESADAS



(Resultados publicados en: López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chemistry 2013; 138(1): 547-55.)

La evaluación de la capacidad captadora de radicales peroxilo por el método de ORAC, mostró que, tanto en judías como en lentejas, el procesado tiene una influencia negativa, ya que el valor obtenido en los extractos de leguminosas crudas fue significativamente más elevado que en cocidas o germinadas (Tabla 10). Este efecto negativo del

procesado de las semillas sobre la capacidad captadora de radicales libres fue superior en el caso de las lentejas.

Tabla 10. Valores de ORAC ($\mu\text{mol TE/mg}$ de semillas) para judías (*Phaseolus vulgaris* L.) y lentejas (*Lens culinaris* Medik.) crudas y procesadas. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes ($n= 9$); diferencias significativas ($p < 0,05$): **a** crudas vs procesadas; **b** cocidas vs germinadas; **c** judías vs lentejas.

Compuestos	$\mu\text{mol TE/mg}$ de semillas \pm SD		
	Crudas (C)	Cocidas (B)	Germinadas (G)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	$0,94 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,03^a$	$0,56 \pm 0,01^{a,b}$
<i>Lens culinaris</i> Medik.	$1,21 \pm 0,1^c$	$1,10 \pm 0,07^{a,c}$	$0,40 \pm 0,05^{b,c}$

TE: equivalente de Trolox.

En la figura 11 se representan las áreas bajo la curva (AUC) de los resultados de ORAC obtenidos para los dos tipos de semillas de leguminosas, judías y lentejas, crudas, cocidas y germinadas. Se empleó Trolox como control positivo. Como se puede observar, las muestras de lentejas crudas presentan una pendiente muy similar al compuesto de referencia, lo que indica una alta captación de radicales peroxilo. El resto de las muestras presentan valores por debajo del compuesto de referencia, lo que indica una menor captación de radicales. Se puede observar además, tanto en las muestras de judías como de lentejas, una disminución en la capacidad captadora de radicales peroxilo en función del procesado (mayor en cocidas que en germinadas).

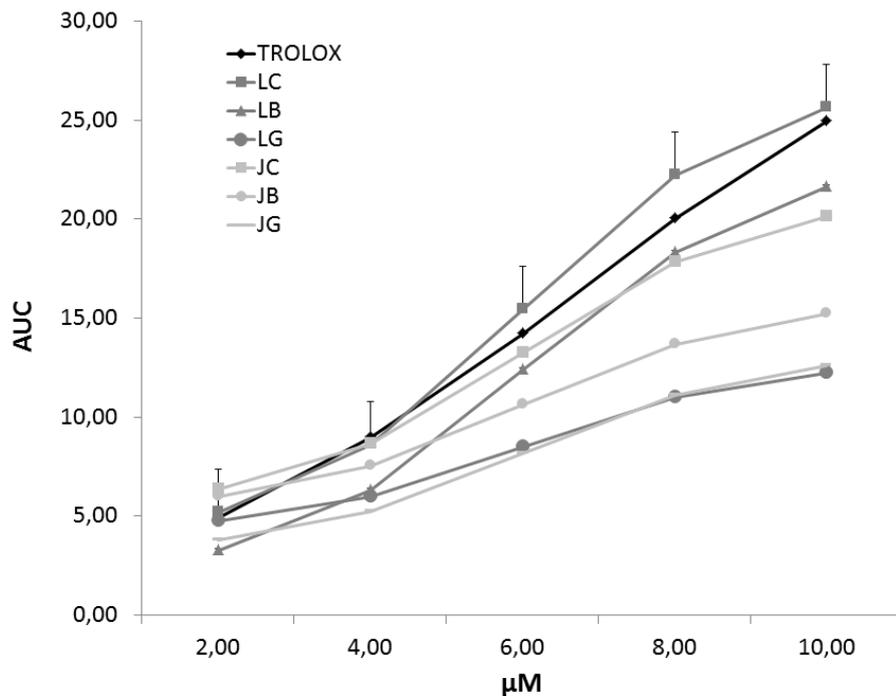


Figura 11- AUC de las diferentes muestras de leguminosas, crudas, cocidas y germinadas, frente a la concentración (μM), así como el del compuesto de referencia (trolox). Los resultados se representan como media \pm SD de tres experimentos independientes ($n= 9$).

1.4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CAPTADORA DEL RADICAL DIFENIL PICRIL HIDRACILO (DPPH) DE EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS CRUDAS Y PROCESADAS

Como en el caso anterior, al realizar el ensayo DPPH, se observó que el proceso de germinación induce un efecto negativo en la capacidad captadora de radicales libres de las muestras estudiadas de judías y lentejas (Tabla 11), en comparación a las correspondientes a semillas sin procesar o sometidas a cocción, observándose un incremento significativo en la CI_{50} . Así, para el caso de las muestras de judías de Tolosa, no se observaron diferencias significativas entre las muestras crudas ($0,149 \pm 0,04$ mg de leguminosa/ml) y cocidas ($0,170 \pm 0,05$ mg de leguminosa/ml). También en el caso de la lenteja, la determinación de la actividad captadora del radical DPPH, mostró potencia, estadísticamente superior en el caso de las lentejas crudas (valor CI_{50} de $0,142 \pm 0,034$ mg/ml de leguminosa) en comparación con las muestras germinadas ($0,329 \pm 0,09$ mg/ml de leguminosa), no encontrándose diferencias por el contrario, con las muestras cocidas ($0,151 \pm 0,02$ mg/ml de leguminosa) (Fig.12).

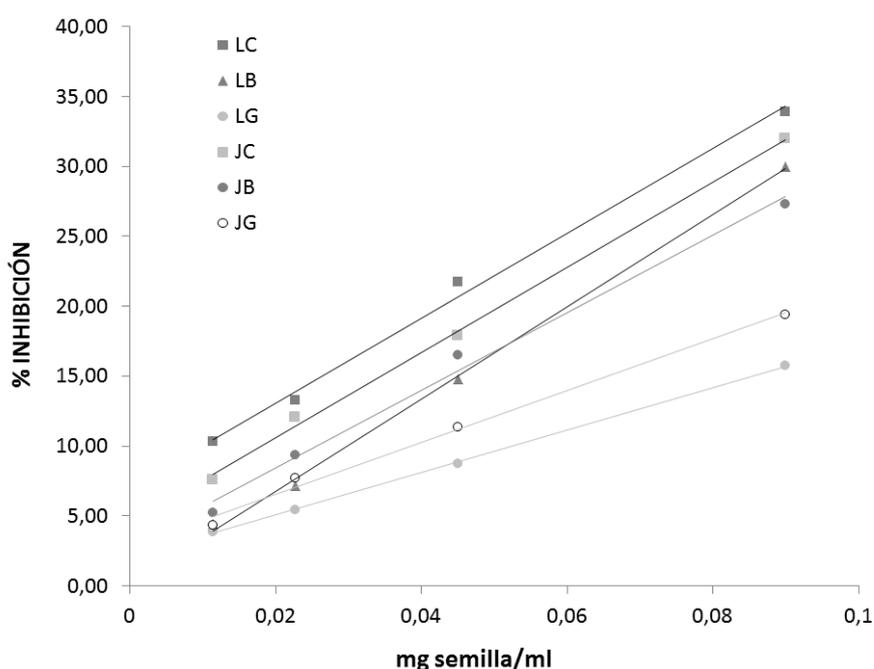


Figura 12. Porcentajes de inhibición en la captación de DPPH frente a distintas concentraciones de leguminosas crudas y procesadas. Los resultados se expresan como la media \pm SD, de tres experimentos independientes (n= 9).

Tabla 11. Concentración inhibitoria 50 (mg semillas/ml) de DPPH frente a distintas concentraciones de leguminosas crudas y procesadas. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n= 9); diferencias estadísticas (p< 0,05): **a** crudas vs procesadas; **b** cocidas vs germinadas; **c** judías vs lentejas.

Compuestos	CI ₅₀ (mg semillas/ml) \pm SD		
	Crudas (C)	Cocidas (B)	Germinadas (G)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	0,149 \pm 0,04	0,170 \pm 0,05	0,255 \pm 0,04 ^{a,b}
<i>Lens culinaris</i> Medik.	0,142 \pm 0,034 ^c	0,151 \pm 0,02 ^c	0,329 \pm 0,09 ^{a,b,c}

1.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS CRUDAS Y PROCESADAS



Resultados publicados en: López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chemistry 2013; 138(1): 547-55.

1.5.1. Evaluación de los efectos sobre la viabilidad celular

En primer lugar se confirmó la ausencia de toxicidad celular de las muestras de semillas de leguminosas crudas y procesadas sobre astrocitos en cultivo. En el caso de las judías, a las concentraciones estudiadas (0,25; 0,5 y 1 mg/ml), tanto los extractos crudos como los procesados, mantienen una viabilidad celular similar a la obtenida en células sin tratar y muy superior a la observada tras el tratamiento con el tóxico tritón (Fig. 13 A). Por tanto, en ningún caso, las muestras presentaron un efecto tóxico para el cultivo celular, de hecho, para determinadas concentraciones, se observa un incremento significativo en la supervivencia celular como consecuencia del tratamiento de las células con los extractos correspondientes a las muestras procesadas, principalmente las germinadas.

En el caso de las muestras de lentejas no se observaron diferencias significativas con respecto a las células control (células sin tratar), ni entre los diferentes procesados (Fig. 13 B).

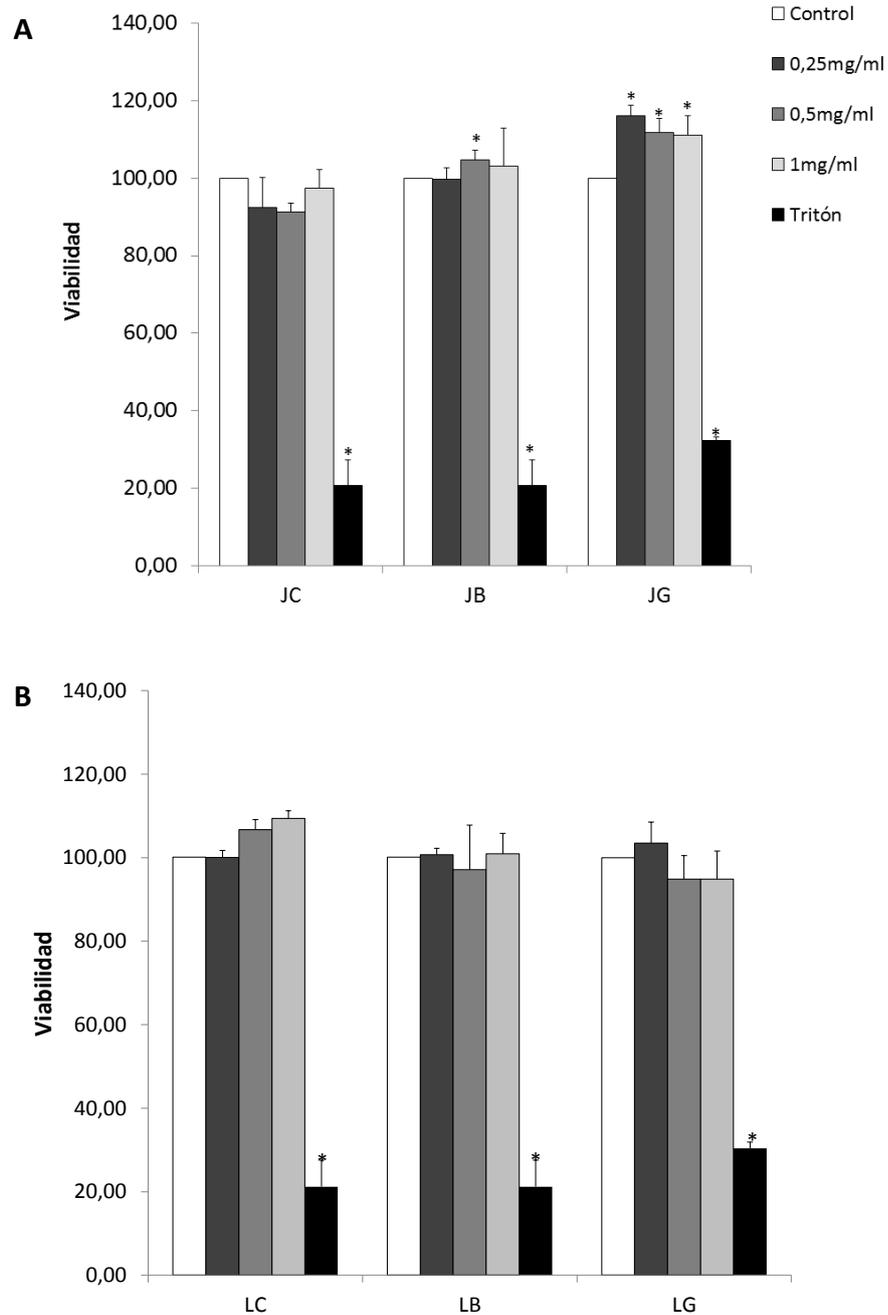


Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular de astrocytos respecto a las células sin tratar (100%) tras el tratamiento con los extractos de A) judías (*Phaseolus vulgaris* L.), B) lentejas (*Lens culinaris* Medik.), crudas y procesadas. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=11). Control negativo: Tritón. * $p < 0,05$ vs control.

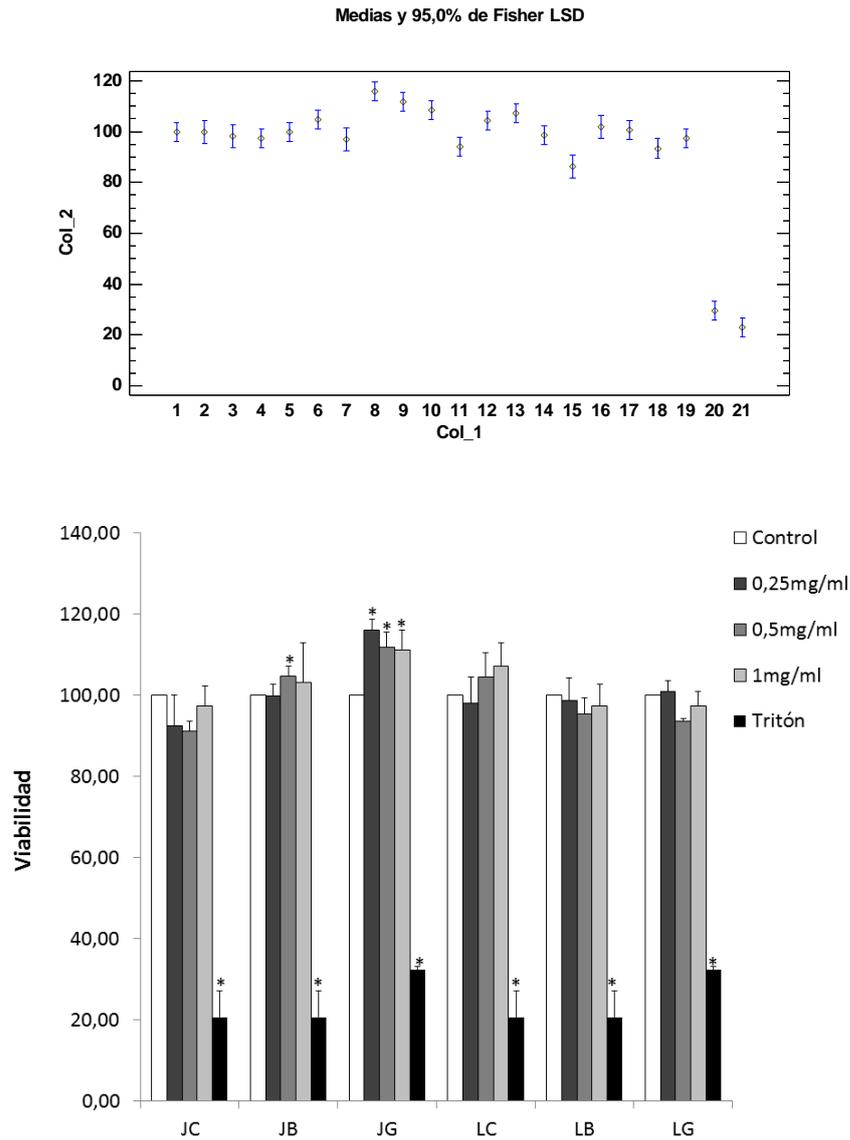


Figura 14. Porcentaje de viabilidad celular de las muestras de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* L. y *Lens culinaris* Medik.), crudas y procesadas, a las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 mg/ml. Se representan las medias aritméticas para cada una de las muestras, así como el intervalo de confianza según el test de rango múltiple de Fisher (95%). Siendo Col. 2 la variable dependiente (1: control, DMEM-m 1%; 2: JC 0,25mg/ml; 3: JC 0,5 mg/ml; 4: JC 1 mg/ml; 5: JB 0,25 mg/ml; 6: JB 0,5 mg/ml; 7: JB 1 mg/ml; 8: JG 0,25 mg/ml; 9: JG 0,5 mg/ml; 10: JG 1 mg/ml; 11: LC 0,25 mg/ml; 12: LC 0,5 mg/ml; 13: LC 1 mg/ml; 14: LB 0,25 mg/ml; 15: LB 0,5 mg/ml; 16: LB 1 mg/ml; 17: LG 0,25mg/ml; 18: LG 0,5 mg/ml; 19: LG 1 mg/ml; 20: tritón para muestras crudas y cocidas; 21: tritón para muestras germinadas. Col. 1 variable independiente: 1-21. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=11).* $p < 0,05$ vs control.

En la tabla 12 se recogen los valores de viabilidad celular, así como las diferencias estadísticas significativas entre concentraciones, procesados y tipo de leguminosa.

Tabla 12. % de viabilidad celular tras el tratamiento con diferentes concentraciones (mg/ml±SD) de extractos de judías (*Phaseolus vulgaris* L.) y lentejas (*Lens culinaris* Medik.), crudas y procesadas. Diferencias significativas $p < 0,05$: **a**, entre concentraciones; **b**, crudas vs procesadas; **c**, judías vs lentejas.

mg/ml	JC	JB	JG	LC	LB	LG
0,25	92,38±8,67 ^b	101,93±3,87	114,45±3,90 ^{a,b,c}	100,08±1,64 ^a	100,08±1,49 ^a	103,46±5,1 ^{a,c}
0,5	92,68±6,75 ^b	106,99±1,69 ^b	113,82±5,20 ^{a,b,c}	106,73±2,35 ^b	106,73±10,67 ^{a,b}	94,88±5,6 ^{a,b,c}
1	99,15±8,20	105,18±4,96	109,15±7,60 ^{a,b,c}	109,42±1,8 ^{a,b}	109,42±4,91 ^{a,b}	94,88±6,7 ^{a,b,c}

1.5.2. Determinación de la viabilidad celular frente al daño oxidativo inducido por el reactivo de Fenton

Para comprobar la actividad neuroprotectora de las muestras de semillas de leguminosas, se evaluó la viabilidad celular, empleando un modelo de toxicidad inducido por el reactivo de Fenton (FeSO_4 0,5mM/ H_2O_2 1mM). En la Figura 15 A se observa un significativo efecto protector salvo en el caso de las muestras de judías cocidas (0,25 mg/ml) y germinadas (1 y 0,5 mg/ml). No obstante, los tratamientos con los extractos de leguminosas no fueron capaces de revertir el daño sobre la viabilidad hasta su valor inicial. Entre procesados, se observaron diferencias significativas: por lo general las muestras de judías cocidas y crudas presentaron un mejor efecto protector que las correspondientes a las muestras germinadas, siendo mayor el efecto en el caso de las semillas sin procesar, a la misma concentración.

En el caso de las muestras de lentejas, se observó que tanto las obtenidas a partir de semillas sin procesar como procesadas eran capaces de revertir parcial y, en algún caso, totalmente (lentejas crudas y cocidas a las concentraciones de 1 y 0,5 mg/ml) el daño oxidativo inducido por el reactivo de Fenton (Fig. 15 B).

El estudio de las diferencias entre procesados mostró una mayor eficacia protectora en el caso de las lentejas cocidas. Asimismo se observó que la germinación disminuía significativamente la protección de las células frente a la acción del tóxico.

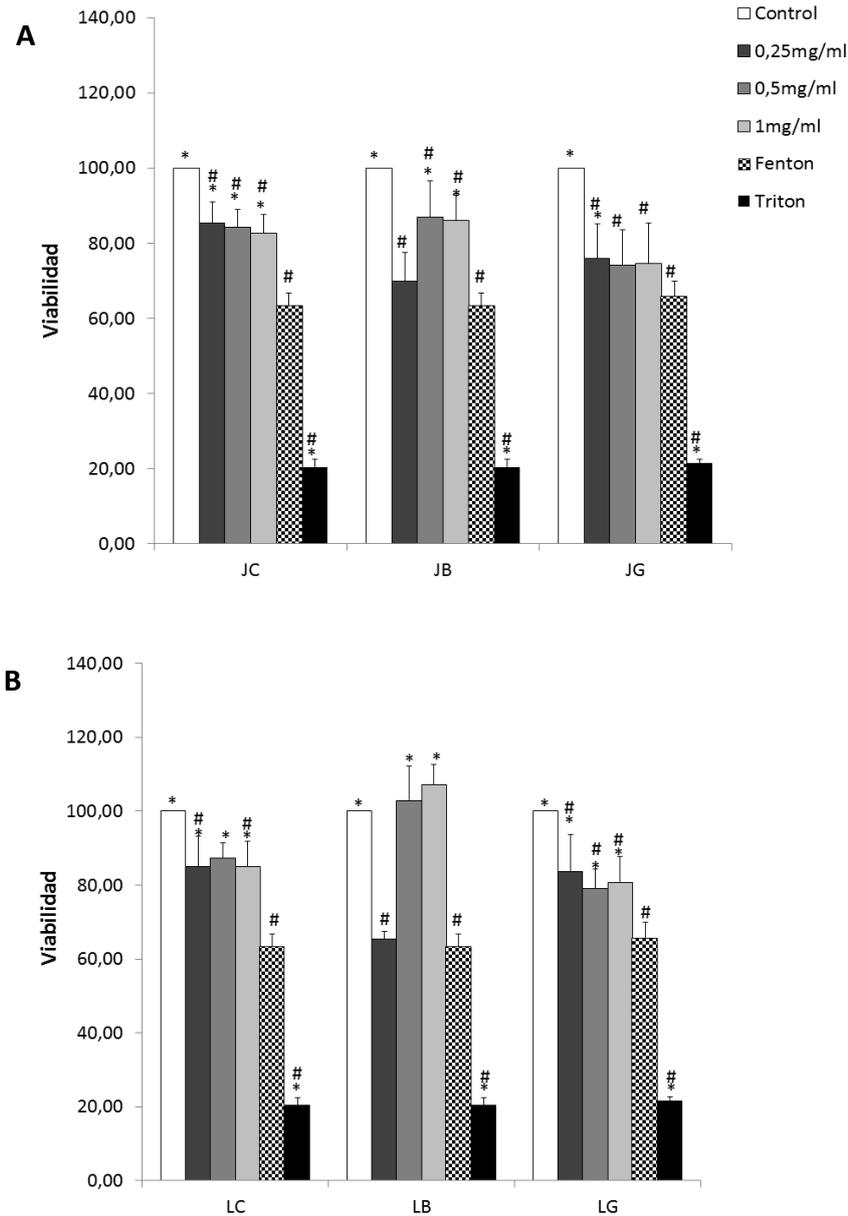


Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular inducida por muestras de A) judías (*Phaseolus vulgaris* L.) y B) lentejas (*Lens culinaris* Medik.), crudas y procesadas (0,25; 0,5; 1 mg/ml). El porcentaje de viabilidad celular se expresa como porcentaje del control, siendo este el 100% de la actividad (células sin tratar). Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs reactivo de Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs control.

El estudio de comparación de medias (Fig. 16) corroboró estos resultados. Se observa como la germinación disminuye el efecto protector frente al daño oxidativo en ambas leguminosas, mientras que la cocción afecta de forma diferente. En el caso de las lentejas las muestras procedentes de la cocción ejercen un mayor efecto protector que

las procedentes de judías cocidas. Las diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones, procesados y tipo de leguminosa se muestran en la Tabla 13.

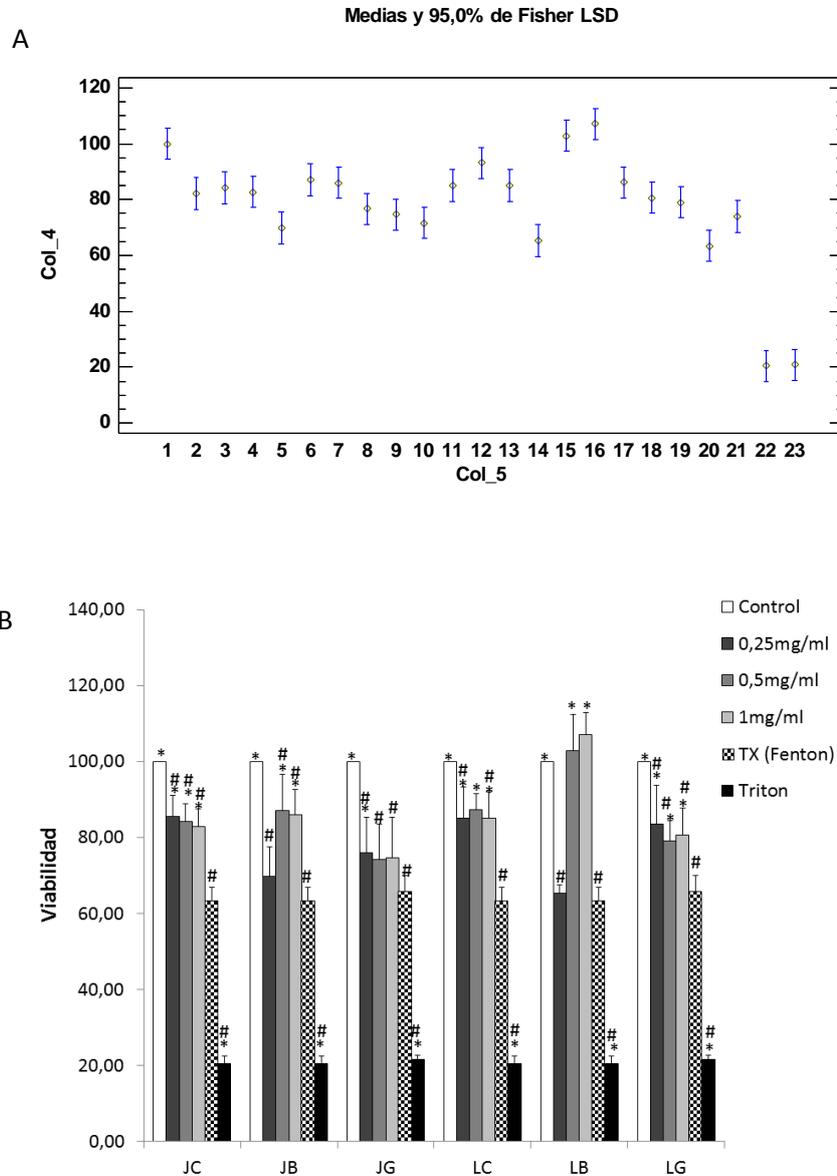


Figura 16. Porcentajes de viabilidad celular en un modelo de toxicidad celular inducido por el reactivo de Fenton, de muestras de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* L. y *Lens culinaris* Medik, crudas y procesadas), a las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 mg/ml. A) Medias aritméticas de cada una de las muestras, así como el intervalo de confianza de cada una de ellas según el test de rango múltiple de Fisher (95%). Siendo Col. 6 la variable dependiente (1: medio 1%; 2: JC 0,25mg/ml; 3: JC 0,5mg/ml; 4: JC 1mg/ml; 5: JB 0,25mg/ml; 6: JB 0,5mg/ml; 7: JB 1mg/ml; 8: JG 0,25mg/ml; 9: JG 0,5mg/ml; 10: JG 1mg/ml; 11: LC 0,25mg/ml; 12: LC 0,5mg/ml; 13: LC 1mg/ml; 14: LB 0,25mg/ml; 15: LB 0,5mg/ml; 16: LB 1 mg/ml; 17: LG 0,25mg/ml; 18 : LG 0,5 mg/ml; 19: LG 1 mg/ml; 20: Fenton 1; 21: Fenton 2; 22: tritón 1; 23: tritón 2. Y Col. 5, la variable independiente: 1-23. B) Viabilidad celular (%) respecto al control (células sin tratar) de cada una de las muestras a las concentraciones estudiadas. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs Fenton (TX).

Tabla 13. % de viabilidad celular frente al daño oxidativo inducido por el reactivo de Fenton previo tratamiento con diferentes concentraciones (mg/ml \pm SD) de extractos de judías (*Phaseolus vulgaris* L.) y lentejas (*Lens culinaris* Medik.), crudas y procesadas (n=12). p< 0,05: **a**, entre concentraciones; **b**, crudas vs procesadas; **c**, judías vs lentejas.

mg/ml	JC	JB	JG	LC	LB	LG
0,25	85,41 \pm 5,6 ^b	69,83 \pm 7,7 ^c	75,94 \pm 9,30 ^b	85,03 \pm 8,24 ^b	65,36 \pm 107,14 ^{a,b,c}	83,54 \pm 10,1 ^{a,b}
0,5	84,24 \pm 4,7	87,06 \pm 9,6 ^c	74,24 \pm 9,30 ^c	87,22 \pm 4,3	102,78 \pm 9,5 ^{a,b,c}	79,14 \pm 5,3 ^{a,b,c}
1	82,75 \pm 4,8	86,00 \pm 6,72 ^{b,c}	74,58 \pm 10,80 ^{b,c}	85,02 \pm 6,85 ^b	107,14 \pm 5,6 ^{a,b,c}	80,73 \pm 7,1 ^{a,b,c}

1.6. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS CRUDAS Y PROCESADAS EN LA GENERACIÓN INTRACELULAR DE ROS

Además de evaluar el efecto de las muestras de leguminosas y la influencia del procesado sobre la viabilidad celular de astrocitos en cultivo, la determinación de su capacidad para limitar la generación de radicales libres puede contribuir al conocimiento de su capacidad neuroprotectora. Para ello, las células se tratan con el reactivo de Fenton, midiendo la cinética de generación durante dos horas (Fig. 17 A y B).

Como se puede apreciar en la figura 17, en todos los casos, se observó que el tratamiento con los extractos de judías y lentejas crudas y procesadas, minimizó significativamente la producción de ROS generada por el reactivo de Fenton en astrocitos cultivados.

En cuanto a las diferencias entre procesados, no se observaron diferencias significativas entre las muestras de judías crudas y cocidas pero si un menor efecto en el caso de las correspondientes a judías germinadas. En el caso de las muestras de lentejas, se apreció un efecto concentración dependiente y, como en el caso anterior, las muestras de semillas germinadas ofrecieron un efecto significativamente superior en la producción de ROS, que las muestras crudas y cocidas.

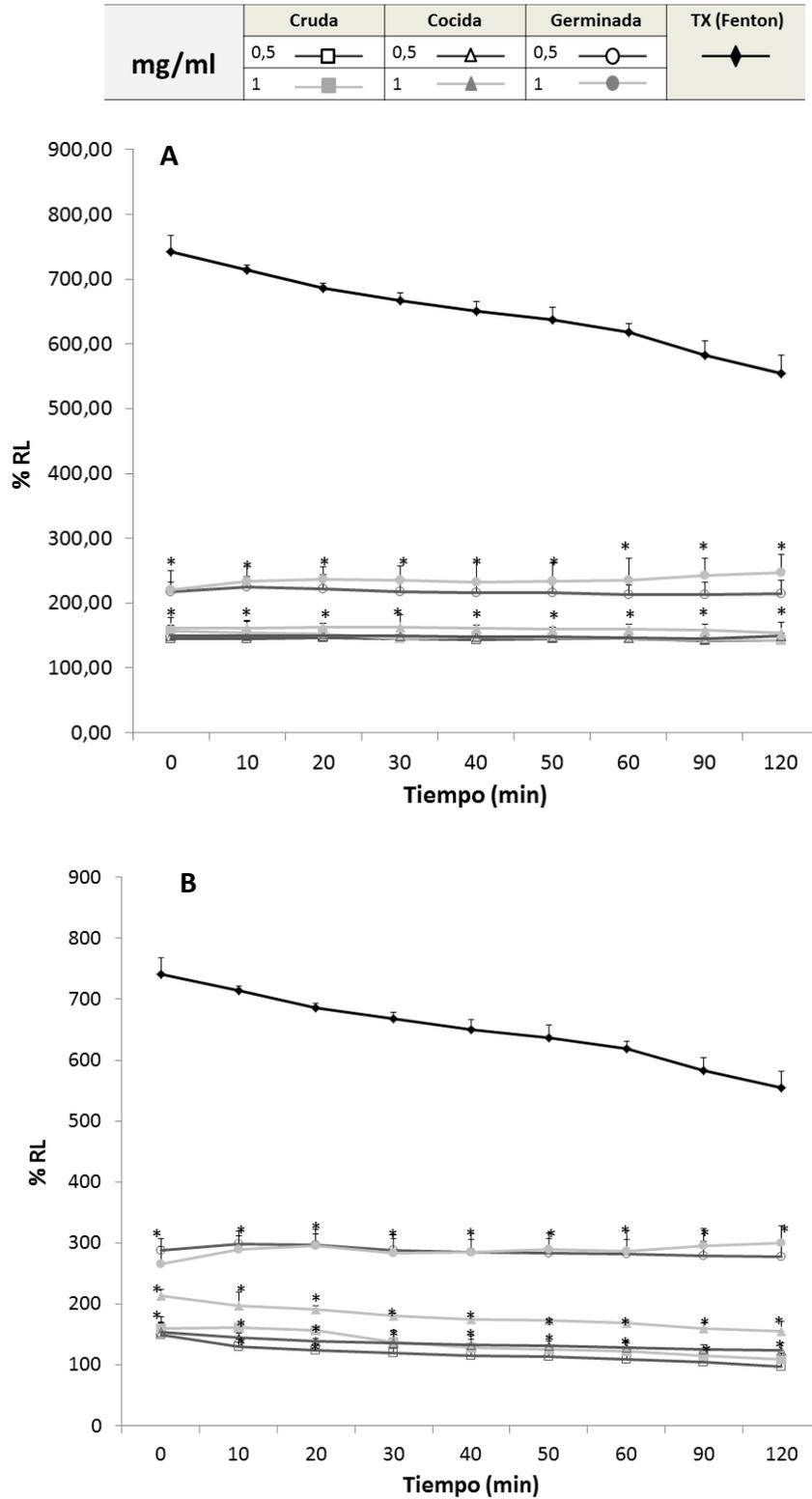


Figura 17. Cinética de liberación de radicales libres en un modelo de toxicidad celular inducida por el reactivo de Fenton (0,5 mM $\text{SO}_4\text{Fe}/1\text{mM H}_2\text{O}_2$) con muestras de semillas de: A) *Phaseolus vulgaris* L y B) *Lens culinaris* Medik. Se representa el porcentaje de producción de radicales libres vs tiempo (min) respecto al grupo de células control (células sin tratar). Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=9). *p<0,05 vs reactivo de Fenton (TX).

2. ANTOCIANIDINAS

2.1. EVALUACION DEL EFECTO INDUCIDO POR LAS ANTOCIANIDINAS SOBRE LA MORFOLOGÍA DE ASTROCITOS

En condiciones normales, los astrocitos cultivados constan de un cuerpo celular que contiene un núcleo más o menos grande, situado en el cuerpo central de la célula y de unas prolongaciones citoplasmáticas diversamente ramificadas (Fig. 18; Fig. 19 A).

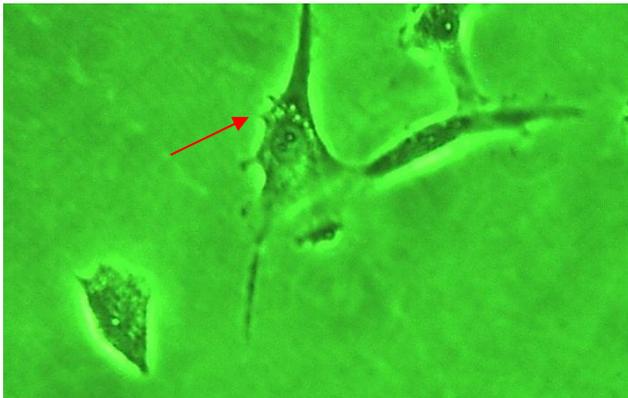


Figura 18. Imagen de un astrocito (U373), tomada con cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases (10x + 12x). La flecha roja indica la presencia de gránulos de glucógeno (A. López Cid).

El tratamiento con un análogo de la vitamina E (trolox, 0,5 mM), utilizado como control positivo (Fig. 19), o con diferentes concentraciones de antocianos (Fig. 20), no parece inducir afectación morfológica en esta línea celular.

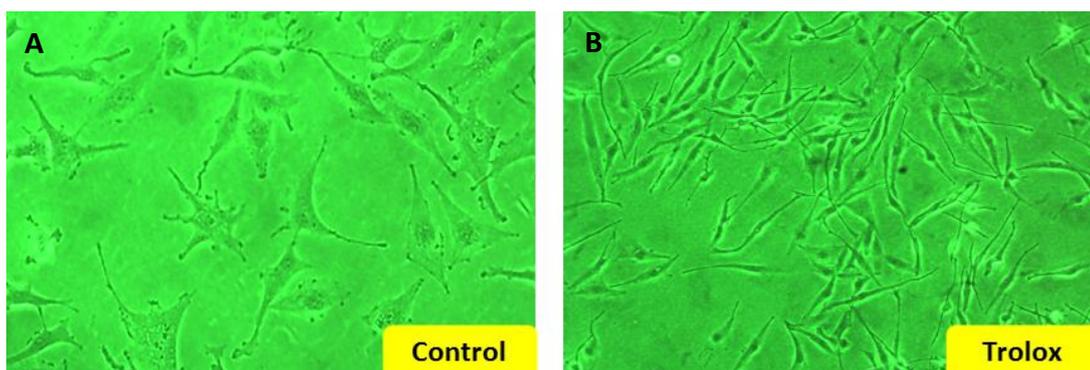


Figura 19. Astrocitos en cultivo: A, en medio DMEM-m (control); y B tras el tratamiento con trolox 0,5 mM.

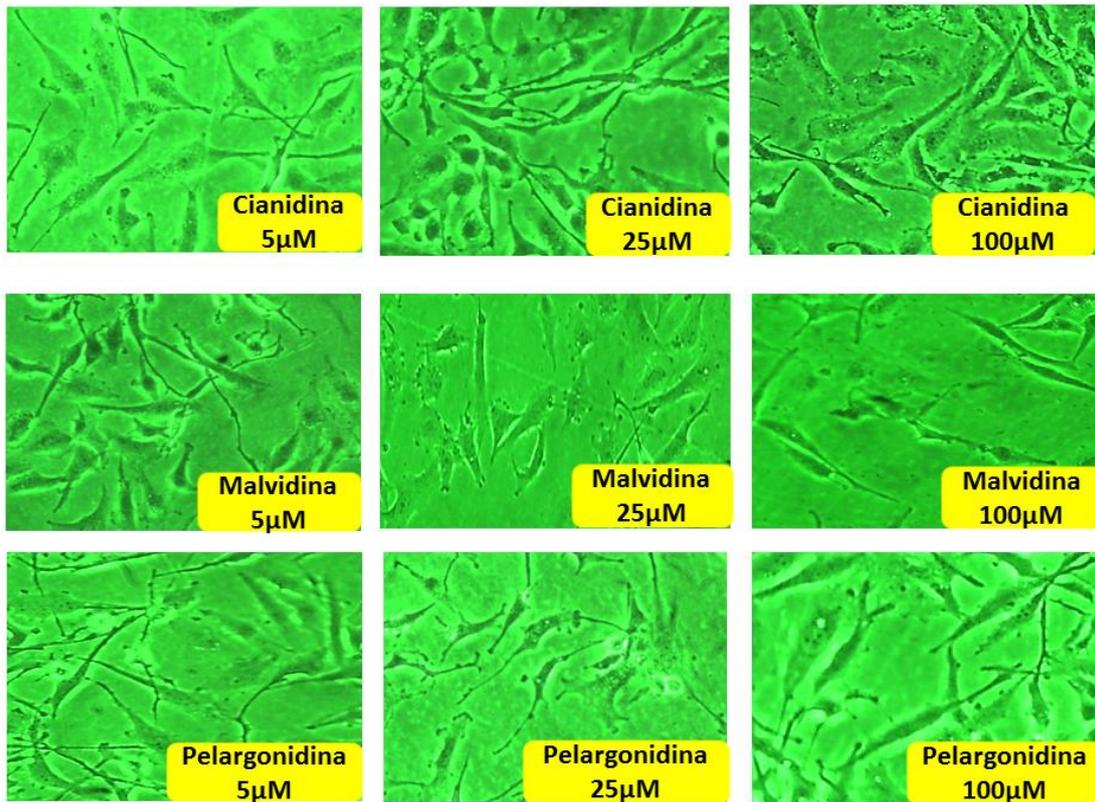


Figura 20. Imágenes de astrocitos en cultivo (Línea U373 MG) en medio DMEM-m, tomadas con cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases (10x + 12x), tras el tratamiento durante 24 h con diferentes concentraciones de antocianidinas (A. López Cid).

En un modelo de toxicidad inducido con reactivo de Fenton, se observa una afectación morfológica negativa, con pérdida significativa de las prolongaciones citoplasmáticas, llegando a causar la destrucción de los mismos (Fig. 21).

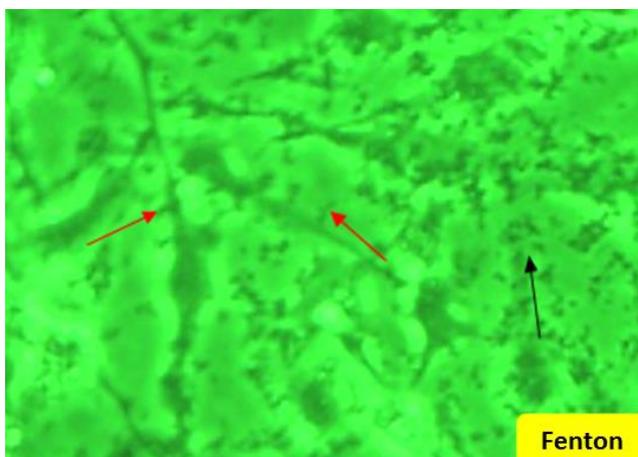


Figura 21. Astrocitos tratados con reactivo de Fenton (45 min). Flechas rojas indican pérdida de prolongaciones citoplasmáticas. Flecha negra indica destrucción del astrocito (A. López Cid).

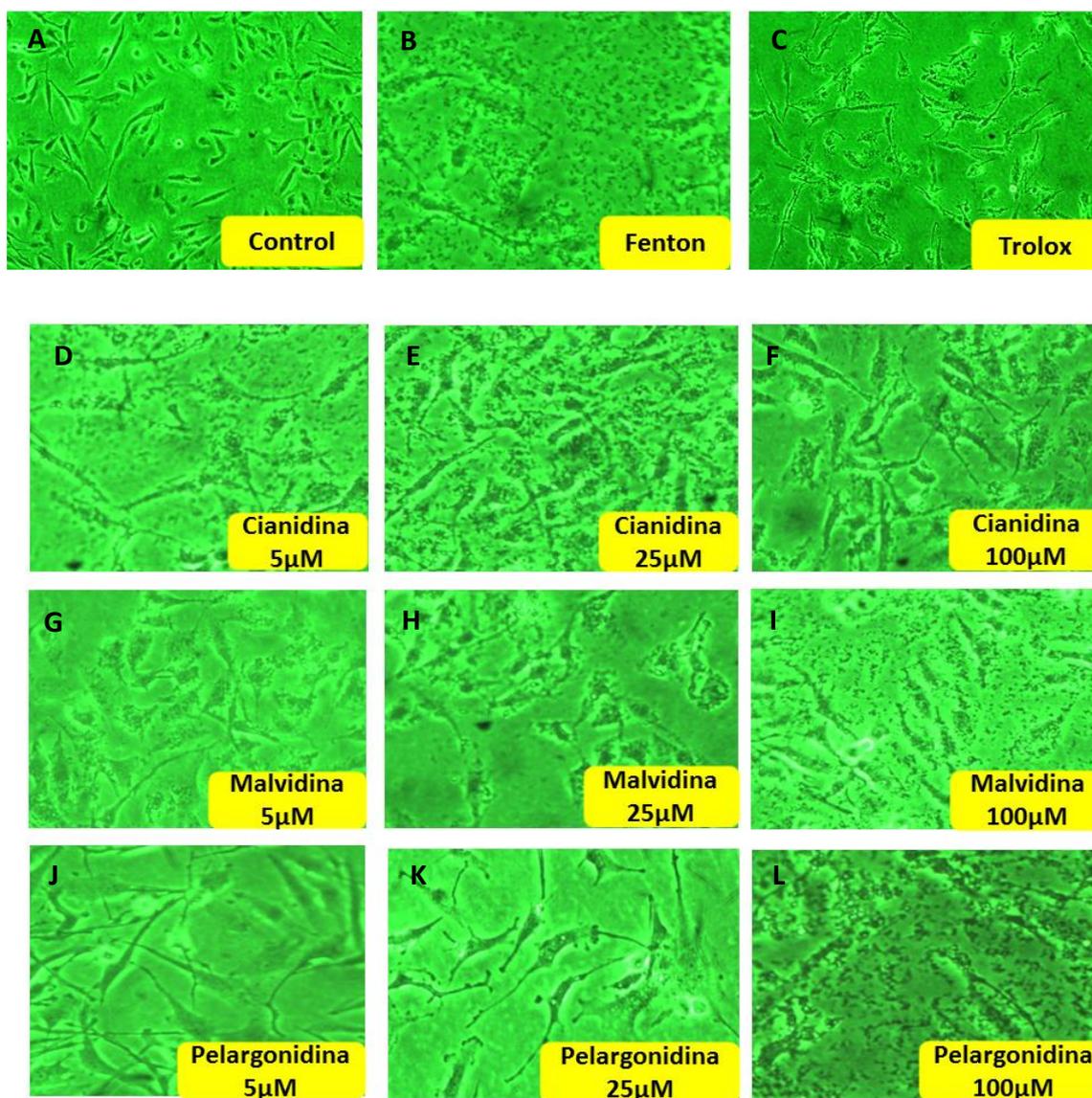


Figura 22. Imágenes de cultivos de astrocitos: A) en medio DMEM-m (sin tratamiento); B) tratados con reactivo de Fenton en PBS (45 min); C) tratados con trolox (0,5 mM); D), E) y F) tratados previamente al reactivo de Fenton con cianidina 5; 25 y 100 μM ; G), H) e I) tratados previamente con malvidina 5; 25 y 100 μM ; J), K) y L) tratados previamente con pelargonidina 5; 25 y 100 μM (A. López Cid).

El tratamiento previo al reactivo de Fenton, durante 24 h, con diferentes concentraciones de antocianidinas, previene el daño morfológico oxidativo no observándose afectación completa en su estructura morfológica, si bien, aunque se mantienen sus prolongaciones citoplasmáticas, en algunos casos se aprecia un incremento de las granulaciones intracelulares, como por ejemplo con cianidina 100 μM (Fig. 22 F). En este caso, a medida que disminuye la concentración de cianidina, también disminuye su capacidad protectora, observándose como con 50 μM existe una mayor destrucción de las prolongaciones citoplasmáticas, aunque se mantienen los cuerpos celulares (Fig. 22 E). Con la concentración menor (5 μM) se puede observar

una destrucción de la mayoría de los astrocitos (Fig. 22 D), si bien el efecto no es equivalente al tratamiento con el reactivo de Fenton (Fig. 22 B).

En el caso de malvidina, el tratamiento con la concentración más elevada (100 μM) (Fig. 22 I), induce un efecto negativo en la morfología celular, observándose pérdida de prolongaciones citoplasmáticas y daño en el cuerpo celular. Dosis inferiores (25 μM) originan un daño morfológico mucho menor tanto en las prolongaciones citoplasmáticas como en el cuerpo celular (Fig. 22 H), e incluso a la concentración más baja (5 μM) (Fig. 22 G), la morfología de los astrocitos se mantiene prácticamente íntegra.

La antocianidina pelargonidina también ejerce un efecto protector de la morfología celular, dependiente de la concentración, frente al daño oxidativo inducido por el reactivo de Fenton. Según se puede observar en la Figura 22, la aplicación de este compuesto, a las concentraciones de 5 y 25 μM (Fig. 22 J y K respectivamente) previene el daño morfológico, consiguiendo mantener íntegras las prolongaciones citoplasmáticas y no observándose ningún incremento en las granulaciones intracitoplasmáticas. La concentración más elevada (100 μM) (Fig. 22 L) no consigue revertir la pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas, ni la acumulación de granulaciones, observándose la pérdida de algunos cuerpos celulares.

2.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CAPTADORA DEL RADICAL DIFENIL-PICRIL HIDRACILO (DPPH).

La medida de la actividad captadora del radical DPPH como aproximación para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos antociánicos queda reflejada en la Tabla 14 y Figura 23.

Tabla 14. Valores de CI_{50} de antocianidinas y trolox. Los resultados se expresan como la media \pm SD de tres experimentos independientes ($n=9$). Las letras indican diferencias significativas entre antocianidinas y trolox: ^a $p < 0,05$ vs antocianidinas; ^b $p < 0,05$ vs trolox.

Compuesto	CI_{50} (μM) \pm SD
Cianidina	5,29 \pm 2,14 ^{a,b}
Malvidina	46,26 \pm 1,04 ^{a,b}
Pelargonidina	27,91 \pm 2,69 ^{a,b}
Trolox	37,59 \pm 1

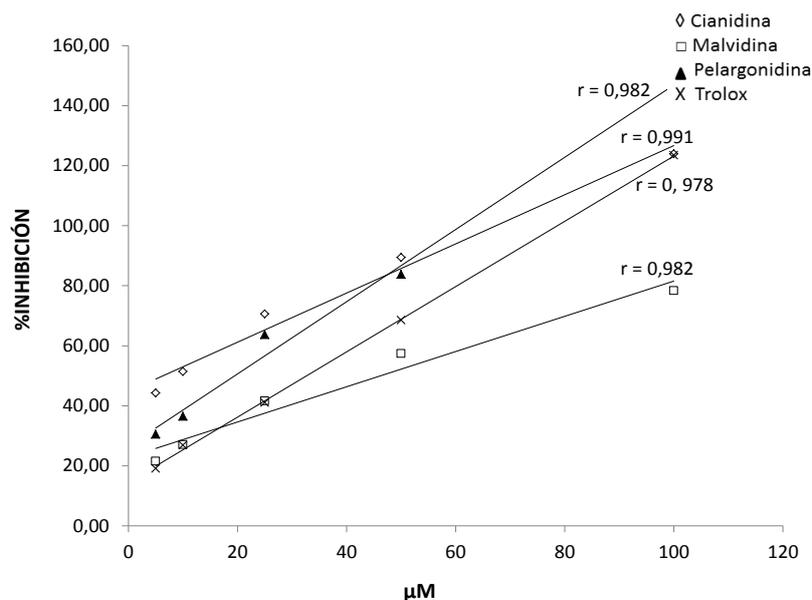


Figura 23. Capacidad captadora del radical DPPH representada como porcentaje de inhibición frente a distintas concentraciones de antocianidinas. Los resultados se expresan como la media \pm SD de tres experimentos independientes (n= 9). \diamond Cianidina: $y = 0,819x + 44,763$ ($r = 0,991$); \square Malvidina: $y = 0,5866x + 22,86$ ($r = 0,9823$); \blacktriangle Pelargonidina: $y = 1,2027x + 26,57$ ($r = 0,9816$); \times Trolox $y = 1,098x + 13,621$ ($r = 0,978$).

Se observaron diferencias significativas entre las antocianidinas, siendo cianidina la que presenta mayor actividad captadora del radical DDPH, incluso significativamente mayor que trolox. Le sigue en actividad pelargonidina, también significativamente superior a la de trolox. Por último, malvidina es la que posee menor actividad siendo en este caso significativamente inferior a trolox.

2.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN PRESENCIA O AUSENCIA DE DAÑO OXIDATIVO

Para determinar el efecto de diferentes concentraciones de antocianidinas sobre la viabilidad celular de astrocitos se procedió con la técnica del MTT.

Los resultados (Fig. 24) no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control (células sin tratar) excepto en el caso de la cianidina. Este compuesto ejerce un efecto protector significativo sobre las células a la concentración de 100 μ M.

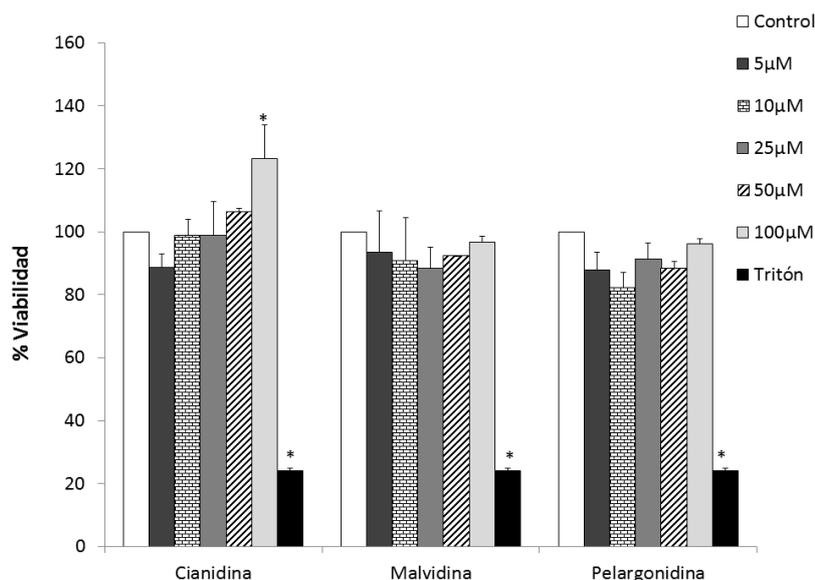


Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones (5; 10; 25; 50 y 100 μM) de antocianidinas (cianidina, malvidina y pelargonidina) sobre la viabilidad celular (MTT). Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes ($n=9$), considerando 100 % de viabilidad al valor obtenido para las células sin tratar. * $p < 0,05$ vs Control.

Cuando los astrocitos fueron sometidos a daño oxidativo con el reactivo de Fenton, se observó una disminución significativa de la viabilidad celular respecto a las células sin tratar (Fig. 25). El tratamiento previo durante 24 h con las antocianidinas, revirtió parcialmente ese daño. Cianidina, a todas las concentraciones ensayadas, redujo el daño celular, no observándose diferencias significativas respecto al control. La concentración más eficaz para este compuesto fue la de 100 μM . Pelargonidina resultó menos eficaz, no consiguiendo recuperar el nivel de viabilidad de las células sin tratar. En las células tratadas con malvidina no se observaron diferencias significativas entre concentraciones (5 y 50 μM , 25 y 100 μM), excepto en el caso de 10 μM , que resultó significativamente más eficaz que las dos superiores (50 y 100 μM).

De los tres compuestos estudiados, malvidina, a las concentraciones de 10 y 25 μM no solo consiguió prevenir la viabilidad celular frente al daño oxidativo sino que incluso aumentó significativamente la viabilidad de las células en comparación con el control y con el resto de tratamientos.

La cianidina 100 μM protege significativamente más que las demás concentraciones de cianidina ensayadas. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de pelargonidina.

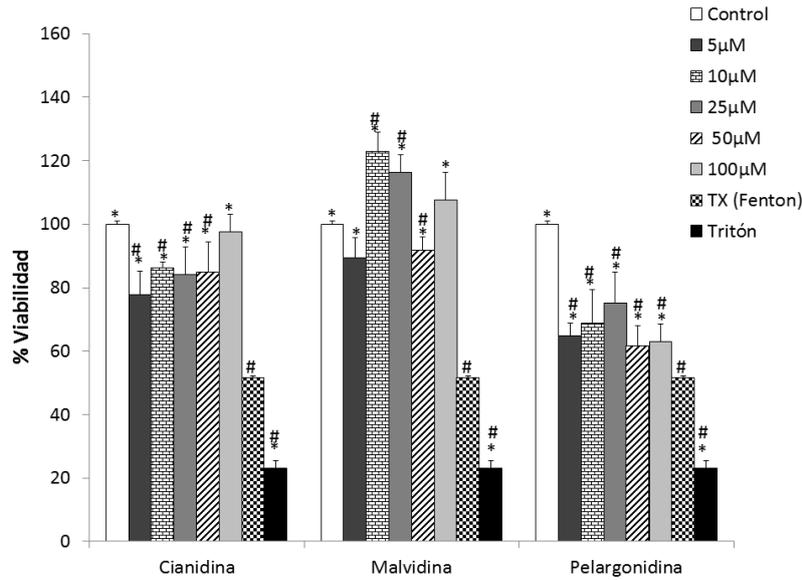


Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones (5; 10; 25; 50 y 100 μM) de antocianidinas (cianidina, malvidina y pelargonidina) sobre la viabilidad celular (MTT) frente al daño oxidativo inducido por el reactivo de Fenton. Los resultados se expresan como media de los porcentajes \pm SD de tres experimentos independientes ($n=9$), considerando como 100% de viabilidad la obtenida en el caso de las células sin tratar (Control). * $p < 0,05$ vs Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs Control.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

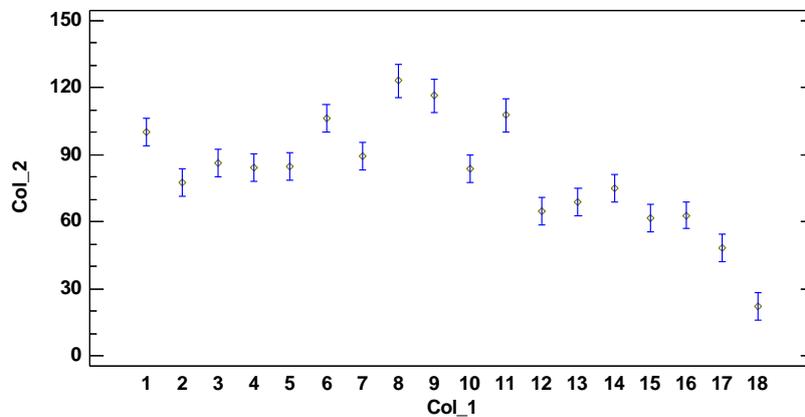


Figura 26. Comparación de medias aritméticas e intervalos de confianza (test de rango múltiple de Fisher 95%) de viabilidad celular en un modelo de toxicidad inducido por el reactivo de Fenton (TX), previa incubación de las células durante 24 h con diferentes concentraciones (5-100 μM) de cianidina, malvidina y pelargonidina. Col. 2 la variable dependiente; Col. 1 (1: control; cianidina 100 μM (2); 50 μM (3); 25 μM (4); 10 μM (5); 5 μM (6); malvidina 100 μM (7); 50 μM (8); 25 μM (9); 10 μM (10) y 5 μM (11); pelargonidina 100 μM (12); 50 μM (13); 25 μM (14); 10 μM (15) y 5 μM (16); 17: tritón; 18: Fenton.

2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE ASTROCITOS CON ANTOCIANIDINAS SOBRE LA GENERACIÓN INTRACELULAR DE ROS

Tal como se puede apreciar en la Figura 27, el reactivo de Fenton induce la generación de ROS en astrocitos. El tratamiento previo durante 24 h con diferentes concentraciones (5; 25 y 100 μM) de cianidina, malvidina y pelargonidina, reduce significativamente la cinética de liberación de ROS provocada por el reactivo oxidante. Este efecto inhibitor parece ser concentración dependiente, pues las concentraciones más bajas (5 μM) de cada uno de los tres compuestos ensayados producen un efecto menor que las concentraciones más elevadas. De las tres antocianidinas, cianidina 100 μM resultó ser significativamente la más eficaz, no apreciándose diferencias significativas a las concentraciones de 25 y 100 μM para los otros dos compuestos estudiados.

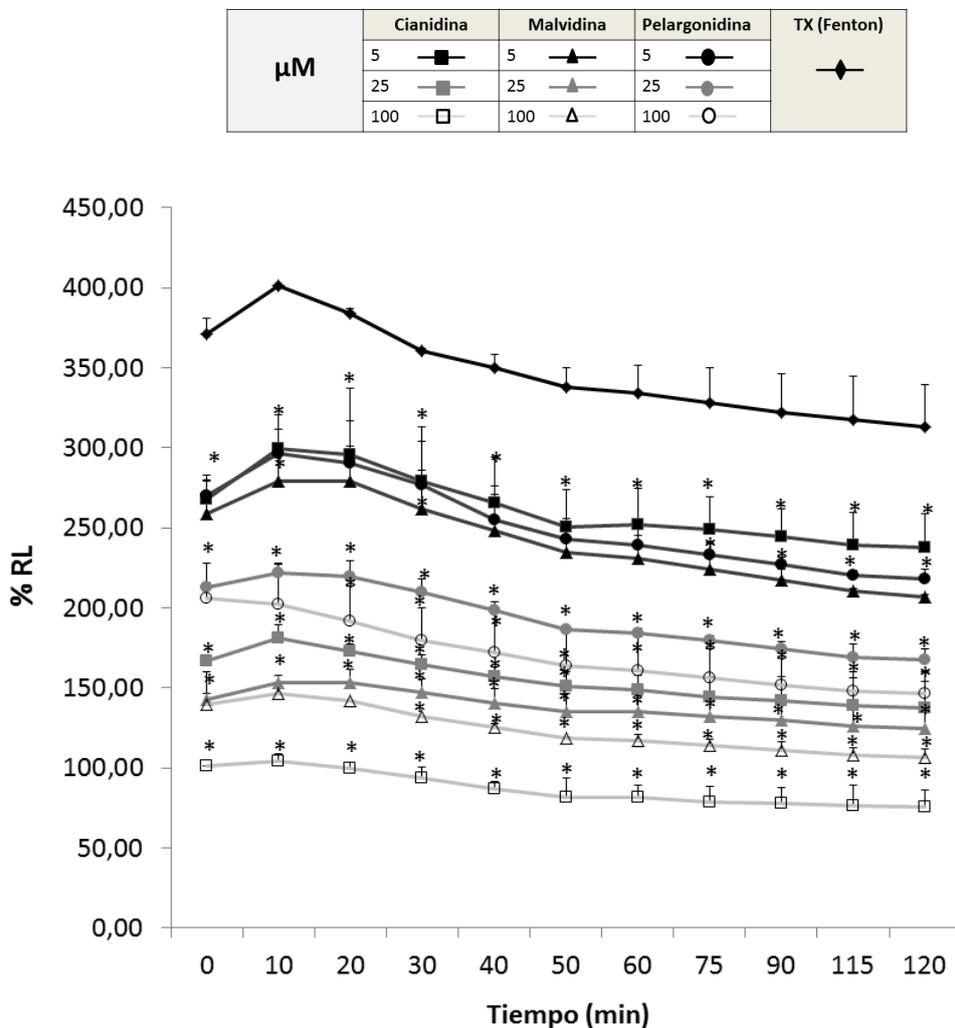


Figura 27. Cinética de liberación de ROS (120 min) en un modelo de toxicidad celular inducida por el reactivo de Fenton (0,5 mM $\text{SO}_4\text{Fe}/1\text{mM H}_2\text{O}_2$). Los resultados se expresan como media de los porcentajes de liberación de ROS frente al tiempo (min) respecto a la liberación del grupo control (células sin tratar) \pm SD de tres experimentos independientes (n= 9). *p<0,05 vs reactivo de Fenton (TX).

2.5. EFECTO DE LAS ANTOCIANIDINAS SOBRE LOS MARCADORES DE CITOTOXICIDAD CELULAR

Como marcador de citotoxicidad se ha utilizado en primer lugar la determinación de la actividad enzimática LDH, ya que los productos oxidantes podrían alterar la membrana celular y por tanto, tras la lisis de la misma, liberar al medio extracelular su contenido enzimático.

Por otra parte, cuando se produce una alteración de la membrana celular por oxidación inducida por ROS, los lípidos de ésta se oxidan dando lugar a lipoperóxidos, los cuales generan reacciones en cadena que dan lugar a la destrucción de la membrana. Estos se pueden detectar mediante el ensayo de TBARS (ensayo que detecta no solo el MDA formado en la peroxidación, sino también otros productos de la misma: aquellos que son capaces de reaccionar con el TBA) y mediante la evaluación directa de las concentraciones del propio MDA liberado al medio de cultivo como producto final mayoritario originado en la reacción de peroxidación lipídica.

2.5.1. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Se realizaron dos ensayos, en el primero de ellos se analizó si las antocianidinas en estudio eran capaces de inducir por si mismas la liberación de LDH al medio de cultivo (Fig. 28 A) y en el segundo, se valoró si estos compuestos eran capaces de reducir e incluso evitar la liberación al medio de LDH en presencia de un tóxico oxidante (Fig. 28 B). Los resultados se compararon con trolox como control positivo.

A la vista de los resultados se puede afirmar que todos los compuestos, por si mismos, liberan LDH al medio de cultivo (Fig. 28 A). No obstante, esta liberación fue significativamente inferior a la inducida por el reactivo de Fenton. Respecto a la liberación observada en el control, únicamente se observaron diferencias significativamente superiores para las concentraciones más elevadas (100 μM) de cianidina y pelargonidina y para malvidina 5 μM . En el caso de la concentración 25 μM de cianidina la liberación fue significativamente inferior.

En el modelo de toxicidad celular oxidativa inducida por el reactivo de Fenton, todos los compuestos fueron capaces de disminuir significativamente la liberación de LDH al medio producida por la acción del tóxico (Fig. 28 B). Las concentraciones más eficaces como protectoras de la lisis celular, significativamente menor a la observada en las células sin tratar e incluso con trolox, fueron malvidina 25 y 100 μM y pelargonidina 5 y 25 μM . En ambos casos el efecto fue concentración dependiente, no obstante, en el segundo caso, fue inversamente proporcional, siendo más eficaz la concentración inferior (5 μM).

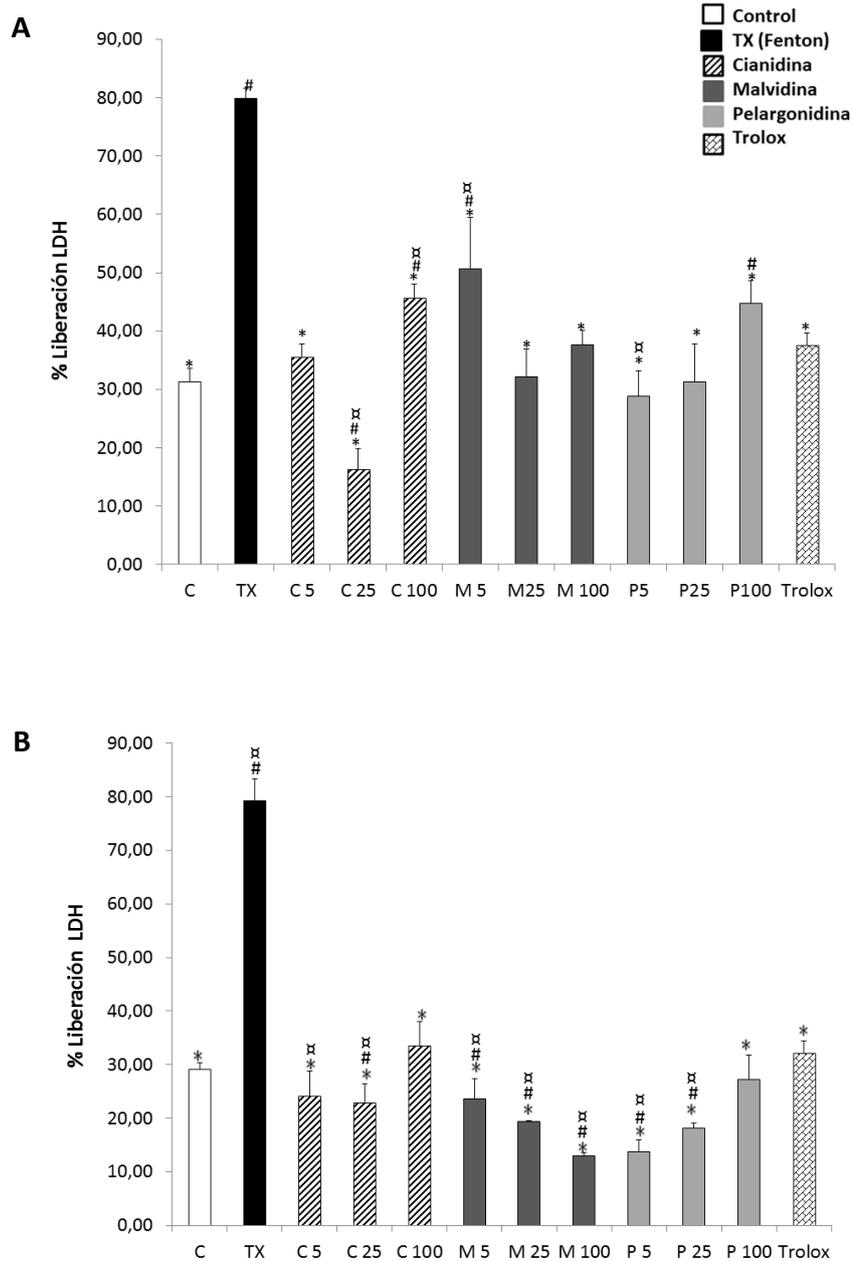


Figura 28. Efecto de diferentes concentraciones (5; 25 y 100 μM) de antocianidinas (cianidina, malvidina y pelargonidina) y trolox (0,5mM) sobre la liberación de LDH en ausencia (A) o presencia (B) de un tóxico oxidante (Fenton). Los resultados se expresan como media de los porcentajes \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs reactivo de Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs células sin tratar (C); $\#p < 0,05$ vs Trolox.

2.5.2. Determinación de los efectos sobre la peroxidación lipídica (TBARS)

En primer lugar se determinó si las antocianidinas en estudio y el compuesto de referencia trolox, eran capaces de generar productos de peroxidación (TBARS) *per se* en los cultivos de astrocitos (Fig. 29 A). En un ensayo posterior (Fig. 29 B) se valoró si el tratamiento previo, durante 24 h con estos compuestos, conseguía revertir el daño sobre la peroxidación lipídica inducido por el reactivo de Fenton.

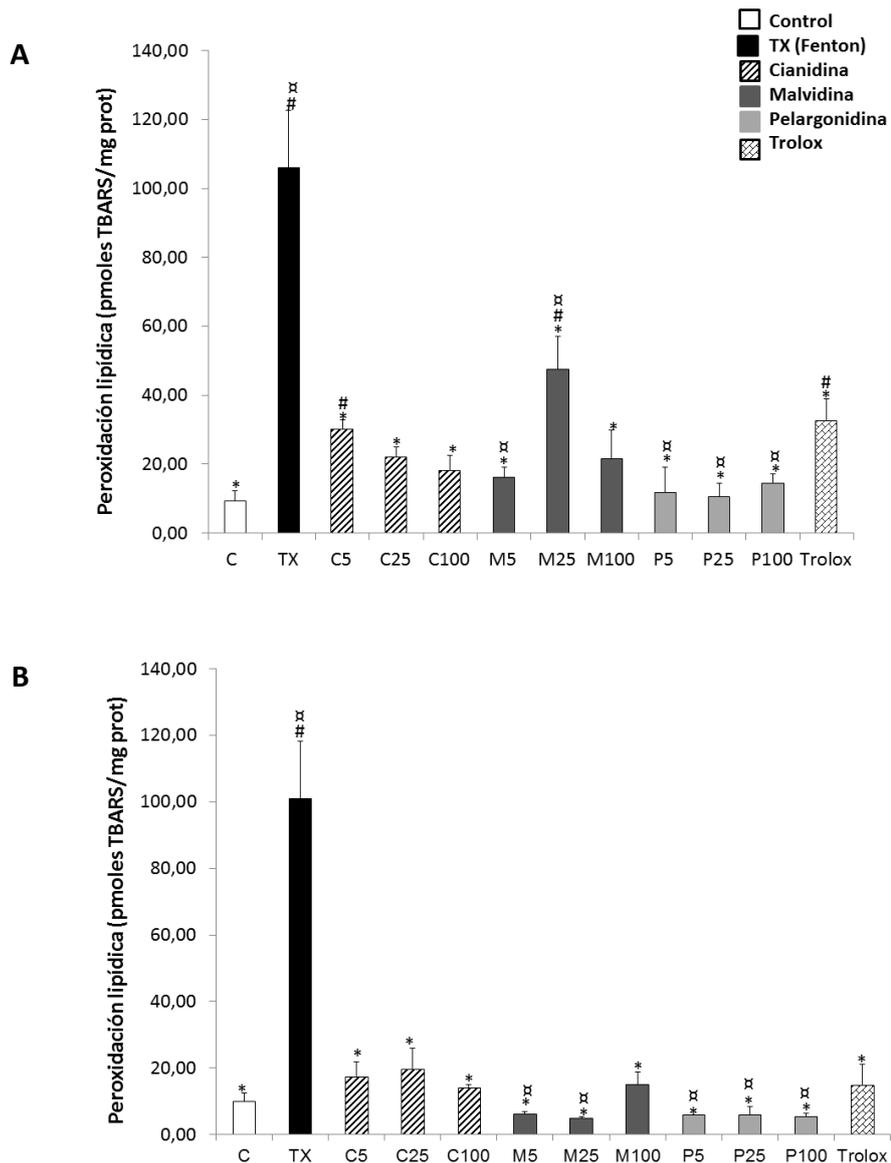


Figura 29. Efecto de diferentes concentraciones (5; 25 y 100 μM) de antocianidinas (cianidina, malvidina y pelargonidina) y trolox (0,5mM) sobre la producción de hidroperóxidos lipídicos (pmoles TBARS/mg de proteína) en ausencia (A) o presencia (B) de Fenton (TX). Los resultados se expresan como media de las concentraciones \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs reactivo de Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs células sin tratar (C); α $p < 0,05$ vs Trolox.

Tanto el reactivo de Fenton (45 min), como algunas concentraciones de antocianidinas (cianidina 5 μM y malvidina 25 μM) y trolox (24 h de tratamiento) incrementaron significativamente la liberación de productos TBARS en células en cultivo respecto al grupo de células sin tratar (Fig. 29 A).

En presencia del tóxico oxidante (45 min), el tratamiento previo (24 h) con antocianidinas y trolox, previno parcialmente la generación de hidroperóxidos lipídicos (Fig. 29 B), no observándose diferencias significativas respecto a las células sin tratar con el tóxico oxidante. El efecto podría ser concentración dependiente en el caso de la malvidina, pues se observaron diferencias significativas entre las concentraciones 5 y 25 μM y la de 100 μM . Trolox no presentó diferencias significativas con el control ni con las células tratadas con cianidina, sin embargo, los resultados indican que tanto las células tratadas con pelargonidina como con malvidina 100 μM podrían reducir la peroxidación lipídica en mayor grado que trolox.

2.5.3. Determinación cromatográfica (HPLC) de las concentraciones de MDA inducidas por el tratamiento con antocianidinas

El MDA es el producto generado mayoritariamente durante el proceso de peroxidación lipídica, por tanto, los resultados obtenidos en este experimento fueron complementarios a los conseguidos en el ensayo de TBARS, descrito en el apartado anterior.

En la Figura 30 se representa la recta de calibrado de MDA (A), así como los cromatogramas (B) de alguna de las concentraciones de la curva.

El tratamiento con el reactivo de Fenton indujo un incremento muy importante en la liberación de MDA. No se observaron diferencias significativas respecto a la liberación basal de las células sin tratar, en el caso de los tratamientos con antocianidinas y trolox (Fig. 31 A), excepto en el caso de la concentración más elevada de malvidina (100 μM).

La evaluación de la prevención de la liberación de MDA inducido por el reactivo oxidante, mediante el tratamiento con antocianidinas o trolox durante 24 h, mostró que aunque en todos los casos se produjo una disminución estadísticamente significativa, tanto trolox como pelargonidina a todas las concentraciones ensayadas y cianidina 5 y 25 μM , no consiguieron revertir totalmente la liberación de MDA, observándose diferencias significativas respecto a las células sin tratar (Fig. 31 B).

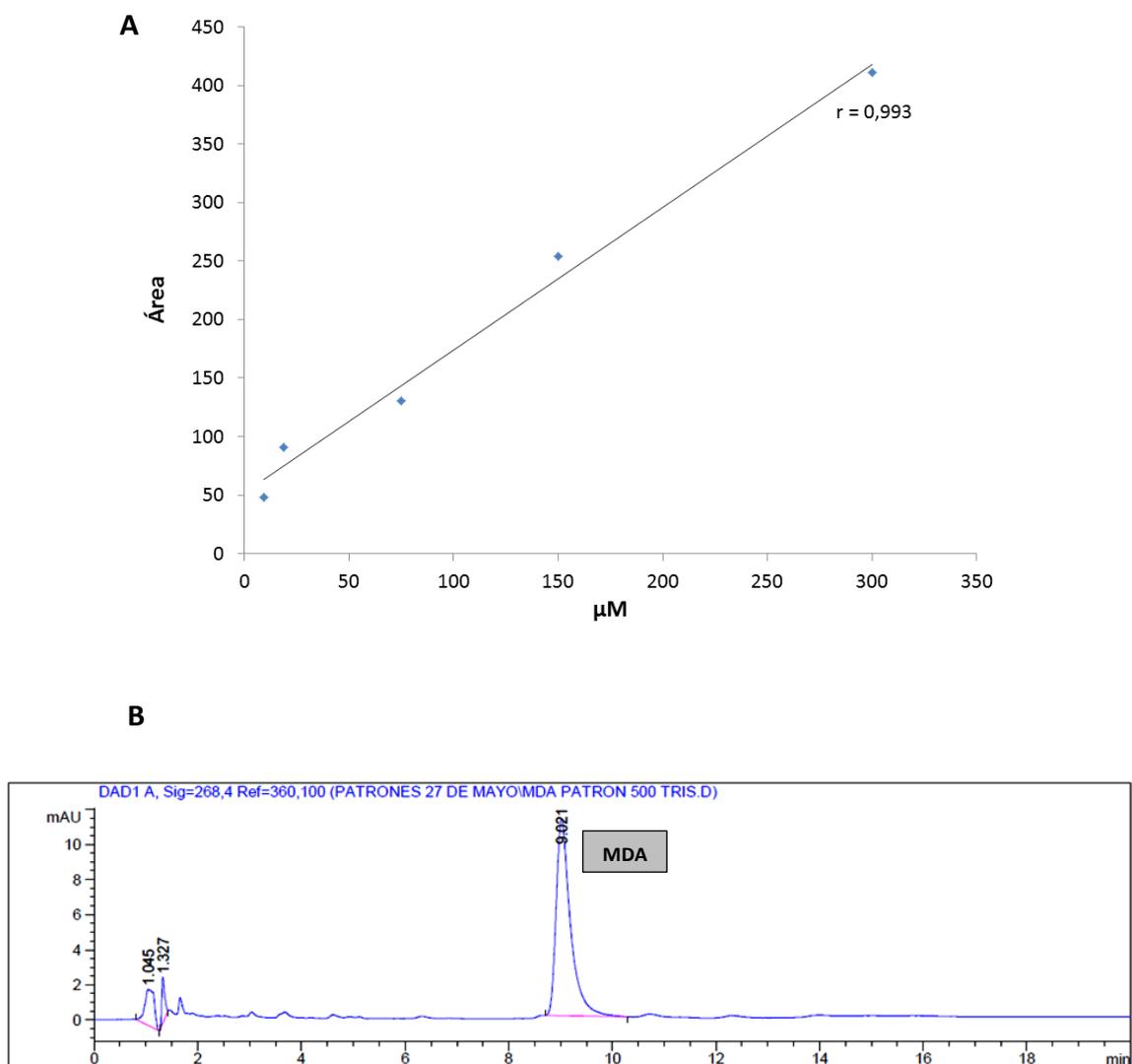


Figura 30. **A)** Recta de calibración del malondialdehído (MDA). La ecuación de la recta de regresión se utilizó para determinar las concentraciones de MDA en los cultivos de astrocitos tratados con las diferentes antocianidinas y con el reactivo de Fenton. **B)** Cromatograma correspondiente a la concentración de 300 μM de MDA.

En la Figura 31 se presentan las concentraciones de MDA liberadas al medio de cultivo por las células sin tratar (liberación basal), por el reactivo de Fenton y el inducido por las antocianidinas o por el compuesto positivo utilizado como referencia, trolox, en ausencia (Fig. 31 A) o presencia (Fig. 31 B) del tóxico oxidante.

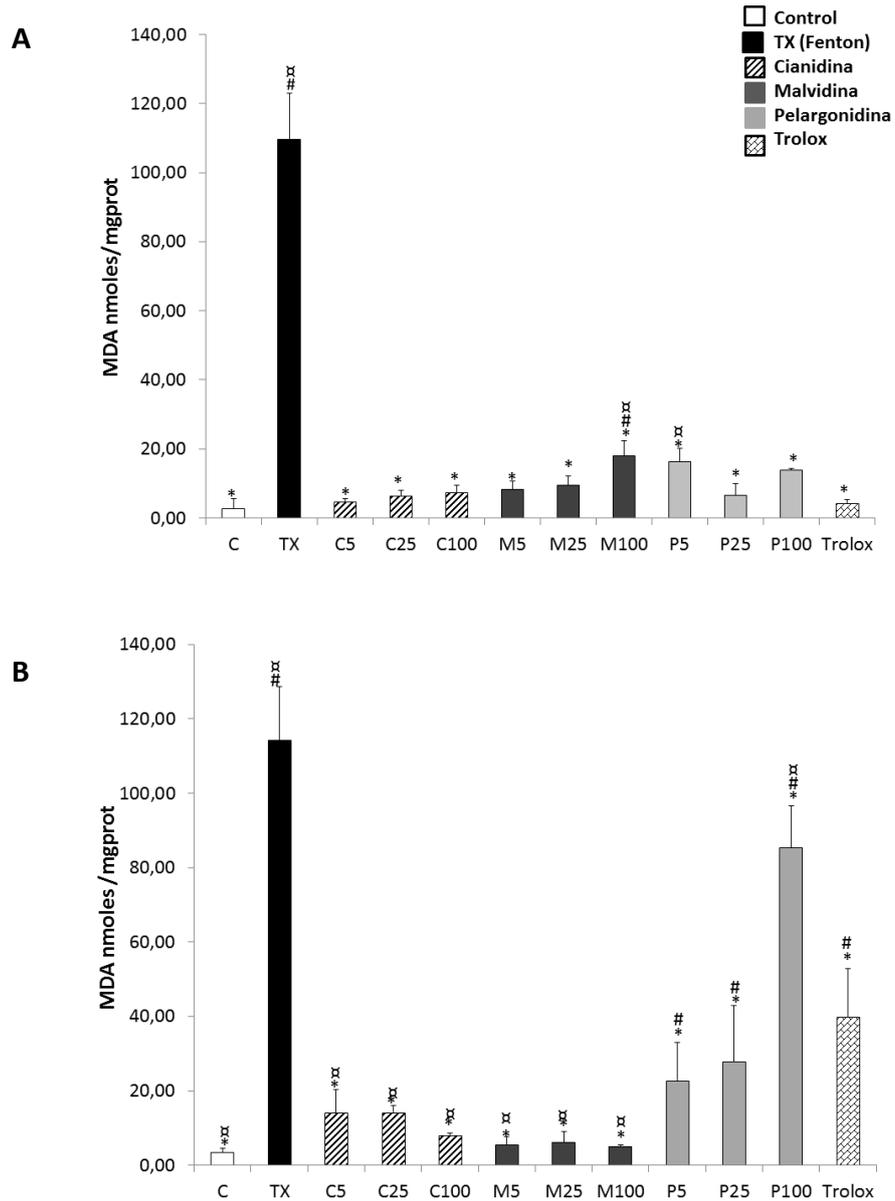


Figura 31. Concentraciones de MDA (nmoles/mg de proteína) liberados a los medios de cultivo de astrocitos en condiciones basales (C), tras tratamiento con el reactivo de Fenton (Tx) o inducidos por tratamiento con antocianidinas (cianidina, malvidina y pelargonidina) o trolox en ausencia (A) o presencia (B) del tóxico oxidante. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs reactivo de Fenton (TX) y # $p < 0,05$ vs células sin tratar (C); α $p < 0,05$ vs Trolox.

A continuación, en la Figura 32 se muestran los cromatogramas de cuantificación de MDA para células tratadas con cianidina en presencia del tóxico oxidante. Se observa un valor mayor de MDA con la menor concentración de cianidina.

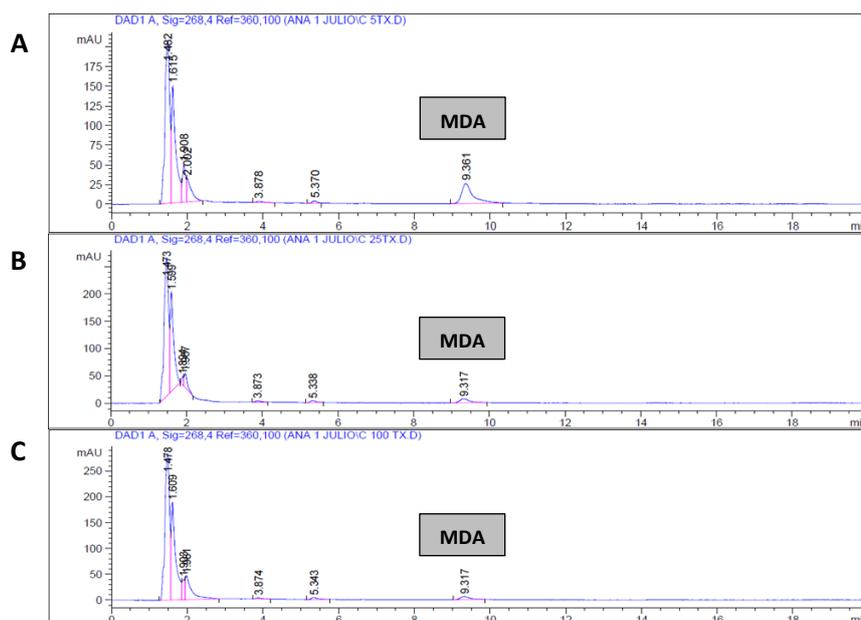


Figura 32. Cromatogramas correspondientes a la cianidina (A, 5 μ M; B, 25 μ M; C, 100 μ M) en presencia del reactivo de Fenton (TX).

2.6. EVALUACION DE LOS EFECTOS DE ANTOCIANIDINAS SOBRE LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

En todos los ensayos se procedió a evaluar el efecto directo de los compuestos sobre las actividades enzimáticas y a continuación, su eficacia para disminuir el efecto negativo provocado en dichas defensas antioxidantes por condiciones de daño oxidativo.

2.6.1. Actividad catalasa (CAT)

Las antocianidinas a las concentraciones estudiadas disminuyen la actividad CAT significativamente en comparación con las células sin tratar (control) (Fig. 33 A) así como el trolox. Las células tratadas con cianidina a todas las concentraciones en estudio, así como pelargonidina 5 y 25 μ M presentaron una actividad significativamente inferior a la del tóxico y el trolox, en cambio las tratadas con malvidina y pelargonidina 100 μ M no presentaron diferencias con el tóxico.

En la figura 33 B se observa la actividad enzimática en presencia del reactivo de Fenton. Cuando los astrocitos fueron sometidos a daño oxidativo, ninguna de las concentraciones de los compuestos en estudio, así como el control positivo (trolox) consiguieron revertir la actividad enzimática. No se observaron diferencias significativas respecto a las células tratadas únicamente con el reactivo de Fenton, siendo la actividad CAT muy inferior a la obtenida para las células control.

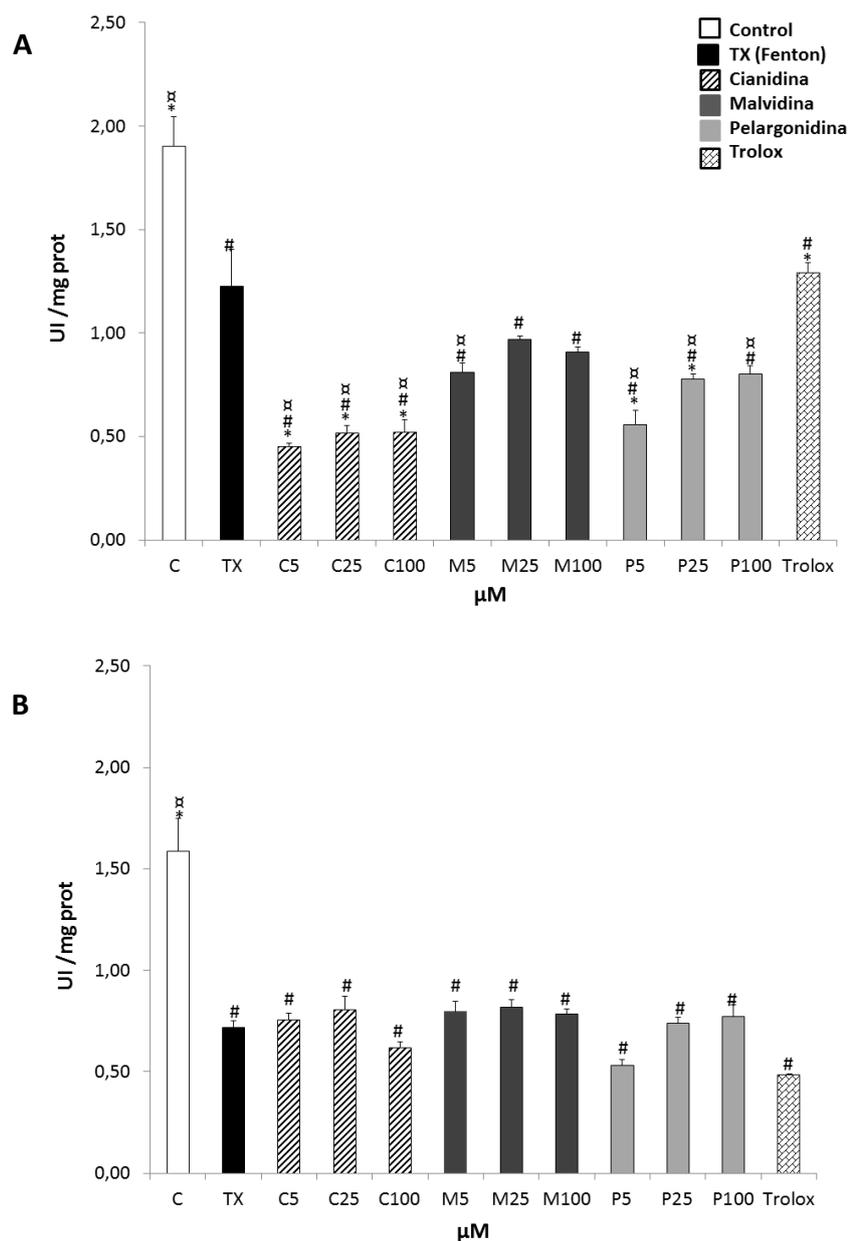


Figura 33. Efectos sobre la actividad catalasa (UI/mg de proteína) en condiciones basales (C), tras tratamiento con el reactivo de Fenton (Tx), trolox (0,5 mM) y diferentes concentraciones de antocianidinas (5; 25 y 100 μ M) en ausencia (A) o presencia (B) del tóxico oxidante. Los resultados se expresan como media \pm ES de tres experimentos independientes (n=12). *p<0,05 vs reactivo de Fenton (TX) y #p<0,05 vs células sin tratar (C); * p<0,05 vs Trolox

2.6.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

Como en el caso anterior, todas las antocianidinas, a las concentraciones estudiadas, disminuyeron la actividad SOD con respecto a las células sin tratar (Fig. 34 A). En el caso de cianidina, se observó que la actividad enzimática decrecía con la concentración. En comparación con el control positivo, todas las muestras mostraron una actividad significativamente inferior.

El tratamiento previo (24 h) de los astrocitos con las antocianidinas, antes de ser sometidos a daño oxidativo, indujo un incremento significativo en la actividad SOD respecto al grupo tratado solo con el tóxico, en todos los casos (Fig. 34 B). No se observaron diferencias significativas respecto a las células sin tratar, excepto en el caso de la concentración más baja de cianidina (5 μM) y las concentraciones de 25 y 100 μM de malvidina y pelargonidina. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de antocianidinas, ni con las células tratadas con trolox.

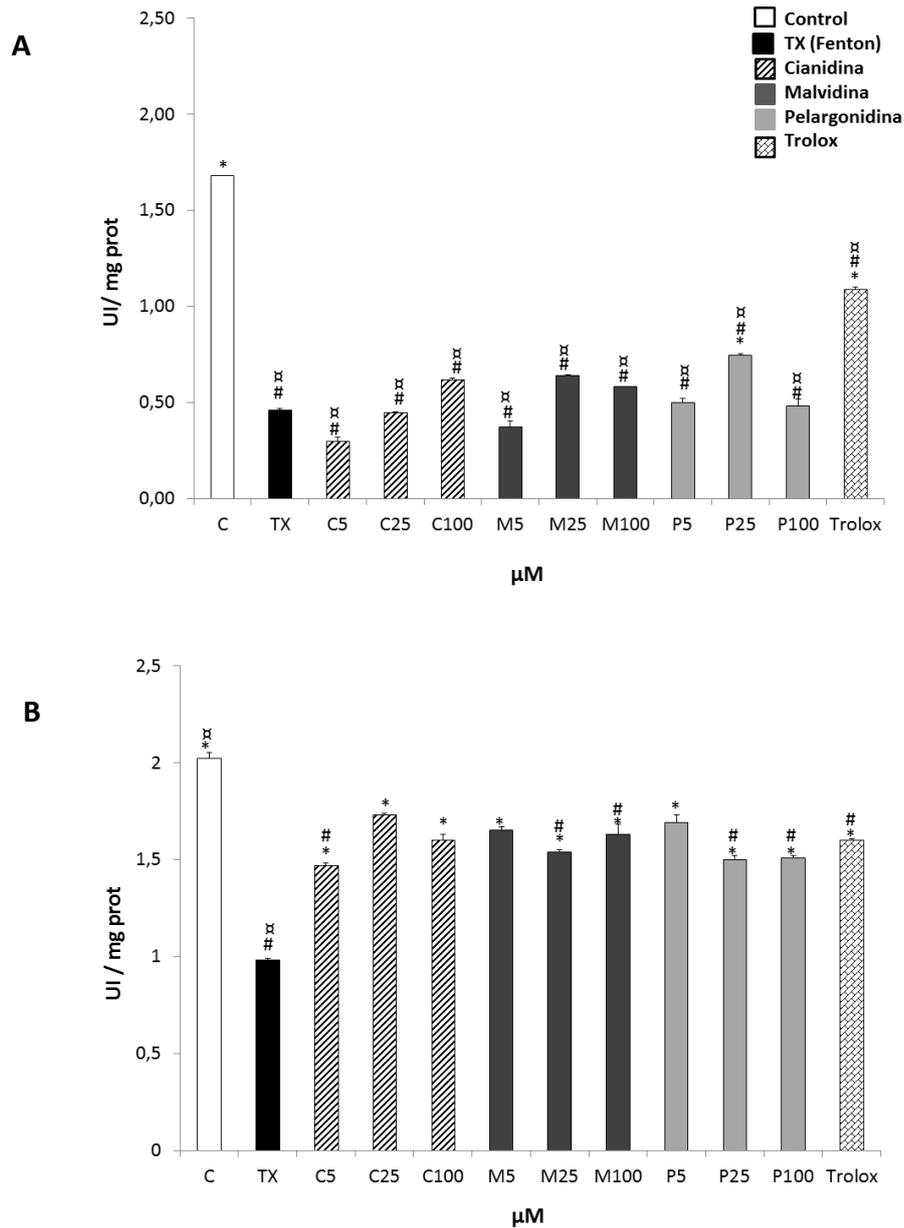


Figura 34. Efecto de las antocianidinas (5; 25 y 100 μM) y trolox (0,5 mM), sobre la actividad enzimática SOD (UI/mg de proteína) en ausencia (A) o presencia (B) de daño oxidativo. Los resultados se expresan como media \pm ES de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs células sin tratar (C); ## $p < 0,05$ vs Trolox.

2.6.3 Actividad glutatión reductasa (GR)

El tratamiento con las antocianidinas a todas las concentraciones y con trolox (0,5mM), no mostró diferencias significativas en la actividad GR respecto al grupo de células sin tratar, salvo pelargonidina a la menor concentración ensayada (5 μ M) (Fig. 35 A).

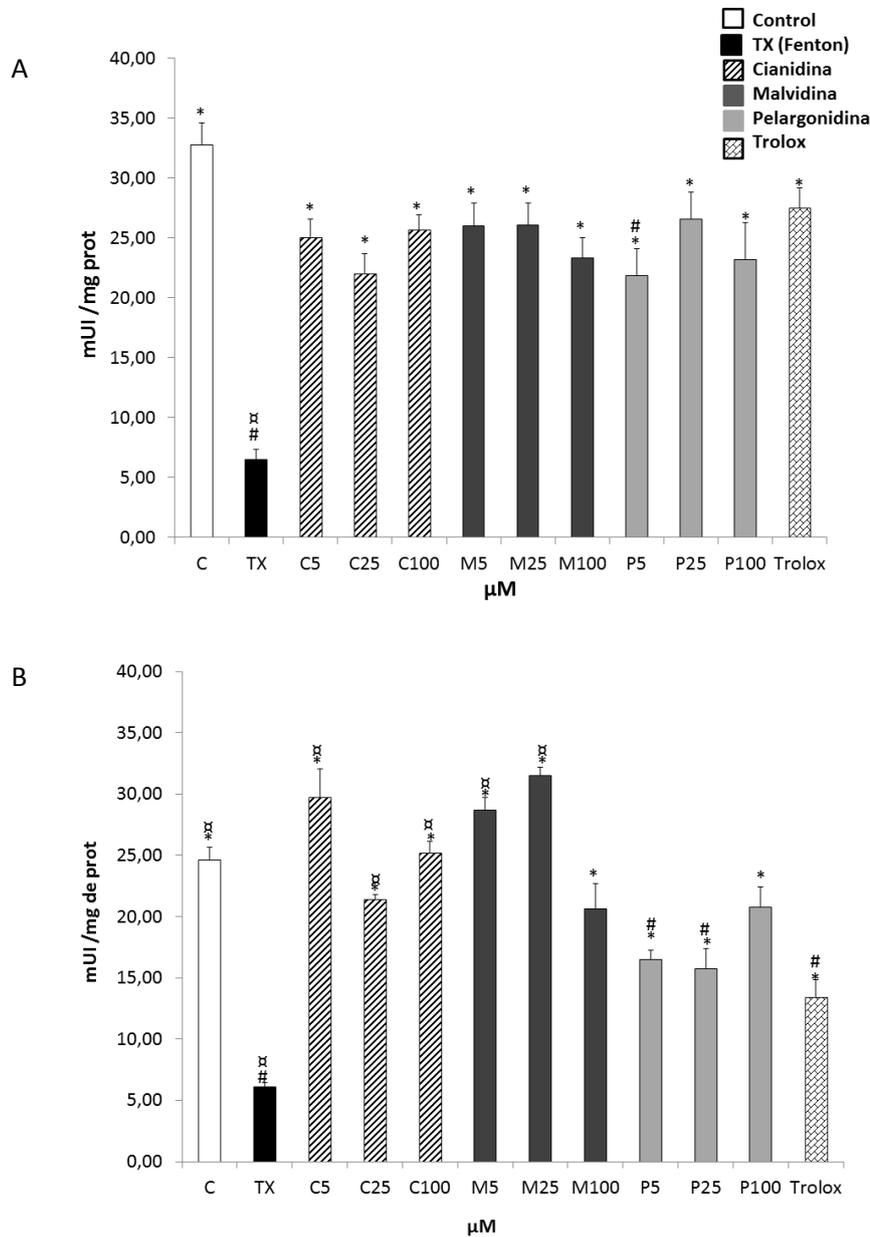


Figura 35. Efecto de las antocianidinas (5; 25 y 100 μ M) y trolox (0,5 mM) sobre la actividad enzimática GR (mili UI/mg de proteína) en ausencia (A) o presencia (B) de daño oxidativo. Los resultados se expresan como media \pm ES de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs células sin tratar (C); α $p < 0,05$ vs trolox.

Por el contrario, en el modelo de daño oxidativo (Fig. 35 B), el tratamiento previo con antocianidinas (24 h) indujo un incremento significativo en esta actividad enzimática, en

comparación a lo ocurrido en las células tratadas exclusivamente con el tóxico oxidante. Aunque el tratamiento con el control positivo (trolox) indujera un aumento de la actividad enzimática significativamente superior al del tóxico oxidante, este aumento no consiguió alcanzar los niveles de actividad GR de las células sin tratar.

En este modelo, se observaron diferencias significativas entre los diferentes tipos de antocianidinas y sus correspondientes concentraciones, aunque no siguió un patrón concentración dependiente (Fig. 35 B). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones de pelargonidina. Tanto cianidina (5 μM) como malvidina (5 y 25 μM) indujeron un incremento de la actividad enzimática GR significativamente superior al observado con las células tratadas a las diferentes concentraciones de pelargonidina.

2.6.4. Actividad glutatión peroxidasa (GPx)

El efecto de los antocianos sobre la actividad enzimática GPx se muestra en la Figura 36.

En ausencia de daño oxidativo (Fig. 36 A), cianidina a la concentración más elevada (100 μM), indujo un incremento significativo de esta actividad enzimática, respecto a las células sin tratar. El resto, excepto pelargonidina 100 μM y trolox (0,5mM), mostraron valores de actividad GPx significativamente inferiores a las observadas en las células control y, por el contrario, una actividad parecida a las células tratadas con el tóxico oxidante.

En el modelo de daño oxidativo, únicamente cianidina y malvidina a la concentración de 100 μM , indujeron un incremento en la actividad enzimática, superior al observado en el grupo de células tratadas solo con el reactivo de Fenton (Fig. 36 B). Los compuestos presentaron una actividad enzimática significativamente inferior a la de las células sin tratar.

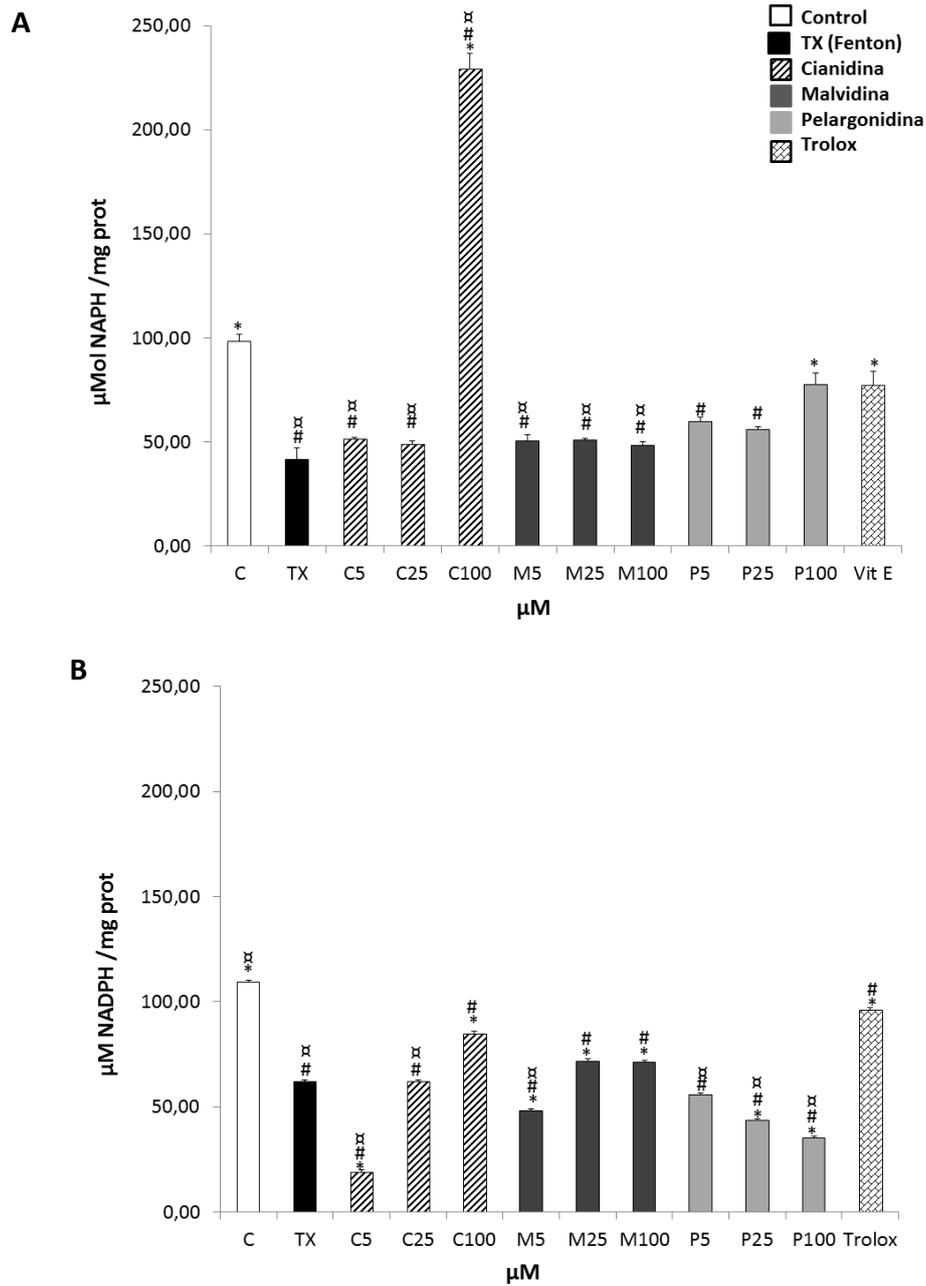


Figura 36. Efecto de las antocianidinas (5; 25 y 100 μM) y trolox (0,5 mM) sobre la actividad enzimática GPx (μM de NADPH/mg de proteína) en ausencia (A) o presencia (B) de daño oxidativo. Los resultados se expresan como media \pm ES de tres experimentos independientes (n=12). * $p < 0,05$ vs Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs células sin tratar (C); α $p < 0,05$ vs trolox.

2.6.5. Actividad NADPH quinona reductasa (NQO1)

En general, los antocianos a las concentraciones ensayadas, no presentan por sí mismos capacidad inductora de la actividad de este enzima NQO1, flavoproteína que cataliza la reducción de quinonas a hidroquinonas en presencia de NADH o NADPH,

ejerciendo un importante papel como destoxicador de compuestos reactivos (semiquinonas) originados en el organismo (Siegel y col., 2012) (Fig. 37 A). Cianidina a las concentraciones de 5 y 100 μM induce una actividad enzimática significativamente inferior a la observada en las células sin tratar (0,84 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína).

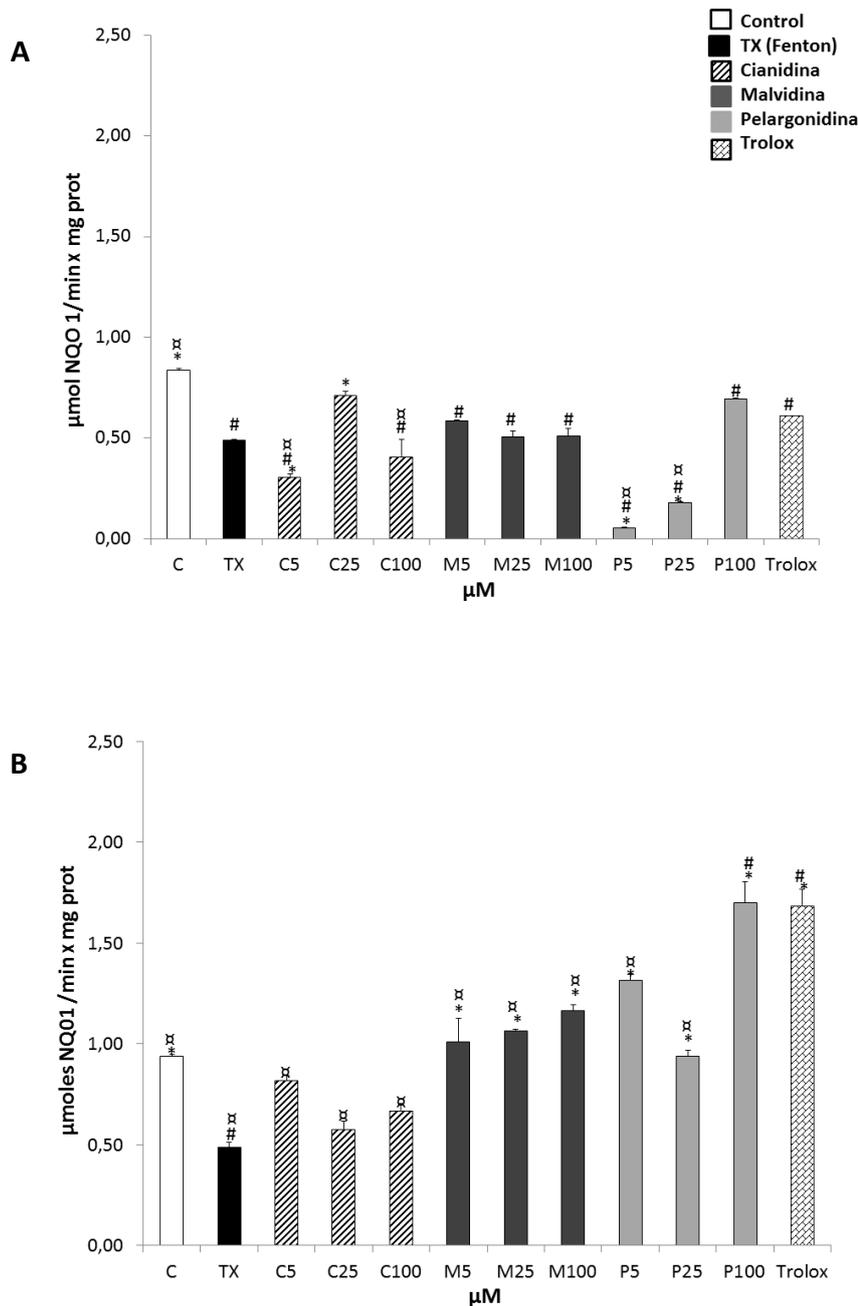


Figura 37. Efecto de las antocianidinas (5; 25 y 100 μM) sobre la actividad enzimática NQO1 ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína) en ausencia (A) o presencia (B) de daño oxidativo. Los resultados se expresan como media \pm ES de tres experimentos independientes ($n=12$). * $p<0,05$ vs Fenton (TX); # $p<0,05$ vs células sin tratar (C); $\# p<0,05$ vs trolox.

Por el contrario, a la concentración de 25 μM la actividad enzimática (0,71 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) fue similar a la de las células sin tratar. En el caso de la malvidina, no se mostraron diferencias entre concentraciones y su actividad fue significativamente inferior a la de las células control. En cuanto a pelargonidina, existen diferencias significativas con las células sin tratar, a todas las concentraciones ensayadas.

La aplicación del daño oxidativo mediante el reactivo de Fenton, provocó una disminución significativa de la actividad de este enzima (Fig. 37 B). El tratamiento previo con antocianidinas (24 h), consiguió revertir parcialmente esa disminución de la actividad en el caso de malvidina y pelargonidina, mostrando en todas las concentraciones ensayadas valores de actividad significativamente superiores al obtenido para las células tratadas exclusivamente con el reactivo de Fenton.

2.7. DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN. ÍNDICE REDOX (IR)

En la Figura 38 se muestran los niveles de GSH y GSSG por mg de proteína, así como el índice redox (GSG/GSSG) de las células sin tratar (C), tratadas con reactivo de Fenton, trolox (0,5 mM) y tras el tratamiento previo con antocianidinas en ausencia (Fig. 38, A, C y E) o presencia de daño oxidativo (Fig. 38 B, D y F).

Las células sin tratar (Fig. 38 A) mostraron niveles de GSH de $678,47 \pm 8,3$ nmoles/mg prot. El tratamiento con cianidina 100 μM fue el único que indujo una disminución significativa de este antioxidante. Por el contrario, cianidina 5 μM , malvidina 5 y 100 μM y pelargonidina, a todas las concentraciones ensayadas, mantuvieron niveles significativamente superiores a las células sin tratar (excepto malvidina 25 μM). No se observaron diferencias significativas con las células tratadas con trolox.

En el caso del GSSG (Fig. 38 C), las células sin tratar presentaron un nivel de $83,07 \pm 3,18$ nmoles/mg prot., observándose niveles similares tras el tratamiento con las antocianidinas, excepto para cianidina 100 μM y malvidina 5 y 25 μM que presentaron concentraciones significativamente inferiores. El ratio GSH/GSSG (Fig. 38 E) fue similar tras el tratamiento con las antocianidinas en comparación con el grupo de células tratadas exclusivamente con el medio de cultivo (Control), sin embargo el ratio fue significativamente superior en el caso del trolox.

La aplicación del daño oxidativo indujo una disminución significativa de los niveles de GSH ($416,23 \pm 3,59$ nmoles/mg prot.) en los astrocitos (Fig. 38 B). El tratamiento previo, durante 24 h, con las diferentes concentraciones de antocianidinas no pudo prevenir la disminución de este antioxidante inducida por el tóxico oxidante, excepto en el caso del tratamiento con malvidina 5 μM y trolox (Fig. 38 B).

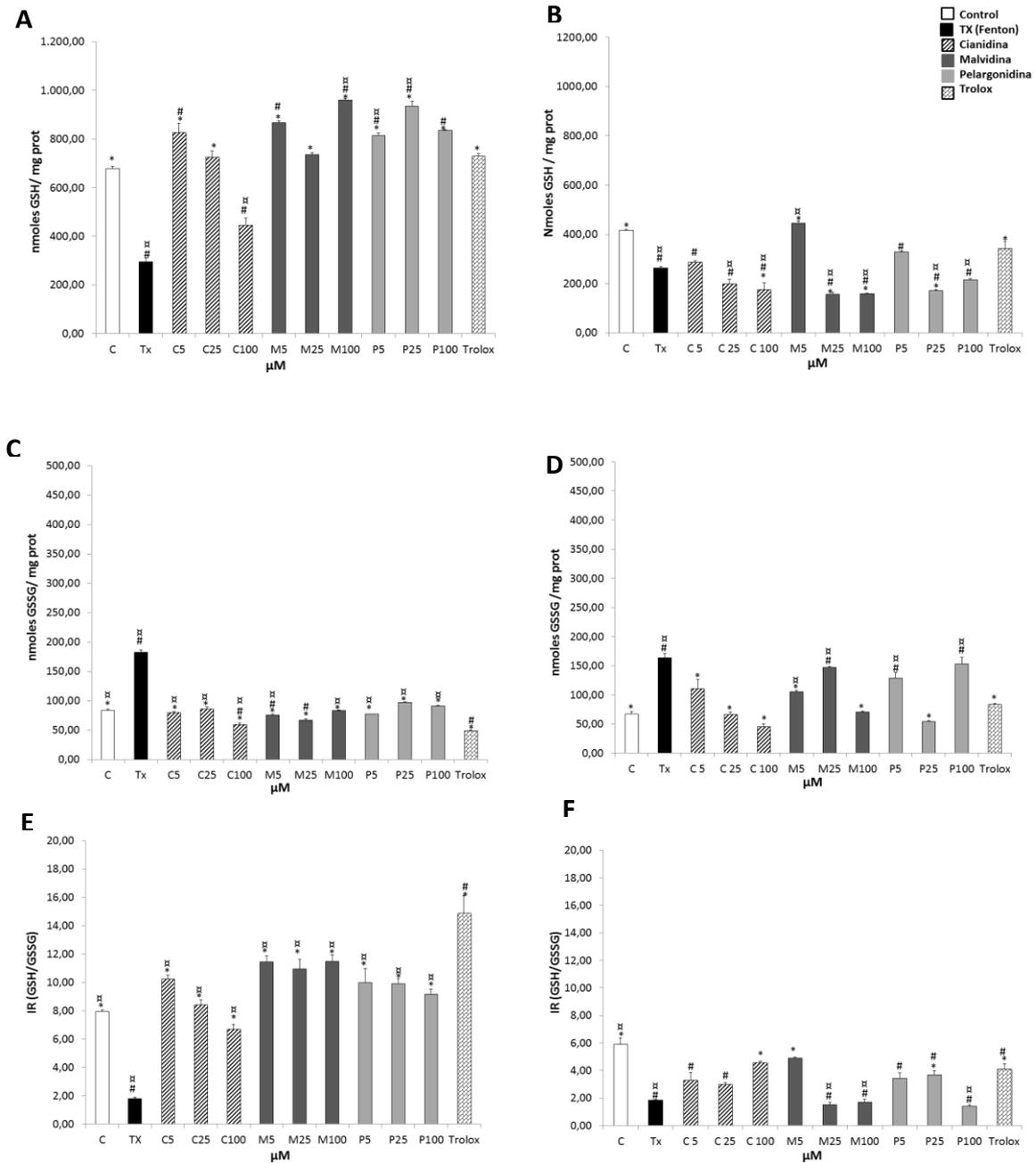


Figura 38.- Efecto de las antocianidinas (5; 25 y 100 μM), aplicadas durante 24 h, sobre la actividad de GSH, GSSG (nmoles/mg prot.), y ratio (GSH/GSSG) (índice redox) en ausencia (A, C y E) o presencia (B, D y F) de tóxico. Los resultados se representan como media \pm ES ($n = 12$) de tres experimentos independientes ($n=12$). * $p < 0,05$ vs Fenton (TX); # $p < 0,05$ vs células sin tratar (C); α $p < 0,05$ vs trolox.

En el caso del GSSG, el tratamiento con el reactivo de Fenton incrementó su producción significativamente ($163,75 \pm 7,96$ nmoles/mg prot.), respecto a lo ocurrido con las células sin tratar ($67,48 \pm 4,09$ nmoles/mg prot.) (Fig. 38 D). El tratamiento previo con antocianidinas originó igualmente una disminución en su producción, en niveles similares a las células sin tratar excepto en el caso de malvidina 25 μM y pelargonidina 5 y 100 μM , concentraciones para las que no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas respecto al grupo de células tratadas solo con el reactivo de Fenton.

El ratio GSH/GSSG (Fig. 38 F) fue significativamente mayor en las células sin tratar que en el grupo de células tratadas solo con Fenton: $5,90 \pm 0,49$ y $1,85 \pm 0,03$ nmoles/mg prot., respectivamente. El tratamiento previo con cianidina $100 \mu\text{M}$, malvidina $5 \mu\text{M}$ y pelargonidina $25 \mu\text{M}$ presentó un índice redox superior al tóxico. Para el resto de concentraciones de las diferentes antocianidinas no se observaron diferencias significativas respecto a las células tratadas con el tóxico. El control positivo trolox si presentó un índice redox significativamente superior al de las células tratadas únicamente con reactivo de Fenton.

2.8. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CASPASAS 3, 8 y 9

Los resultados obtenidos en los tratamientos de los astrocitos con las antocianidinas sobre la actividad de los diferentes tipos de caspasas, se presentan en la Figura 39. En 39 A, se puede observar que no existen diferencias significativas entre las actividades caspasa 3 y caspasa 8 correspondientes a cada uno de los compuestos y las obtenidas para las células sin tratar. Por el contrario, se observa un incremento estadísticamente significativo en cuanto a la actividad caspasa 9 cuando las células se trataron con cianidina $25 \mu\text{M}$ y malvidina 5 ; 25 y $100 \mu\text{M}$. En la tabla 15, se muestran los valores obtenidos en UAF/h/mg prot.

Cuando las células se sometieron a daño oxidativo inducido por H_2O_2 ($500 \mu\text{M}$), el tratamiento previo con las antocianidinas (24 h), redujo significativamente la actividad caspasa 3 respecto a lo ocurrido en las células tratadas exclusivamente con el tóxico (Fig. 39 B). No obstante, en ningún caso se consiguieron reducir las actividades a niveles similares a los obtenidos para las células sin tratar. En la tabla 16 se muestran los valores obtenidos.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad caspasa 8, en el modelo de daño oxidativo, fueron similares a los obtenidos para caspasa 3 (Fig. 39 B). Aunque como se puede observar, el tratamiento previo con antocianidinas consigue reducir la actividad caspasa 8 respecto a lo ocurrido en las células tratadas solamente con el tóxico, en ningún caso se consiguió revertir los valores de actividad a los niveles basales de las células sin tratar. Las antocianidinas Malvidina 5 y $100 \mu\text{M}$, y pelargonidina a las tres concentraciones ensayadas, no mostraron diferencias significativas respecto a las células tratadas con el control positivo trolox. En la tabla 16 se muestran los valores obtenidos en UAF/h/mg prot.

En el modelo de daño oxidativo inducido en astrocitos, la actividad caspasa 9 es prácticamente nula en todos los casos (células tratadas con el tóxico, trolox y antocianidinas), excepto con cianidina $5\mu\text{M}$ y malvidina 25 y $100 \mu\text{M}$, que presentaron una actividad significativamente superior a la del tóxico pero inferior a la de caspasa 9

basal (células sin tratar) (Fig. 39 B). En cuanto a las diferencias estadísticas entre antocianidinas, en la tabla 16 se puede observar la ausencia de diferencias entre concentraciones de cada antocianidina y con el trolox, no obstante, se encontraron diferencias en la actividad caspasa 8, entre malvidina y pelargonidina 100 μ M.

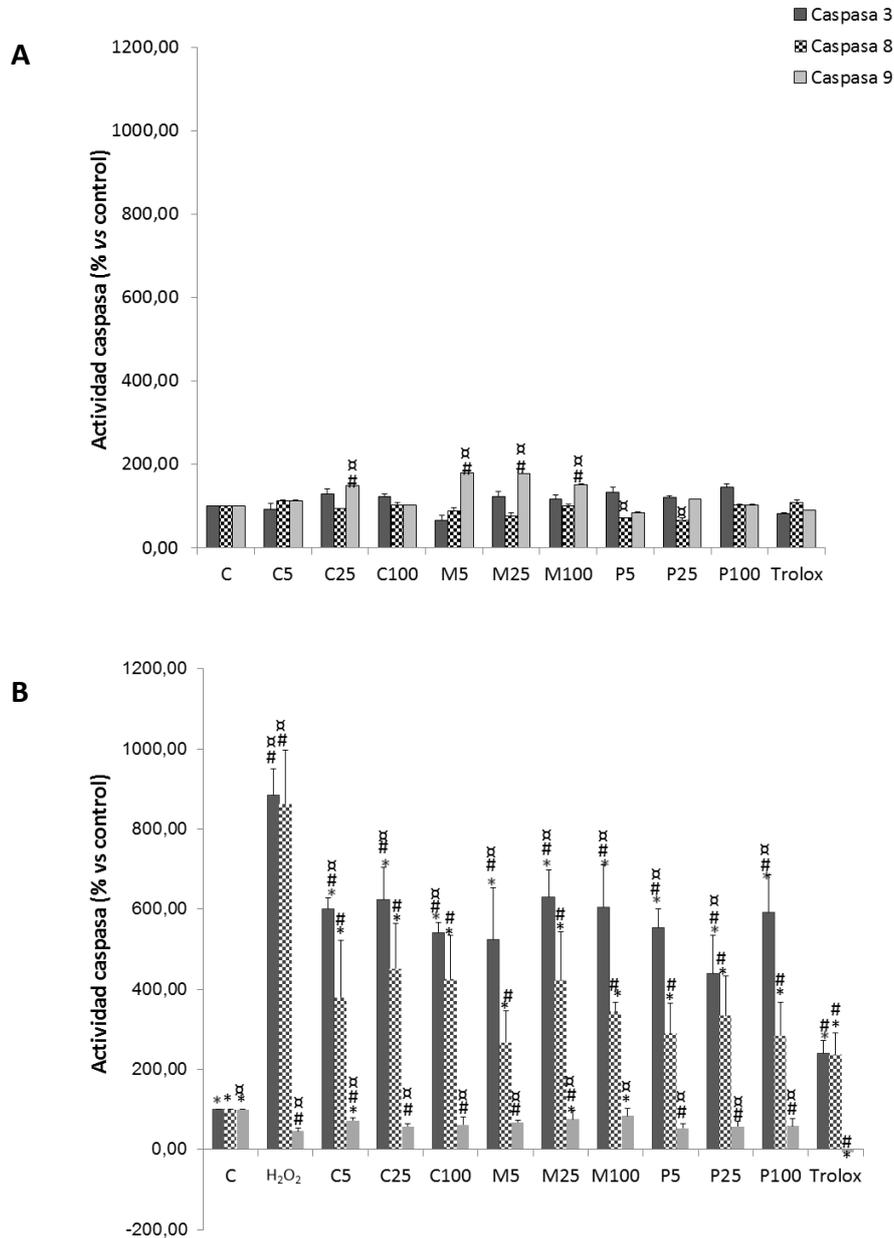


Figura 39. Efecto (% respecto a su control) de diferentes concentraciones (5; 25 y 100 μ M) de antocianidinas (cianidina, malvidina y pelargonidina) y trolox en ausencia (A) o presencia (B) de daño oxidativo inducido por H₂O₂ (500 μ M), sobre las actividades caspasa 3, 8 y 9 en astrocitos. C: células sin tratar; Tx: tóxico. Los resultados se representan como porcentajes de las medias \pm SD de tres experimentos independientes respecto a las células sin tratar, cuyo valor es considerado 100% de la actividad (n=12). #p<0,05 vs células sin tratar (C); *p<0,05 vs tóxico (Tx); α p<0,05 vs trolox.

Tabla 15. Valores de caspasa 3, 8 y 9 en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por hora (h) y por milígramo de proteína (mg prot) de las células sin tratar y tratadas con distintas concentraciones de antocianidinas y trolox (0,5mM). Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). ^ap< 0,05 vs control; ^bp< 0,05 trolox.

	Tratamiento	μ M	Actividad caspasa (UAF/h/mg de prot) \pm SD
CASPASA 3	Control		564,88 \pm 14,11
	Cianidina	5	521,14 \pm 54,63
		25	725,96 \pm 58,02
		100	687,92 \pm 20,08
	Malvidina	5	368,22 \pm 47,73
		25	689,74 \pm 77,76
		100	656,63 \pm 47,58
	Pelargonidina	5	743,4 \pm 54,06
		25	681,9 \pm 33,66
		100	818,32 \pm 56,36
Trolox	500	459,12 \pm 28,61	
CASPASA 8	Control		95,67 \pm 0,29
	Cianidina	5	107,82 \pm 0,58
		25	88,73 \pm 0,58
		100	97,23 \pm 1,54
	Malvidina	5	83,55 \pm 4,24
		25	72,12 \pm 7,95
		100	96,19 \pm 7,91
	Pelargonidina	5	67,61 \pm 3,74 ^b
		25	62,56 \pm 6,18 ^b
		100	96,52 \pm 0,67
Trolox	500	107,59 \pm 6,27	
CASPASA 9	Control		20,16 \pm 0,62
	Cianidina	5	22,65 \pm 0,68
		25	29,95 \pm 0,3 ^{a,b}
		100	20,39 \pm 0,4
	Malvidina	5	36,1 \pm 0,61 ^{a,b}
		25	35,58 \pm 1,04 ^{a,b}
		100	30,34 \pm 0,39 ^{a,b}
	Pelargonidina	5	17,03 \pm 0,27
		25	23,42 \pm 0,69
		100	20,56 \pm 0,91
Trolox	500	18,15 \pm 0,54	

Tabla 16. Valores de caspasa 3, 8 y 9 en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por hora (h) y por milígramo de proteína (mg prot) de las células sin tratar y tratadas con distintas concentraciones de antocianidinas y trolox (0,5 mM) en presencia de un tóxico oxidante (H₂O₂ 0,5 mM). Los resultados se

expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). ^ap< 0,05 vs control; ^bp< 0,05 vs trolox .

	Tratamiento	μ M	Actividad caspasa (UAF/h/mg de prot) \pm SD
CASPASA 3	Control		59,41 \pm 0,84
	Cianidina	5	356,15 \pm 0,93 ^{a,b}
		25	370,01 \pm 14,58 ^{a,b}
		100	321,59 \pm 2,28 ^{a,b}
	Malvidina	5	311,4 \pm 29,79 ^{a,b}
		25	374,01 \pm 21,76 ^{a,b}
		100	359,84 \pm 36,44 ^a
Pelargonidina	5	328,78 \pm 27,16 ^{a,b}	
	25	260,8 \pm 9,88 ^{a,b}	
	100	352,04 \pm 16,14 ^{a,b}	
Trolox	500	239,6 \pm 7,57 ^a	
H ₂ O ₂	500	593,56 \pm 12,17 ^{a,b}	
CASPASA 8	Control		68,71 \pm 11,32
	Cianidina	5	260,69 \pm 17,83 ^a
		25	310,32 \pm 25,37 ^a
		100	292,43 \pm 15,67 ^a
	Malvidina	5	183,56 \pm 24,41 ^a
		25	291,1 \pm 20,34 ^a
		100	237,37 \pm 20,91 ^a
Pelargonidina	5	199,14 \pm 13,55 ^a	
	25	229,63 \pm 15,07 ^a	
	100	195,13 \pm 15 ^a	
Trolox	500	236,9 \pm 14,67 ^a	
H ₂ O ₂	500	593,56 \pm 24,34 ^{a,b}	
CASPASA 9	Control		14,27 \pm 0,52
	Cianidina	5	10,29 \pm 0,78 ^{a,b}
		25	8,19 \pm 0,12 ^{a,b}
		100	8,82 \pm 0,11 ^{a,b}
	Malvidina	5	9,65 \pm 0,75 ^{a,b}
		25	10,72 \pm 0,13 ^{a,b}
		100	11,89 \pm 0,19 ^b
Pelargonidina	5	7,56 \pm 0,83 ^{a,b}	
	25	8,15 \pm 0,5 ^{a,b}	
	100	8,33 \pm 0,31 ^{a,b}	
Trolox	500	-7,25 \pm 0,22 ^a	
H ₂ O ₂	500	6,54 \pm 0,23 ^{a,b}	

2.9. EFECTO DE LAS ANTOCIANIDINAS EN LA LIBERACIÓN DE NITRITOS

Ninguna de las tres antocianidinas, a las concentraciones ensayadas induce un incremento significativo de la liberación de nitritos respecto a las células sin tratar (Fig. 40 A).

Tabla 17. Porcentajes de liberación de nitritos en células sin tratar, o tratadas con diferentes concentraciones de antocianidinas. El tratamiento con IFN γ se considera 100% de liberación. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). ^ap< 0,05 vs control.

Tratamiento	μ M	% Liberación \pm SD
C (Control)		8,84 \pm 0,90
Cianidina	5	8,90 \pm 3,05
	25	8,26 \pm 1,24
	100	8,03 \pm 1,90
Malvidina	5	8,73 \pm 3,10
	25	7,80 \pm 2,30
	100	9,89 \pm 3,40
Pelargonidina	5	5,88 \pm 3,46
	25	5,82 \pm 3,80
	100	10,12 \pm 3,06
Trolox	500	6,82 \pm 3,09
IFN γ		100,00 \pm 1,20 ^a

Cuando los astrocitos son estimulados por IFN γ se observa un incremento muy importante en la liberación de nitritos (Fig. 40 B). El tratamiento previo con las antocianidinas redujo significativamente dicha liberación (Tabla 17).

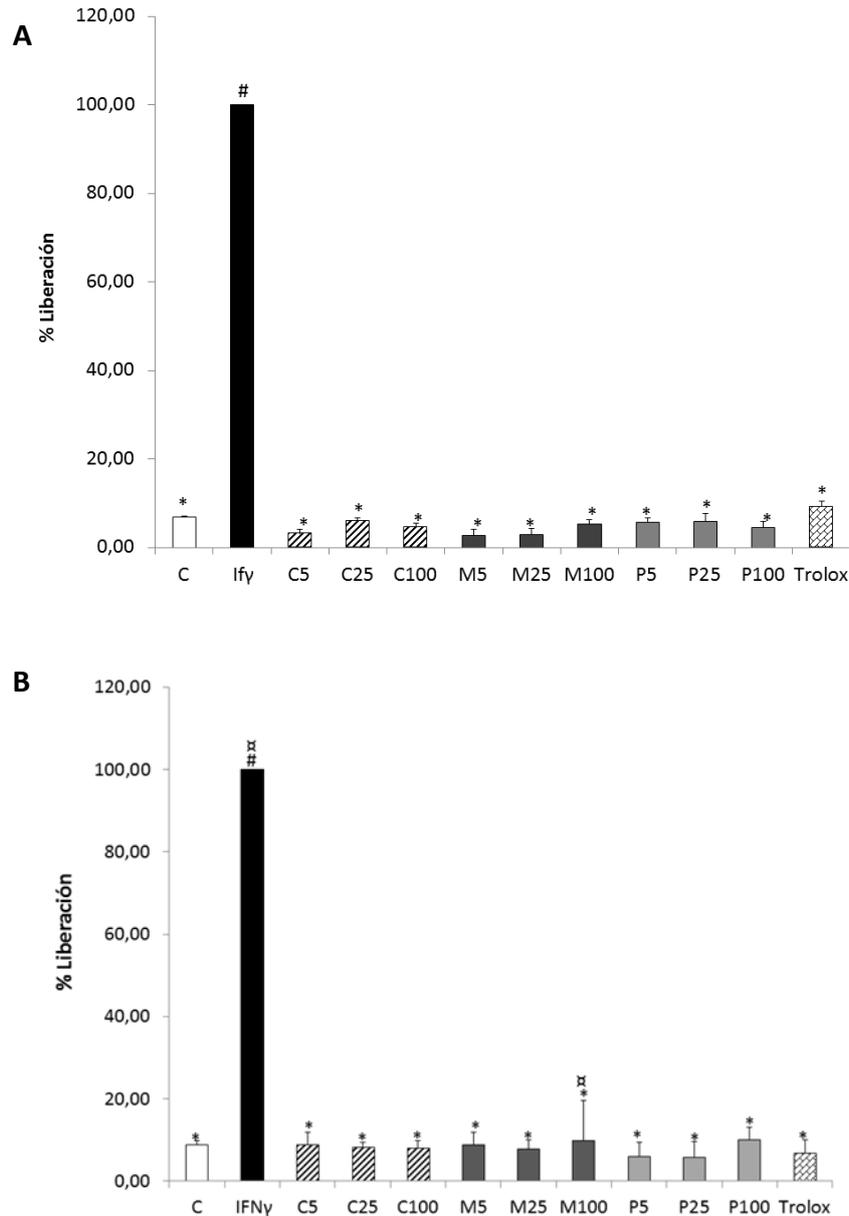


Figura 40. Porcentajes (%) de liberación de nitritos al medio de cultivo A) inducido por IFN γ y antocianidinas o trolox y B) inducido por IFN γ previo tratamiento con antocianidinas o trolox. C: células sin tratar. Los resultados se representan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). *p< 0,05 vs IFN γ ; #p< 0,05 vs C; α p<0,05 vs Trolox.

2.10. EVALUACION DE LOS EFECTOS DE ANTOCIANIDINAS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR INDUCIDA POR MPTP

Tal como se muestra en la Figura 41, la viabilidad celular disminuyó significativamente tras el tratamiento con MPTP ($47,29 \pm 6,32$ %), considerando un valor de viabilidad del 100% el de las células sin tratar. El tratamiento previo con antocianidinas, si bien

previno esa reducción, no consiguió revertir completamente el daño inducido por esta neurotoxina pro-oxidante.

En la Tabla 18 se puede observar que tanto las células tratadas con cianidina como con malvidina presentan diferencias entre sus concentraciones. Por el contrario, en el tratamiento con pelargonidina, no hubo diferencias entre concentraciones. En el caso de la cianidina el porcentaje de viabilidad es dosis dependiente, mientras que curiosamente, en el caso de la malvidina el efecto es el contrario, se lograron mejores efectos a menor concentración (5 μ M).

Se encontraron diferencias entre compuestos en el caso del tratamiento con cianidina 100 μ M y las concentraciones más elevadas de malvidina y pelargonidina.

El tratamiento con el análogo de la vitamina E tampoco consiguió revertir el efecto inducido por la toxina MPTP, pues aunque si mostró una viabilidad significativamente superior a la de las células tratadas únicamente con MPTP, dicha viabilidad fue significativamente inferior a la de las células control.

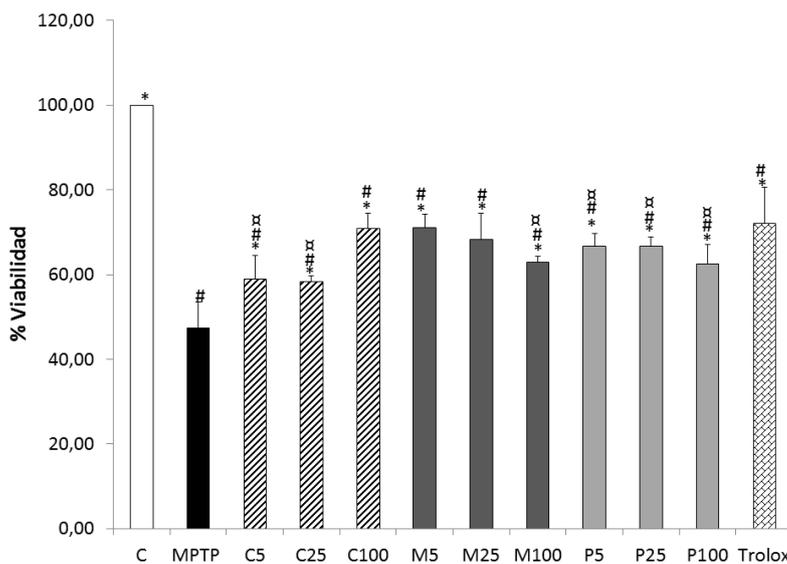


Figura 41. Efecto de las antocianidinas sobre la viabilidad celular (%), en presencia de MPTP 1 mM. Los resultados se representan como media \pm SD (n =12) de tres experimentos independientes. C: células sin tratar (100% de viabilidad); MPTP: células tratadas exclusivamente con la neurotoxina. *p< 0,05 vs MPTP; #p<0,05 vs células sin tratar (C); α p<0,05 vs trolox.

Tabla 18. Porcentaje de viabilidad celular de células sin tratar (Control), y tratadas con diferentes concentraciones de antocianidinas y con trolox (24 h) y posterior tratamiento con MPTP (1 mM). Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (n=12). ^ap< 0,05 entre concentraciones; ^bp< 0,05 entre antocianidinas.

Tratamiento	μ M	% Viabilidad \pm ES
C (Control)		100 \pm 0,00
Cianidina	5	58,95 \pm 5,55 ^a
	25	58,36 \pm 1,42 ^a
	100	70,89 \pm 3,51 ^{a,b}
Malvidina	5	71,01 \pm 3,18 ^a
	25	68,27 \pm 6,14 ^a
	100	62,84 \pm 1,44 ^{a,b}
Pelargonidina	5	66,64 \pm 3,08
	25	66,74 \pm 2,08
	100	62,56 \pm 4,48 ^{a,b}
Trolox	500	72,14 \pm 8,5
MPTP	1000	47,29 \pm 6,32

DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas, el aumento en las enfermedades neurodegenerativas ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar estudios sobre sus causas y consecuencias, con objeto de intentar hallar moléculas activas eficaces para su prevención y tratamiento.

Entre los objetivos prioritarios del grupo de investigación del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en donde se enmarca este trabajo, figura la valoración de componentes bioactivos de leguminosas mediante la aplicación de procesos tradicionales (cocción) y biotecnológicos (germinación), así como la evaluación de su actividad neuroprotectora. Por ello, y a propuesta de colaboración con el grupo de investigación perteneciente al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, del Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC), solicitamos y nos fue concedido un proyecto en el cual se realizó un estudio del contenido en compuestos fenólicos, flavonoídicos y no flavonoídicos de *Lens culinaris* Medik. cv. Rubia de la Armuña y *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tolosana (crudas y procesadas) así como de su actividad neuroprotectora.

El estudio químico de estas semillas de leguminosas crudas y procesadas, mostró una rica composición en compuestos polifenólicos, ya indicada en diferentes trabajos de investigación científica realizados en los últimos años, observando cómo el procesado, no solo puede afectar a la concentración de los mismos, sino que también puede originar la biosíntesis de nuevos componentes, a partir de los inicialmente presentes en las semillas crudas.

Los resultados del análisis de la composición química de las semillas de judías de Tolosa, indicaron la presencia de ácidos hidroxicinámicos (ác. ferúlico, *p*-cumárico y sinápico) libres y esterificados, y abundantes ácidos aldáricos (ácidos galactárico, altrárico o glucárico) y sus derivados, compuestos ya identificados en otras especies y variedades de judías. Dueñas y col. (2005), identificaron como compuestos más abundantes en *Vigna sinensis* L. (frijol caupí) los derivados aldáricos del ácido ferúlico y Aguilera y col. (2011), en judías pintas (*Phaseolus vulgaris* L.), detectaron derivados del ácido ferúlico y *p*-cumárico (44% respecto a fenoles totales). Nuestros resultados también están consonancia con los publicados por Lin y col. (2008), realizados en 24 variedades de *Phaseolus vulgaris* L.

En judías de Tolosa sin procesar, los componentes fenólicos más abundantes, excluidos los antocianos, resultaron ser dímeros y trímeros de procianidinas (100,01 µg/g), no obstante también se encontraron en concentración importante, derivados de flavonas (apigenina) y flavonoles (quercetina y kaempferol), flavanonas (naringenina y hesperetina) y algunos isoflavonoides (derivados de genisteína). Entre los antocianos, los más abundantes fueron los derivados de cianidina y pelargonidina. Estos resultados están en concordancia con los publicados por Ranilla y col. (2007), que describieron como componentes fenólicos mayoritarios en variedades de judías con testa negra y rojiza, a antocianos y derivados de quercetina, mientras que los derivados del kaempferol resultaban ser más abundantes en las variedades rojizas.

El estudio analítico de las semillas de lentejas sin procesar evidenció la presencia de numerosos compuestos fenólicos, siendo los más abundantes los derivados del kaempferol. Estos resultados confirman los obtenidos por Zou y col. (2011), tras el análisis de distintas fracciones de semillas (crudas, extraídas con una mezcla de etanol/agua) de *Lens culinaris* Medik, var. Morton. Estos autores identificaron como componentes mayoritarios los derivados del kaempferol y, como compuesto más abundante, un derivado tetraglucosilado. Además se ha detectado la presencia de heterósidos mono-, di- y triglicosilados del kaempferol y dos *p*-cumaroil derivados de este flavonol, como ocurre en otras variedades de lentejas (Kite y col., 2009; 2011). Igualmente se ha puesto de manifiesto la presencia de ácido *p*-cumárico libre y sus derivados, que también han sido identificados en otras semillas de testa oscura, como ocurre en algunos tipos de soja (*Glycine max* (L.) Merr. cv. C-1) (Xu y Chang, 2008a).

La riqueza en componentes polifenólicos de las leguminosas sin procesar podría justificar su eficacia en la prevención de determinados procesos relacionados con la oxidación. No obstante, la presencia de compuestos difícilmente digeribles, antinutricionales (hemoaglutininas, inhibidores de tripsina) o su complicada palatabilidad, hace necesario su procesado, lo que además supone un incremento en la biodisponibilidad de los nutrientes (Xu y Chang, 2008b).

El análisis de las muestras procesadas tanto de judías de Tolosa como de lentejas del cultivar Rubia de la Armuña, ha mostrado que la cocción (y liofilización), forma más común de procesar las leguminosas a lo largo de la historia de la humanidad, disminuye significativamente el contenido total en polifenoles (Turkmen y col., 2005; Siddhuraju, 2006). Estos resultados son similares a los obtenidos en dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. (var. Negro 8025 y var. Bayo Madero) para las cuales se observó que la cocción por métodos tradicionales, disminuía el contenido en flavonoles (quercetina), aunque incrementaba ligeramente el de catequina y ácido *p*-cumárico, probablemente como consecuencia de la hidrólisis de los compuestos iniciales (Ramírez-Jiménez y col., 2014). En nuestro análisis, también se observó una disminución significativa en la concentración de procianidinas dímeras y trímeras, de los derivados aldáricos del ácido ferúlico y de las formas heterosídicas de flavonas y flavonoles, mientras que se incrementó la concentración de algunos ácidos fenólicos en su forma libre no heterosídica (ácidos ferúlico, *p*-cumárico y sinápico). En este caso no se observó un aumento en la concentración de geninas libres de flavonas, flavanonas y flavonoles.

En cuanto a los compuestos antociánicos, hemos podido comprobar que, tras la cocción, la concentración disminuye considerablemente (68%), no obstante se observa que la proporcionalidad entre ellos se mantiene, pues los glucósidos de cianidina y pelargonidina, continúan siendo los más abundantes.

Igualmente, en el caso de las lentejas, la cocción originó una disminución significativa (25%) del contenido en kaempferol-ramnosa-hexosa-hexosa-ramnosa, de otros derivados di- y triglicosilados, de heterósidos de luteolina y del contenido total de procianidinas y prodelfinidinas, probablemente también como consecuencia de procesos

hidrolíticos activados por el calor y la humedad. Por el contrario, a diferencia de lo que ocurre con las semillas sin procesar, la cocción indujo un incremento en la presencia de algunas geninas libres como el ácido *trans-p*-cumárico, el kaempferol y la luteolina. Curiosamente este procesado no afectó a la concentración de derivados *p*-cumaroil del kaempferol.

Por tanto, parece evidente que el procedimiento de cocción activa procesos hidrolíticos y transformaciones en los componentes polifenólicos de estas leguminosas.

La germinación de las semillas de leguminosas es un proceso ampliamente utilizado en la actualidad, destinado a disminuir los niveles de factores anti-nutricionales, mejorar la calidad y contribuir a su mejor palatabilidad (Urbano y col., 2005; Zielinski y col., 2006). Se caracteriza por una elevada actividad enzimática, que favorece la biosíntesis de metabolitos secundarios responsables de los beneficios para la salud atribuidos a algunas especies vegetales (Guajardo-Flores y col., 2013). Estos cambios en la composición varían en función del tiempo de germinación (López y col., 2013).

En las semillas objeto de este trabajo de investigación, se ha observado que la germinación induce la biosíntesis de compuestos no detectados en las semillas crudas. Por ejemplo, en judías de Tolosa se observa la presencia de derivados de isoflavonas (derivados de genisteína, daidzeína y biochaninas A y B), no identificados en semillas crudas ni cocidas, a excepción de un derivado de genisteína. Estos resultados confirman lo publicado por Lin y Lai (2006) que demostraron cómo la biosíntesis de isoflavonas de soja se incrementaba con el tiempo de germinación. Igualmente las judías germinadas contienen algunos heterósidos de naringenina, quercetina y miricetina, no identificados en las muestras correspondientes a las semillas crudas y cocidas.

En lentejas, la germinación induce un incremento muy significativo en la concentración de derivados heterosídicos del kaempferol, y muy especialmente de los cumaroil derivados. Por el contrario, tanto en lentejas como en judías, se observa una desaparición total de las procianidinas y prodelphinidinas, resultados similares a los obtenidos por López-Amorós y col. (2006), en su evaluación sobre la variación en la composición fenólica de diferentes leguminosas (lentejas, judías y garbanzos) sometidas al proceso de germinación. Después de la germinación, si se encontraron ácidos hidroxicinámicos esterificados con ácido ferúlico, *p*-cumárico y sinápico, aunque en menor concentración que la encontrada en judías sin procesar, siendo los derivados del ácido ferúlico y sinápico los que sufrieron un descenso más marcado. También se observó un descenso en la concentración de glucósidos de naringenina y hesperetina.

Tras la verificación de la riqueza en componentes fenólicos de las muestras de leguminosas crudas y procesadas, se realizó una aproximación a la evaluación de su posible capacidad antioxidante total, debida a la acción sinérgica del conjunto de sus componentes (Huang y col., 2005). Al no existir aún un claro consenso científico en cuanto a la metodología aplicable para alimentos o muestras biológicas, pues todos los métodos empleados hasta ahora tienen ventajas e inconvenientes (Forman y col., 2015),

evaluamos en primer lugar el contenido total de fenoles, para a continuación medir su capacidad de absorción de radicales libres peroxilo (ORAC), método utilizado ampliamente en el estudio de la actividad antioxidante de muestras biológicas, incluidas las de origen vegetal (Huang y col., 2005; Sueishi y col., 2012). También se evaluó la capacidad captadora del radical difenil-picril hidracilo (DPPH), método que se emplea para frutos, zumos y extractos vegetales (Sánchez-Moreno, 2002; Azzouzi y col., 2014).

Los resultados obtenidos mostraron que las muestras de leguminosas crudas, tanto procedentes de judías como de lentejas, mantenían una muy adecuada capacidad antioxidante, con potencia similar a la obtenida con el compuesto de referencia (trolox), mientras que el procesado incidía de forma negativa sobre su capacidad captadora de radicales libres siguiendo el orden de potencia: crudas > cocidas > germinadas. Estos resultados están de acuerdo con los publicados anteriormente sobre diferentes variedades de judías crudas y procesadas (Xu y Chang, 2008c; Aguilera y col., 2011) y otras leguminosas sometidas a procesos térmicos (Amarowicz y Pegg, 2008).

Distintos autores han demostrado que el procesado mediante cocción influye negativamente en su capacidad antioxidante (ORAC). La temperatura y el tiempo de exposición al medio acuoso son factores que inciden decisivamente en dicha capacidad, ya que favorecen la disolución y pérdida de los componentes polifenólicos más polares (Aguilera y col., 2011). Xu y Chang (2008c) comprobaron además que variaciones en la temperatura y presión de cocción no conseguían recuperar el valor de ORAC alcanzado con las semillas sin procesar.

En el caso de la germinación, al ser un tipo de procesado en el que intervienen variables como el tiempo de germinación o la parte del germinado analizado (cotiledón, testa, brote), los resultados son más complejos (Randhir y col., 2007). Por ejemplo, en un estudio realizado en judías se observó que el tiempo de germinación originaba una disminución significativa de la capacidad antioxidante (ORAC) en cotiledones, mientras que en la testa se observaba el efecto contrario, obteniendo un valor de ORAC mayor a partir del 2º, 3º y 4º día de germinación, si bien, después del cuarto día disminuía dicha actividad (Guajardo-Flores y col., 2013). Probablemente, la mayor actividad antioxidante de la testa sea debida a su mayor contenido en compuestos polifenólicos (taninos, antocianinas, flavonoles, etc.) (Boudjou y col., 2013). En lentejas, López-Amorós y col. (2006), han demostrado que la germinación disminuye la actividad antioxidante.

La comparación de los valores de ORAC entre los diferentes tipos de leguminosas, parece indicar que las lentejas son más eficaces en la captación del radical peroxilo que las judías, excepto en el caso de las muestras germinadas cuya actividad ORAC es similar.

El comportamiento de las muestras frente a la actividad captadora del radical DPPH indica que la germinación también ejerce un efecto negativo, no observándose diferencias entre muestras crudas y cocidas. Los resultados obtenidos confirman los

publicados en trabajos previos con otras variedades de judías (Aparicio-Fernández y col., 2008). Algunos autores indican que la cocción puede originar una disminución en la actividad DPPH entre un 33 y un 41% en diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L. (Ramírez-Jiménez y col., 2014), y que dicha disminución puede variar en función de la temperatura de cocción, tiempo, remojo previo, o descarte del agua de cocción (Ranilla y col., 2009).

Estos resultados sobre la capacidad antioxidante de las muestras crudas y procesadas están directamente relacionados con su contenido total en polifenoles que sigue también, en ambas leguminosas, el orden crudas > cocidas > germinadas.

En primer lugar, parece ser que el contenido en polifenoles totales (TPC) de las leguminosas en estudio, puede variar en función de la variedad considerada. En *Phaseolus vulgaris* L., las variedades de color más oscuro (variedades de color negro, marrón con rayas rojas, marrón o rojas), como ocurre en el cultivar Tolosana, presentan un contenido de fenoles superior al observado en las variedades de semillas blancas (Ranilla y col., 2007; Machado y col., 2008). También se han observado variaciones en el contenido de TPC en diferentes variedades de lentejas. En *Lens culinaris* Medik cv. Rubia de la Armuña se obtuvieron unos valores de $39,93 \pm 4,58$ mg GA/g de muestra, mientras que en *Lens culinaris* Medik cv. Morton, el grupo de Zou y col. (2011) obtuvo un TPC de $70 \pm 2,2$ mg GA/g de muestra.

En cuanto al procesado, Xu y Chang (2008b), en un estudio realizado con semillas de soja negras, observaron que la cocción disminuía el contenido en TPC, influyendo en ello las condiciones de presión y temperatura durante la cocción.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, aunque en judías el TPC disminuyó tras la cocción, la diferencia no fue significativa. Por el contrario, en lentejas si se observaron diferencias significativas entre las semillas sin procesar o sometidas a un proceso de cocción o germinación. Los valores de TPC que se obtuvieron tras la cocción disminuyeron aproximadamente un 36%.

Como ya se ha comentado, hemos comprobado que el proceso de germinación también influye negativamente en el TPC, tanto en judías como en lentejas, observándose reducciones del 34,55% y del 52,01% respectivamente. Guajardo-Flores y col. (2013), en un estudio realizado en judías negras, observaron que la cantidad total de fenoles, al igual que el valor ORAC, variaba en función del tiempo de germinación, de la humectación previa de las semillas, así como de la parte de la semilla utilizada para realizar el análisis. Estos autores encontraron un mayor TPC en la testa de la semilla, independientemente de otros factores, y un menor contenido en los cotiledones.

Estudios recientes evidencian la clara relación causa-consecuencia entre la oxidación de ciertas macromoléculas del organismo (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos,...) por parte de los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), y la alteración de sus funciones biológicas. De ahí que se relacione el inicio o progresión de distintas

enfermedades crónicas con el daño oxidativo. Por esta razón, se han realizado numerosos estudios, mayoritariamente en células en cultivo y modelos experimentales de animales, mediante los cuales se demuestra la eficacia de algunas moléculas de origen natural como captadoras de ROS, asignándoles un papel protector en el desarrollo de enfermedades oxidativas (Sandoval-Acuña y col., 2014).

Entre las moléculas que han demostrado una mayor eficacia antioxidante destacan los compuestos polifenólicos. Diferentes trabajos de investigación refieren su eficacia para corregir desórdenes mentales y enfermedades neurodegenerativas, probablemente como consecuencia precisamente de su potencial antioxidante (Bigford y Del Rossi, 2014). Estos compuestos parecen prevenir y mejorar enfermedades como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, pues se ha comprobado que modulan la neurotransmisión colinérgica y serotoninérgica, reducen el estrés oxidativo y protegen frente a la proteína β amiloide.

El cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno, a la presencia de gran cantidad de ácidos grasos insaturados (susceptibles de sufrir una peroxidación lipídica) y a una elevada concentración de metales de transición de alto índice redox, como son el hierro y el cobre (Steinbrenner y Sies, 2013). Por ello, cualquier daño en el cerebro implica estrés oxidativo e inflamación de las neuronas, que finalmente desemboca en la muerte celular. Ya que las neuronas poseen una capacidad antioxidante limitada, necesitan del apoyo de otras células del cerebro, los astrocitos, que contienen elevadas concentraciones de glutatión y enzimas antioxidantes eficaces para contrarrestar las consecuencias de dicho estrés oxidativo (Kleinkauf-Rocha y col., 2013; Chen y col., 2014). Los astrocitos juegan, por tanto, un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Intervienen en la formación y modulación de las sinapsis, son soporte estructural y ejercen, como ya se ha comentado, un efecto protector neuronal. Además, modulan la actividad microglial y atenúan su citotoxicidad (Tiwari y col., 2104).

Como investigación preliminar sobre los posibles beneficios que pueden ejercer los componentes de leguminosas crudas y procesadas en la prevención del daño oxidativo en el SNC, se ha realizado en este trabajo un estudio de sus efectos sobre la viabilidad de astrocitos y sobre la inhibición en la liberación de RL, en ausencia o presencia de daño oxidativo.

Puesto que en una de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, la enfermedad de Alzheimer, el aumento del estrés oxidativo viene reflejado por elevados niveles de iones hierro (Fe) y cobre (Cu), capaces de estimular la formación de radicales libres (radicales hidroxilo), en este estudio se eligió, como modelo del daño oxidativo celular, el inducido por el reactivo de Fenton (Jomova y col., 2010).

Tanto en la viabilidad celular como en la generación de RL, las muestras procedentes de leguminosas crudas y procesadas, ejercen un efecto beneficioso. Todas ellas mostraron un efecto protector frente al daño inducido por el reactivo de Fenton, si bien dicho

efecto fue, por lo general, algo más eficaz en el caso de las muestras de lentejas cocidas y, en ambas especies, inferior para las muestras de semillas germinadas. De hecho, los extractos de lentejas cocidas consiguieron revertir la viabilidad celular al estado inicial.

No existen grandes diferencias entre procesados, lo que probablemente sea debido a que, aunque tras la cocción o la germinación desciende el contenido en fenoles totales, la actividad protectora se mantiene. Ello se debe a la formación de nuevos compuestos, mediante hidrólisis, a partir de los polifenoles originales durante el proceso de cocción, o a la activación de procesos biosintéticos como consecuencia de la germinación. No obstante, también pueden contribuir a la actividad antioxidante otros componentes de estas leguminosas, como vitaminas y carotenoides, que actuarían de forma sinérgica (López-Amorós y col., 2006). Por ejemplo, en un estudio realizado con diferentes leguminosas se observó que lentejas y guisantes presentaban una concentración mayor de γ -tocoferol que el resto (Amarowicz y Pegg, 2008).

En el proyecto de investigación llevado a cabo junto con el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, se realizó un estudio estadístico para intentar establecer una relación entre la composición fenólica y la actividad neuroprotectora. Se analizaron comparativamente los valores de viabilidad celular obtenidos en el modelo de daño oxidativo y las concentraciones de los diferentes grupos de polifenoles. En lentejas, la actividad protectora de las muestras sin procesar, parece estar condicionada por la presencia de procianidinas y derivados de luteolina. En el caso de las sometidas a cocción, los cumaril derivados serían los responsables del efecto neuroprotector. Por el contrario, el contenido en kaempferol en las lentejas germinadas no parece afectar a la viabilidad celular, son los demás compuestos encontrados en el análisis los que afectan a la viabilidad. En judías, las antocianidinas podrían ser las responsables de su mayor eficacia antioxidante (ORAC) y del efecto protector de la viabilidad, frente al daño oxidativo inducido por el reactivo de Fenton (López y col., 2013).

Así pues, a la vista de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se podría concluir que tanto las lentejas como las judías de Tolosa son alimentos ricos en polifenoles y que estos, parecen ser beneficiosos para contrarrestar las consecuencias del estrés oxidativo. No obstante sería conveniente modificar algunas condiciones de su procesado para obtener el máximo beneficio antioxidante.

Algunos de los polifenoles detectados, han sido ya estudiados anteriormente en nuestro grupo de investigación (Martín y col., 2013). Por ello, en este estudio pretendimos evaluar la actividad de otros compuestos que podrían ser responsables de las diferencias en actividades entre ambas leguminosas. Teniendo en cuenta la mayor eficacia antioxidante de las muestras de judías, su mayor contenido en antocianidinas y que son estos compuestos los que parecen ser responsables de dicha eficacia, decidimos profundizar en su estudio.

La presencia de antocianidinas en distintos tipos de leguminosas está ampliamente demostrada. Ranilla y col. (2007), detectaron antocianidinas en diferentes variedades de

Phaseolus vulgaris L., principalmente en las de testa negra o rojiza, ligando su presencia a la actividad antioxidante de las semillas. También se han encontrado en variedades de lentejas, por ejemplo, en *Lens esculenta* var. Petite blonde de Dahra (Boudjou y col., 2013). Igualmente, en semillas de soja negra se han identificado cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, estando la primera en mayor concentración (Xu y Chang, 2008a).

Aunque se encuentran publicados estudios científicos que constatan los efectos neuroprotectores de estos compuestos sobre células y tejidos *in vitro* (Joseph y col., 2000; Youdim y col., 2004; Chen y col., 2009; Ke y col., 2011), hasta ahora no se había investigado su actividad sobre los astrocitos, células que como ya se ha comentado, ejercen un papel primordial en el control de la oxidación cerebral. La evidencia de que el factor subyacente de los desórdenes neurológicos es el aumento del estrés oxidativo, hecho que se apoya en el descubrimiento de que las cadenas proteicas son modificadas directamente por los ROS o por los RNS (especies reactivas de nitrógeno), o indirectamente por los productos de peroxidación lipídica (Jomova y col., 2010), nos animó a indagar sobre los mecanismos de acción farmacológicos implicados en la actividad antioxidante de estos compuestos, en este tipo de células.

Como se ha reseñado en la introducción, hasta hace poco tiempo, se pensaba que las antocianidinas tendrían escasa relevancia en las funciones cerebrales debido a la creencia de su baja accesibilidad para atravesar la BHE. En la actualidad, se ha demostrado que no solo acceden a los tejidos cerebrales, probablemente a través de un transportador tipo ABC, localizado en las células endoteliales, sino que incluso, dentro del cerebro, sufren transformaciones liberando en el mismo las formas farmacológicamente activas (Joseph y col., 2000; Youdim y col., 2004; Andrés-Lacueva y col., 2005). Recientemente, Faria y col. (2014) han demostrado que la eficiencia en el paso de la BHE depende del grado de metilación del compuesto, siendo mayor en el caso de los derivados mono- y dimetilados que en el de las antocianidinas cuyos hidroxilos fenólicos están libres.

La actividad antioxidante de este tipo de compuestos fenólicos ha sido constatada en numerosos estudios, demostrando que existe una clara relación estructura actividad (Wang y col., 1997; Jing y col., 2014). Las antocianidinas con el mismo patrón de hidroxilación en los anillos A y C, y un solo grupo hidroxilo libre en el anillo B (4'OH) (malvidina, pelargonidina y peonidina), presentan un valor ORAC inferior al obtenido con un compuesto di-hidroxilado (3',4' OH) como la cianidina (Wang y col., 1997). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este trabajo en cuanto a su capacidad captadora del radical DPPH, pues es igualmente cianidina la que presenta una CI_{50} menor (5,29 μ M) y malvidina mayor (46,26 μ M).

Efectivamente, algunos estudios relacionan el consumo de determinadas frutas ricas en antocianidinas (frambuesas, fresas, moras) con la disminución del estrés oxidativo y, por tanto, con efectos beneficiosos en la prevención de alteraciones neuronales y

cognitivas relacionadas con el envejecimiento (Chen y col., 2009). Por ejemplo, cianidina 3- glucósido ha demostrado ser capaz de disminuir el nivel de radicales libres acumulados en el cerebro por efecto del etanol, así como de ejercer un efecto neuroprotector frente a la isquemia cerebral inducida en ratón. Igualmente, este compuesto y sus metabolitos son capaces de proteger a las células neuronales del daño inducido por el péptido β -amiloide, del daño mitocondrial inducido por peróxido de hidrógeno, y de la fragmentación del ADN (*in vitro*) (Ke y col., 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación ponen de manifiesto que las antocianidinas por sí mismas, no solo no inducen toxicidad sobre los astrocitos, sino que son capaces de proteger a estas células del daño inducido por un tóxico oxidante.

En el organismo, además de existir un porcentaje de hierro “libre” (0,2-3%), existen numerosas moléculas que llevan asociados iones hierro (grupos de sulfuro de hierro [SFe], grupo hemo y proteína sin grupo hemo). En macrófagos murinos (RAW 264.7) se ha comprobado que, bajo condiciones de hipoxia, se produce un incremento en las concentraciones de Fe. La adición posterior de H_2O_2 induce un incremento significativo en la liberación de ROS (Li y col., 2014). Es por esta razón por la que se pretendió dilucidar si las antocianidinas en estudio eran capaces de disminuir la liberación de ROS, en un modelo de toxicidad celular inducido por el reactivo de Fenton ($FeSO_4$ 0,5mM/ H_2O_2 1mM). Una vez constatado el incremento en la liberación de radicales libres inducida por dicho reactivo oxidante, se confirmó la eficacia de diferentes concentraciones de antocianidinas para prevenir esa liberación.

Cuando existe una situación de estrés oxidativo, los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares pueden ser atacados por los ROS para formar lipohidroperóxidos, los cuales se descomponen rápidamente en productos secundarios, siendo el mayoritario el malondialdehído (Li y col., 2013; Halliwell y Chirico, 1993). Así mismo, la destrucción de las membranas induce la liberación al medio de cultivo del enzima LDH, ubicado en el citosol, por lo que su estimación puede utilizarse como marcador del daño provocado por necrosis celular.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, parece quedar claro que las antocianidinas estudiadas son capaces de inhibir la peroxidación lipídica inducida por el reactivo de Fenton, disminuyendo significativamente la liberación de MDA. Igualmente, ejercen un efecto protector de las membranas celulares, pues inhiben la liberación del LDH en el modelo de daño oxidativo. No obstante se observó que pelargonidina, a la concentración más elevada (100 μ M), resultaba menos eficaz que el resto de los compuestos, debido probablemente a la menor presencia de grupos fenólicos libres. Pascual-Teresa (2014), en su artículo de revisión sobre las actividades de los antocianos, adjudica mayor eficacia neutralizadora de ROS a los derivados trihidroxilados, describiendo su actividad en la regulación del factor NF- κ B y de la vía PI3K (fosfatidil inositol 3 kinasa)/AKT. Pelargonidina, derivado monohidroxilado, sería más eficaz como inhibidor de la actividad del proteosoma (degradación de proteínas no necesarias o dañadas). En este sentido, el estudio de los efectos de estos compuestos

sobre la morfología de los astrocitos, puso en evidencia la afectación provocada por pelargonidina a la concentración mencionada anteriormente, mientras que se mantiene intacta con el resto de concentraciones.

Las células del organismo disponen de mecanismos capaces de controlar la acción deletérea de los radicales libres. Uno de los enzimas encargados del mantenimiento del equilibrio redox del organismo es el enzima CAT. Sin embargo, aunque en el hígado se encuentre en concentración elevada, en la células del SNC su actividad es muy baja (Khanna y Nehru, 2007). Los resultados obtenidos corroboran su escasa incidencia en astrocitos, observándose valores muy similares tanto en células sin tratar como en células tratadas con el reactivo oxidante, ya hayan sido tratadas previamente o no con antocianidinas. Ello nos da a entender la capacidad protectora de estos compuestos frente a la acción tóxica del reactivo de Fenton, ya que activando este enzima, estimulan la producción de peróxido de hidrógeno y por tanto, disminuyen la cantidad de anión superóxido en el medio celular.

Otro de los enzimas que conforma el mecanismo de defensa antioxidante en el organismo es el enzima SOD. En un estudio realizado sobre moscas de la fruta, se observó que el tratamiento con un extracto de arroz negro rico en antocianinas (cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido), prolongaba su esperanza de vida (14%), así como aumentaba la expresión de los enzimas SOD1, SOD2 y CAT (Peng y col., 2014). En este mismo trabajo se demostró que el tratamiento con 30 mg/dl del extracto, aumentaba el tiempo de supervivencia de la línea transgénica de Alzheimer A β 4233769, sometida a la acción crónica del paraquat. Aunque las antocianidinas estudiadas parecen disminuir la actividad SOD en comparación con las células sin tratar, probablemente debido a su propia capacidad antioxidante por otros mecanismos, en un modelo de estrés oxidativo, se muestran capaces de incrementar la actividad enzimática significativamente.

Como ya se ha comentado en la introducción, son numerosos los estudios que identifican el glutatión como molécula crucial en diversos procesos fisiológicos, como por ejemplo, en la defensa antioxidante del organismo, detoxificación de xenobióticos, homeostasis redox, almacenamiento y transporte de cisteína, señalización celular, funcionamiento proteico, expresión de genes y en la diferenciación/proliferación celular. Es por ello, que un fallo en el metabolismo del glutatión, podría ser letal para la célula.

El glutatión es el antioxidante más abundante en el sistema nervioso central, interviniendo en la etiología de numerosas enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer, Parkinson y otras enfermedades (Aoyama y Nakaki, 2013). Es utilizado como sustrato por el enzima GPx en la detoxificación del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos, por ello, cuando los niveles de GSH disminuyen, aumenta el daño oxidativo en astrocitos, donde parece existir GSH en mayor concentración.

En diversos estudios se ha verificado la capacidad que tienen algunos compuestos polifenólicos para inducir la activación de enzimas dependientes de glutatión. Por ejemplo, Cho y col. (2013), en un modelo de estrés inducido por escopolamina, demostraron que el tratamiento con un extracto de *Rhus verniciflua* Stokes, rico en flavonoides, además de inducir la actividad SOD, provocaba un aumento significativo de la actividad GR, no modificándose la actividad GPx. Los flavonoides aislados de dicho extracto, mostraron actividad neuroprotectora sobre células HT22 del hipocampo dañadas por tratamiento con glutamato y sobre células microgliales (BV2) activadas por LPS. Las antocianidinas estudiadas indujeron un incremento en la actividad del enzima GR, con lo cual favorecerían, en una situación de estrés oxidativo, la reducción del GSSG a GSH (sustrato utilizado por la GPx para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno) y de esta forma inducirían un aumento de la actividad GPx. En un ensayo realizado sobre hojas de *Saccharum officinarum* L. sometidas a estrés oxidativo, se observó que en estas condiciones, la planta genera mayor cantidad de antocianinas. Este incremento de polifenoles, aumenta los niveles de GR, lo que induce una mayor cantidad de GSH en las hojas de la planta y por tanto, aumento del ratio GSH/GSSG (Zhu y col., 2013).

En cuanto a los resultados de la actividad GPx, se ha observado que varían en función de la antocianidina estudiada y de la concentración de cada una de ellas. La concentración más alta de cianidina y malvidina ha presentado una actividad significativamente superior a la del tóxico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Song y col. (2013), en los cuales, el tratamiento de células de adenocarcinoma humano (MDA-MB-231) con diferentes concentraciones de cianidina-3-glucósido, en un modelo de daño celular inducido por acroleína 5 mM, indujo un incremento de la actividad. Este incremento se observó sobre todo a partir de las concentraciones de 25-100 μM . En nuestros resultados, no se ha observado este incremento a la concentración de 25 μM . En este caso, los resultados fueron parecidos a los obtenidos solo con el tóxico. Las concentraciones bajas y medias de todas las antocianidinas estudiadas y las más elevadas de pelargonidina presentaron una actividad GPx inferior o igual a la del tóxico oxidante.

En condiciones normales, el ratio GSH/GSSG o índice redox puede variar entre 8 y 300. En condiciones de estrés oxidativo este valor disminuye significativamente (Aoyama y Nakaki, 2013), como observamos al tratar los astrocitos con el reactivo de Fenton. De las antocianidinas estudiadas, cianidina a todas las concentraciones ensayadas, pelargonidina a las concentraciones de 5 y 25 μM y malvidina a la concentración más baja (5 μM), consiguieron restaurar los valores del índice redox, cuando las células fueron tratadas con un tóxico oxidante, no apreciándose diferencias significativas con el antioxidante utilizado como referencia, trolox.

Estas diferencias en el índice redox entre las concentraciones de malvidina y pelargonidina son equiparables al daño observado en la morfología celular mediante el microscopio de contraste de fases, pues los cultivos tratados con pelargonidina y

malvidina (5 y 25 μM) resultaron menos dañados por el tóxico. Se ha comprobado que la disminución en el ratio GSH/GSSG, induce una inhibición en la síntesis de GSH, y por tanto impide la unión a la mitocondria de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Cuando la proteína Bcl-2 no se une a la mitocondria, se libera el citocromo c, lo cual activa la vía p38 MAPK (Aoyama y Nakaki, 2013). Esto es importante ya que en enfermedades como la de Alzheimer y en enfermos con deterioro cognitivo leve, se ha comprobado que los niveles de GSH en eritrocitos se encuentran disminuidos (Petersen, 2000), así como el ratio GSH/GSSG, la SOD y la glutatión transferasa (Sultana y col., 2008).

En cuanto a los efectos de las antocianidinas sobre otras actividades enzimáticas, Shih y col. (2007), empleando células de hígado de rata (C9), valoraron positivamente su eficacia para inhibir el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , a través de la activación del enzima quinona oxidoreductasa (NQO1) y otras enzimas antioxidantes. Se ha observado además, que el factor de transcripción Nrf2, que estimula la transcripción de genes que codifican la síntesis de enzimas antioxidantes, es también inducido por la acción de la cianidina-3-glucósido en células endoteliales (Pascual-Teresa, 2014).

En este estudio se ha comprobado que las antocianidinas siguen un patrón de comportamiento diferente en cuanto a la activación del enzima NQO1. En un ensayo realizado sobre queratinocitos tratados con isocianato de sulforafano (un agonista de la activación del factor Nrf2), se observó que el tratamiento con cianidina 100 μM no inducía la activación del factor Nrf2, ni tampoco, la expresión enzimática de NQO1 (Ernst y col., 2012). En nuestro caso, solo se ve este efecto a la concentración de 25 μM .

A diferencia de lo que ocurre en otros sistemas enzimáticos implicados en la defensa antioxidante, pelargonidina, menos eficaz en otros casos, fue la antocianidina que mostró una mayor actividad NQO1, seguida de malvidina, en un modelo de toxicidad celular. En este caso, fue la cianidina la que mostró menor eficacia en la activación de este enzima. Este efecto podría explicarse por las diferencias estructurales existentes entre antocianidinas (Pascual-Teresa, 2014).

Por otra parte, entre los mecanismos implicados en la muerte celular, la activación de caspasas juega un papel importante. Está ampliamente demostrado que las ROS inducen la activación de caspasa 3, a través de la activación de las proteínas iniciadoras caspasas 8 y 9, promoviendo así la muerte celular por apoptosis (Kim y col., 2010). Por ello, en nuestro estudio, los astrocitos se sometieron a daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (500 μM), comprobándose que las antocianidinas son capaces de disminuir la activación tanto de caspasa 3 como de caspasa 8, inducida por el tóxico; si bien, no se consiguió una inhibición suficiente como para obtener valores de activación similares a los obtenidos en las células sin tratar. No se observó activación de la caspasa 9. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en ratones jóvenes (7 días) tratados durante 24 h con etanol, a los cuales se administraron previamente 100 mg/kg de antocianos extraídos de soja negra. En los animales tratados con antocianidinas, se observó una disminución significativa de la muerte neuronal por apoptosis provocada

por la activación de la vía de las caspasas (3, 8 y 9) (Shah y col., 2014). Igualmente se ha comprobado que el tratamiento con antocianidinas procedentes de soja negra, es capaz de inhibir la apoptosis en células prostáticas sometidas a estrés oxidativo (Jang y col., 2013).

Es conocido que una situación de excitotoxicidad en el cerebro (hipocampo) provoca un aumento del calcio intracelular, incremento en la liberación de ROS y disminución del potencial de membrana mitocondrial. Además, a nivel molecular, se induce la fosforilación y activación del complejo enzimático AMPK, aumento de BAX, disminución de la proteína Bcl-2, liberación del citocromo C de la mitocondria y activación de la caspasa 3. Pues bien, estudios muy recientes han comprobado que las antocianinas actúan a diferentes niveles disminuyendo la concentración de calcio intracelular (incrementada en el estrés oxidativo), la acumulación de ROS, la activación del AMPK y la apoptosis inducida por caspasa 3 (Ullah y col., 2014).

La no activación de caspasa 9 observada tanto en los astrocitos tratados exclusivamente con peróxido de hidrógeno, como en los sometidos a la acción de antocianidinas o trolox y posteriormente con tóxico oxidante, podría ser debida a que en la apoptosis inducida por el peróxido de hidrógeno, se activa la vía extrínseca y no la intrínseca. Según Garcimartín y col. (2014), el tratamiento de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, con una concentración de peróxido de hidrógeno de 400 μM , induce activación de la caspasa 3, a través de la activación de la caspasa iniciadora 8 (vía extrínseca).

Entre los procesos implicados en la neurodegeneración, la neuroinflamación juega un papel transcendental. Se caracteriza por la liberación de citocinas inflamatorias y otros mediadores de la inflamación, tras la activación de los astrocitos y células microgliales (Broussard y col., 2012). Algunos de estos mediadores son el NO, prostaglandinas, $\text{TNF}\alpha$, interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-10), factores de crecimiento ($\text{TGF}\beta$), etc. (Poulose y col., 2012). El tratamiento de astrocitos con IL-1 β , asociada o no con $\text{TNF}\alpha$ o IF γ , induce la activación del enzima iNOS, originando la liberación de NO, promotor de la inflamación.

Algunos estudios científicos han comprobado que determinados flavonoides son capaces de inhibir la actividad iNOS y por tanto, el proceso inflamatorio neuronal (Hämäläinen y col., 2007). Las antocianidinas en estudio, a todas las concentraciones ensayadas, mostraron un claro efecto inhibitor en la liberación de nitritos promovido por IFN γ , por lo que entre sus mecanismos de acción podría incluirse un efecto inhibitor de la actividad iNOS. Este mecanismo ha sido confirmado para pelargonidina, en macrófagos activados por LPS, al comprobar su capacidad para inhibir de forma dosis dependiente, la actividad y expresión de este enzima, a través de la inhibición de la activación de su factor de transcripción NF- κB (Hämäläinen y col., 2007). Por otra parte, Maldonado-Rojas y Olivero-Verdel (2012), realizaron un estudio sobre la afinidad de diferentes polifenoles bioactivos presentes en la dieta, por el enzima iNOS. Entre los polifenoles estudiados se observó que la cianidina-3-rutinósido y la malvidina-

3-galactósido presentaban mayor afinidad que los derivados de pelargonidina y delfinidina. Además, la cianidina como aglicona, presentó menor afinidad que los dos heterósidos anteriores, pero mayor que los derivados de pelargonidina. Así pues, esta gran afinidad por el enzima sugiere una posible inhibición del mismo, además de los estudios que demuestran la disminución de la actividad de los genes que codifican por este enzima. De hecho, Xia y col. (2014), demostraron en células musculares lisas, que la inducción de la expresión del ARNm del iNOS se reducía por el tratamiento de cianidina (10 μ M).

Como es sabido, entre las enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Parkinson es una de las de mayor prevalencia. A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios epidemiológicos que demuestran cómo su incidencia se incrementa con la edad (1903 afectados cada 100.000 habitantes en mayores de 80 años) (Pringsheim y col., 2014).

La sintomatología de la enfermedad está relacionada con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra*, debido en gran parte a la producción de ROS, bajos niveles de GSH y elevados niveles de hierro y calcio. También contribuyen los procesos de peroxidación lipídica originados por estrés oxidativo (Dias y col., 2013)

En situaciones normales, las concentraciones de dopamina (molécula muy inestable que puede auto oxidarse dando lugar a quinonas y radicales libres), están controladas por la MAO-A. Por el contrario, en situaciones de neurodegeneración, es la MAO-B, localizada en células gliales, la que toma protagonismo a la hora de controlar el metabolismo dopaminérgico (Dias y col., 2013). Por esta razón, procedimos a estudiar los posibles efectos que pudiesen tener las antocianidinas frente al daño inducido en astrocitos por la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Esta toxina se utiliza en cultivos celulares y en animales, para inducir alteraciones que emulan los procesos que ocurren en la enfermedad de Parkinson. En células gliales (astrocitos y microglía) se transforma en MPP⁺ (su metabolito activo) por acción de la MAO-B y, de esta forma, accede a las neuronas dopaminérgicas empleando el transportador de dopamina. En el interior de las neuronas inhibe el complejo I de la cadena de transporte mitocondrial, dando lugar a la generación de ROS. El aumento de ROS produce una disminución de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, translocación de las proteínas Bcl2, aumento de los niveles del citocromo C en el citosol y por último, activación de la caspasa 3, la cual induce apoptosis y muerte neuronal (Park y col., 2013).

El empleo de MPTP como herramienta farmacológica se debe a su consumo accidental por heroinómanos. Se observó que jóvenes adictos a la heroína desarrollaban un cuadro sintomatológico (parkinsonismo) caracterizado por temblor, acinesia, rigidez, postura en flexión, alteración de reflejos posturales y tendencia al sigilo, que revertía con la administración de L-DOPA o agonistas dopaminérgicos (Alarcón y col., 2010).

En el presente trabajo se ha comprobado que el pretratamiento con las antocianidinas protege significativamente frente al daño inducido por MPTP en astrocitos. Este posible efecto beneficioso corrobora en cierta forma los resultados obtenidos por Roghani y col. (2010), para pelargonidina. Estos autores demostraron que la administración de pelargonidina, por vía oral (10-20 mg/kg), a ratas tratadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) mediante inyección intraestriatal unilateral, disminuía de forma dosis dependiente, algunos de los síntomas relacionados con el Parkinson (test rotacional inducido por apomorfina). Comprobaron además una disminución significativa de los niveles de TBARS, marcador de la peroxidación lipídica. Por el contrario, no se observaron modificaciones significativas en los niveles de SOD, nitritos y radicales libres, anormalmente alterados por 6-OHDA.

También se ha demostrado que pelargonidina (1-3 μ M) y otros polifenoles, ejercen un efecto neuroprotector frente al daño inducido por 5-S-cisteinil dopamina, compuesto utilizado para provocar parkinsonismo (Vauzour y col., 2008a).

Por todo lo expuesto anteriormente, se puede considerar que las antocianidinas cianidina, malvidina y pelargonidina ejercen un efecto protector frente al daño oxidativo inducido en astrocitos. No obstante, la magnitud del efecto es diferente como consecuencia de sus diferencias estructurales, principalmente relacionadas con la existencia o no de grupos fenólicos libres.

Aunque los resultados son alentadores, aún queda mucho por investigar tanto mediante nuevos ensayos *in vitro*, como también mediante estudios en animales o a través de la realización de ensayos clínicos en el hombre.

De todo lo expuesto anteriormente, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un estudio de la actividad neuroprotectora de *Lens culinaris* Medik cv. Rubia de la Armuña y *Phaseolus vulgaris* L cv. Tolosana, crudas y procesadas, así como del efecto neuroprotector y mecanismo de acción de algunas antocianidinas presentes en las leguminosas estudiadas. La investigación se llevó a cabo sobre astrocitos en cultivo (U373 MG) utilizándose modelos de estrés oxidativo inducidos por el reactivo de Fenton (H_2O_2 1 mM/ SO_4Fe 0,5 mM) o por el H_2O_2 (500 μM).

Los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la investigación, permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Las leguminosas crudas y procesadas contienen un elevado porcentaje de compuestos fenólicos. Se observan diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre ellas. En las muestras de judías crudas los compuestos mayoritarios son las antocianinas y en las lentejas las proantocianidinas. La cocción favorece la presencia de productos de la hidrólisis, mientras que la germinación origina nuevos compuestos derivados de procesos enzimáticos.
2. Las leguminosas en estudio tanto crudas como procesadas demuestran poseer una marcada actividad antioxidante mediante los ensayos de ORAC y DPPH. Además, son capaces de reducir *in vitro* el estrés oxidativo inducido por el reactivo de Fenton. Esta aseveración se hace patente por el aumento significativo en la viabilidad celular y por la reducción significativa en el porcentaje de liberación de ROS inducido por el tóxico.
3. En los estudios de correlación se observa que uno de los grupos de polifenoles que pueden participar en mayor medida en la actividad antioxidante, son las antocianidinas. Por ello, se procedió al estudio de la actividad de dichos compuestos:
 - 3.1. Cianidina, malvidina y pelargonidina no presentan toxicidad sobre los astrocitos en cultivo.
 - 3.2. Se observa una mejora en los cambios morfológicos celulares causados por el reactivo de Fenton.
 - 3.3. Las antocianidinas en estudio muestran una actividad antioxidante similar al compuesto de referencia trolox, siendo la cianidina la que manifiesta una mejor actividad (aproximadamente siete veces mayor que la sustancia de referencia).
 - 3.4. Los compuestos estudiados previenen la disminución de la viabilidad celular provocada por el tóxico oxidante.

3.5. Así mismo las tres antocianidinas, a todas las concentraciones estudiadas, reducen la liberación de ROS inducida por el reactivo de Fenton.

3.6. Sobre los marcadores de citotoxicidad celular, las antocianidinas disminuyen el efecto citotóxico inducido por el tóxico, tal y como mostraron los resultados obtenidos en la liberación de la LDH y los marcadores de peroxidación lipídica (TBARS Y MDA).

3.7. Las antocianidinas no favorecen la actividad catalasa, pero por el contrario, si facilitan la actividad del resto de enzimas antioxidantes y del índice redox. No obstante se observan diferencias en el caso del enzima NQO1 cuya actividad es significativamente inferior en el caso de la cianidina, mientras que en el caso de la GPx, es la pelargonidina la que muestra una menor actividad enzimática.

3.8. En un modelo de toxicidad celular inducido por H₂O₂ (500 μM), las antocianidinas en estudio previenen la muerte por apoptosis debido a que disminuyen la actividad caspasa 3 en las células en cultivo. La disminución de esta actividad caspasa se produce a través de la vía extrínseca. Esta aseveración se demuestra por un aumento en la actividad caspasa 8 del tóxico oxidante, la cual fue reducida por los compuestos en estudio. La actividad caspasa 9 (vía intrínseca) se mantiene a niveles basales.

3.9. Las antocianidinas estudiadas son capaces de prevenir la liberación de nitritos al medio inducidos por IFγ.

3.10. En un modelo de Parkinsonismo inducido por MPTP, cianidina, malvidina y pelargonidina son capaces de prevenir parcialmente el daño inducido por este agente en astrocitos.

Las leguminosas, por su elevado valor nutritivo, constituyen uno de los principales ingredientes de la Dieta Mediterránea. Nuestros resultados evidencian posibles beneficios para la preservación de determinadas células del SNC. Consideramos necesaria la ampliación de los estudios realizados, mediante ensayos *in vivo* y la valoración de su eficacia en el hombre. Proponemos además, nuevas investigaciones en el diseño de procedimientos de procesado que minimicen los efectos negativos que puedan ocasionar los tratamientos sobre el contenido fenólico, y la búsqueda de variedades y cultivares de Leguminosas para su consumo en alimentación, que posean un mayor contenido en antocianidinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera Y, Estrella I, Benítez V, Esteban RM, Martín-Cabrejas MA. Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International* 2011; 44(3): 774-780.
- Ajith TA, Jayakumar TG. Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World Journal of Cardiology* 2014; 6(10): 1091-1099.
- Alarcón A, Santamaría del Ángel A, Königsberg M. Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica* 2010; 29(3): 92-100.
- Álvarez-Lario B, Macarrón-Vicente J. Is there anything good in uric acid? *QJM: An International Journal of Medicine* 2011; 104(12): 1015-1024.
- Amarowicz R, Pegg RB. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2008; 110(10): 865-878.
- Ameigeiras E, Gil-Loyzaga PE. Criopreservación de células y tejidos. En: Gil-Loyzaga PE. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Ed. Visión libros, Madrid 2011; pp. 103-110.
- Andrés-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventós RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience* 2005; 8(12): 111-120.
- Aoyama K, Matsubara K, Kobayashi S. Aging and oxidative stress in progressive supranuclear palsy. *European Journal of Neurology* 2006; 13(1): 89-92.
- Aoyama K, Nakaki T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Science* 2013; 14(10): 21021-21044.
- Aparicio-Fernández X, Reynoso-Camacho R, Castaño-Tostado E, García-Gasca T, González de Mejía E, Guzmán-Maldonado SH, Elizondo G, Yousef GG, Lila MA, Loarca-Pina G. Antiradical capacity and induction of apoptosis on HeLa cells by a *Phaseolus vulgaris* extract. *Plant Foods for Human Nutrition* 2008; 63(1): 35-40.
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5: 196.
- Armstrong RA. What causes Alzheimer's disease?. *Folia Neuropathologica* 2013; 51(3): 169-188.
- Azzouzi S, Zaabat N, Medjroubi K, Akkal S, Benlabeled K, Smati F, Dijoux-Franca MG. Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* L.(Fabaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2014; 7(Suppl. 1): S481-S484.

- Balendra R, Jones A, Jivraj N, Steen IN, Young CA, Shaw PJ, Turner MR, Leigh PN, Al-Chalabi A; UK-MND LiCALS Study Group, Mito Target ALS Study Group. Use of clinical staging in amyotrophic lateral sclerosis for phase 3 clinical trials. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2014; doi: 10.1136/jnnp-2013-306865.
- Barja de Quiroga G, López-Torres M, Pérez-Campo R. Catalase is needed to avoid tissue peroxidation in *Rana perezi* in normoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1989; 94(2): 391-398.
- Barja de Quiroga G, Pérez-Campo R, López-Torres M. Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *The Biochemical Journal* 1990; 272(1): 247-250.
- Barros D, Amaral OB, Izquierdo I, Geracitano L, Bassols Raseira MC, Henriques AT, Ramirez MR. Behavioral and genoprotective effects of *Vaccinium* berries intake in mice. *Pharmacology and Biochemistry Behavioral* 2006; 84(2): 229-234.
- Bartolomé B, Estrella MI, Hernández T. Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A (Berlin)* 1997; 205: 290-294.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. *Food Chemistry* (4th extended and revised edition). Chemical composition of legumes. Ed. Springer, 2011; p. 748.
- Bhat NR, Feinstein DL, Shen Q, Bhat AN. P38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(33): 29584-29592.
- Bielen A, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14(3): 6382-6413.
- Bigford GE, Del Rossi G. Supplemental substances derived from foods as adjunctive therapeutic agents for treatment of neurodegenerative diseases and disorders. *Advances in Nutrition* 2014; 5(4): 394-403.
- Bolton C, Wood EG, Scott GS, Flower RJ. A comparative evaluation of the response to peroxynitrite by a brain endothelial cell line and control of the effects by drug targeting. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2009; 29(5): 707-717.
- Boudjou S, Oomah BD, Zaidi F, Hosseinian F. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry* 2013; 138(2-3): 1543-1550.

- Bourre JM. Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 1: micronutrients. *The Journal of Nutrition Health & Aging* 2006; 10(5): 377-385.
- Broussard GJ, Mytar J, Li RC, Klapstein GJ. The role of inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology* 2012; 20(3): 109-126.
- Bruneton J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Edición.* Ed. Acribia 2001; pp. 308-312, 351-363.
- Castellani RJ, Perry G. The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease. *Biochemical Pharmacology* 2014; 88(4): 671-676.
- CGCOF (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos). *Catálogo de Plantas Medicinales.* Madrid, España, 2011; pp. 201-202.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004; 61(2): 192-208.
- Chen G, Bower KA, Xu M, Ding M, Shi X, Ke ZJ, Luo J. Cyanidin-3-glucoside reverses ethanol-induced inhibition of neurite outgrowth: role of glycogen synthase kinase 3 Beta. *Neurotoxicity Research* 2009; 15(4): 321-331.
- Chen J, Yan AL, Lam KY, Lam CT, Li N, Yao P, Xiong A, Dong TT, Tsim KW. A chemically standardized extract of *Ziziphus jujuba* fruit (Jujube) stimulates expressions of neurotrophic factors and anti-oxidant enzymes in cultured astrocytes. *Phytotherapy Research* 2014; 28(11): 1727-1730.
- Cho N, Lee KY, Huh J, Choi JH, Yang H, Jeong EJ, Kim HP, Sung SH. Cognitive-enhancing effects of *Rhus verniciflua* bark extract and its active flavonoids with neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 58: 355-361.
- Choo XY, Alukaidey L, White AR, Grubman A. Neuroinflammation and copper in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2013; 2013:145345. doi: 10.1155/2013/145345.
- Cisneros Prego E. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [online]* 1995; 14(1).
- Crews WD Jr, Harrison DW, Griffin ML, Addison K, Yount AM, Giovenco MA, Hazell J. A double-blinded, placebo-controlled, randomized trial of the neuropsychologic efficacy of cranberry juice in a sample of cognitively intact older adults: pilot study findings. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2005; 11(2): 305-309.

- Czank C, Cassidy A, Zhang Q, Morrison DJ, Preston T, Kroon PA, Botting NP, Kay CD. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13) C-tracer study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2013; 97(5): 995-1003.
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Science* 2010; 11(4): 1321-1342.
- Da Rocha MD, Viegas FP, Campos HC, Nicastro PC, Fossaluzza PC, Fraga CA, Barreiro EJ, Viegas CJr. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* 2011; 10(2): 251-270.
- Dávila MA, Sangronis E, Granito M. Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2003; 53(4): 348-354.
- Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease* 2013; 3(4): 461-491.
- Dizdaroglu M. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. En: *DNA and free radicals* (Halliwell B, Amoma OI). Ellis Harwood Ltd. Chichester, Reino Unido 1993; pp. 19-39.
- Dorado Martínez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 2003; 46 (6): 229:235.
- Dreiseitel A, Oosterhuis B, Vukman KV, Schreier P, Oehme A, Locher S, Hajak G, Sand PG. Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for the efflux transporters BCRP and MDR1. *British Journal of Pharmacology* 2009; 158(8): 1942-1950.
- Dreiseitel A, Schreier P, Oehme A, Locher S, Rogler G, Piberger H, Hajak G, Sand PG. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochemical and Biophysics Research Communication* 2008; 372(1): 57-61.
- Dueñas M, Hernández T, Estrella I, Fernández D. Germination as a process to increase the polyphenols content and antioxidant activity of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) *Food Chemistry* 2009; 117(4): 599-607.
- Dueñas M, Hernández T, Estrella I. Assessment *in vitro* antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic content. *Food Chemistry* 2006; 98(1): 95-103.
- Dueñas M, Fernández D, Hernández T, Estrella I, Muñoz R. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.). Modifications by fermentation with natural

microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. Journal of Science of Food and Agriculture 2005; 85: 297-304.

Dueñas M, Sun B, Hernández T, Estrella I, Spranger MI. Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003; 51(27): 7999-8004.

Dueñas M, Hernández T, Estrella I. European Conference: Bioactive compounds in plant foods. Health Effects and Perspectives for the Food Industry. Tenerife, España 2001; pp. 75-177.

Dumont M, Wille E, Stack C, Calingasan NY, Beal MF, Lin MT. Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. The FASEB Journal 2009; 23(8): 2459-2466.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to anthocyanins from *Ribes nigrum* L. and improvement of visual adaptation to the dark (ID 2750) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011; 9(6): 2204.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2204.pdf> [acceso 13-04-2015].

Ellinger S, Gordon A, Kürten M, Jungfer E, Zimmermann BF, Zur B, Ellinger J, Marx F, Stehle P. Bolus consumption of a specifically designed fruit juice rich in anthocyanins and ascorbic acid did not influence markers of antioxidative defense in healthy humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2012; 60(45): 11292-11300.

EMA (2010a), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Community herbal monograph on *Ribes nigrum* L., folium.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2010/07/WC500094130.pdf [acceso 13-04-2015].

EMA (2010b), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Community herbal monograph on *Vitis vinifera* L., folium.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2011/01/WC500100391.pdf [acceso 13-04-2015].

Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. JAMA 2002; 287(24): 3223-3229.

Ergin V, Hariry RE, Karasu C. Carbonyl stress in aging process: role of vitamins and phytochemicals as redox regulators. Aging and Disease 2013; 4(5): 276-294.

Ernst IM, Wagner AE, Huebbe P, Rimbach G. Cyanidin does not affect sulforaphane-mediated Nrf2 induction in cultured human keratinocytes. The British Journal of Nutrition 2012; 107(3): 360-363.

- Fang J. Some anthocyanins could be efficiently absorbed across the gastrointestinal mucosa: Extensive presystemic metabolism reduces apparent bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014; 62(18): 3904-3911.
- Faria A, Meireles M, Fernández Y, Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, de Freitas V, Mateus N, Calhau C. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chemistry* 2014; 149: 190-196.
- Felgines C, Talavera S, Texier O, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C. Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(20): 7721-7727.
- Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, Mann GE, Radi R, Roberts LJ 2nd, Vina J, Davies KJ. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radical Biology & Medicine* 2015; 78: 233-235.
- Frank T, Netzel M, Strass G, Bitsch R, Bitsch I. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2003; 81(5): 423-435.
- Frías J, Fernández-Orozco R, Zielinski H, Piskula M, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. Effect of germination on the content of vitamins C and E of lentils. *Polish Journal of Food and Nutritional Sciences* 2002; 11(52): 76-78.
- Frühbeck G, Monreal I, Santidrian S. Hormonal implications of the hypocholesterolemic effect of intake of field beans (*Vicia faba* L.) by young men with hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition* 1997; 66(6): 1452-1460.
- Gao X, Cassidy A, Schwarzschild MA, Rimm EB, Ascherio A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* 2012; 78(15): 1138-1145.
- Garcia-Ruiz PJ, Chaudhuri KR, Martinez-Martin P. Non-motor symptoms of Parkinson's disease A review...from the past. *Journal of the Neurological Sciences* 2014; 338(1-2): 30-33.
- Garcimartín A, Merino JJ, González MP, Sánchez-Reus MI, Sánchez-Muñiz FJ, Bastida S, Benedí J. Organic silicon protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide effects. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014; 14: 384.
- Geil PB, Anderson JN. Nutrition and health implications on dry beans: a review. *Journal of the American College of Nutrition* 1994; 13(6): 549-558.

- Girón N. Compuestos diterpénicos moduladores de la respuesta inflamatoria y de la apoptosis. Departamento de Farmacología, Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral, 2008; pp. 35-36.
- Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29(8): 2545-2552.
- Gradinaru D, Minn AL, Artur Y, Minn A, Heydel JM. Effect of oxidative stress on UDP-glucuronosyltransferases in rat astrocytes. *Toxicology Letters* 2012; 213(3): 316-324.
- Groß F, Durner J, Gaupels F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* 2013; 4: 419.
- Grotto D, Santa María LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, García SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; 43(2): 619-624.
- Guajardo-Flores D, Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 2013; 141(2): 1497-1503.
- Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, Rubin MA, Schmatz R, da Silva CR, de P Cognato G, Farias JG, Signor C, Morsch VM, Mazzanti CM, Bogo M, Bonan CD, Spanevello R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sciences* 2014; 96(1-2): 7-17.
- Gutteridge JM, Stocks J. Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1981; 14(4): 257-329.
- Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging* 2001; 18(9): 685-716.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1993; 57(5 Suppl): 715S-725S.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990; 280(1): 1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in Biology and Medicine*. 2ª Edición. Oxford: Clarendon Press, 1989.

Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation* 2007; 2007: 45673. doi: 10.1155/2007/45673.

Harrison FE, May JM. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 46(6): 719-730.

Hassimotto NM, Lajolo FM. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011; 91(3): 523-531.

Heo HJ, Lee CY. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(6): 1984-1989.

Hewett SJ, Corbett JA, McDaniel ML, Choi DW. Interferon-gamma and interleukin-1 beta induce nitric oxide formation from primary mouse astrocytes. *Neuroscience Letters* 1993; 164(1-2): 229-232.

Hirsch EC, Breidert T, Rousset E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 991: 214-228.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 1976; 74(1): 214-226.

Holgado M, Luis JM de, Macías JF. Características de los radicales libres. *Revista Española de Geriatria y Gerontología* 1994; 29(3): 155-167.

Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Chao CC. Differential regulation by cytokines of human astrocyte nitric oxide production. *Glia* 1995; 15(4): 491-494.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(6): 1841-1856.

Inglese M, Petracca M. Imaging multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *Prion* 2013; 7(1): 47-54.

Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?. *The Journal of Clinical Investigation* 2003; 111(2): 163-169.

IUPAC. *Pure and Applied Chemistry*. 2000; pp. 72, 437-446.

- Jang H, Bae WJ, Kim SJ, Yuk SM, Han DS, Ha US, Hwang SY, Yoon SH, Wang Z, Kim SW. The effect of anthocyanin on the prostate in an andropause animal model: rapid prostatic cell death by apoptosis is partially prevented by anthocyanin supplementation. *The World Journal of Mens Health* 2013; 31(3): 239-246.
- Jeong JW, Lee WS, Shin SC, Kim GY, Choi BT, Choi YH. Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B and Akt/MAPKs signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14(1): 1502-1515.
- Jia Z, Zhu H, Li Y, Misra HP. Cruciferous nutraceutical 3H-1,2-dithiole-3-thione protects human primary astrocytes against neurotoxicity elicited by MPTP, MPP⁺, 6-OHDA, HNE and acrolein. *Neurochemical Research* 2009; 34(11): 1924-1934.
- Jing P, Zhao S, Ruan S, Sui Z, Chen L, Jiang L, Qian B. Quantitative studies on structure-ORAC relationships of anthocyanins from eggplant and radish using 3D-QSAR. *Food Chemistry* 2014; 145: 365-371.
- Jódar-Montilla L. Papel de la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1(NQO1) en el control del crecimiento de las células animales. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 2010.
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2010; 345(1-2): 91-104.
- Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D, Fisher DR, Shukitt-Hale B. Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mechanisms of Ageing and Development* 2000; 116(2-3): 141-153.
- Karolczak D, Sawicka E, Dorszewska J, Radel A, Bodnar M, Błaszczuk A, Jagielska J, Marszałek A. Memantine - neuroprotective drug in aging brain. *Polish Journal of Pathology* 2013; 64(3): 196-203.
- Kaur R, Kaur J, Mahajan J, Kumar R, Arora S. Oxidative stress-implications, source and its prevention. *Environmental Science and Pollution Research International* 2014; 21(3): 1599-1613.
- Ke Z, Liu Y, Wang X, Fan Z, Chen G, Xu M, Bower KA, Frank JA, Ou X, Shi X, Luo J. Cyanidin-3-glucoside ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing brain. *Journal of Neuroscience Research* 2011; 89(10): 1676-1684.
- Khan MB, Khan MM, Khan A, Ahmed ME, Ishrat T, Tabassum R, Vaibhav K, Ahmad A, Islam F. Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDCI) caused by the intracerebroventricular-streptozotocin in rat model. *Neurochemistry International* 2012; 61(7): 1081-1093.

- Khanna P, Nehru B. Antioxidant enzymatic system in neuronal and glial cells enriched fractions of rat brain after aluminum exposure. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2007; 27(7): 959-969.
- Kim MS. Korean red Ginseng tonic extends lifespan in *D. melanogaster*. *Biomolecules & Therapeutics* (Seoul) 2013; 21(3): 241-245.
- Kim SM, Chung MJ, Ha TJ, Choi HN, Jang SJ, Kim SO, Chun MH, Do SI, Choo YK, Park YI. Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via activation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Science* 2012a; 90(21-22): 874-882.
- Kim YK, Yoon HH, Lee YD, Youn DY, Ha TJ, Kim HS, Lee JH. Anthocyanin extracts from black soybean (*Glycine max* L.) protect human glial cells against oxygen-glucose deprivation by promoting autophagy. *Biomolecules & Therapeutics* (Seoul) 2012b; 20(1): 68-74.
- Kim HG, Ju MS, Shim JS, Kim MC, Lee SH, Huh Y, Kim SY, Oh MS. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *The British Journal of Nutrition* 2010; 104(1): 8-16.
- Kingman SM. The influence of legume seed on human plasma lipid concentration. *Nutrition Research Reviews* 1991; 4(1): 97-123.
- Kite GC, Rowe ER, Lewis GP, Veitch NC. Acylated flavonol tri- and tetraglycosides in the flavonoid metabolome of *Cladrastis kentukea* (Leguminosae). *Phytochemistry* 2011; 72(4-5): 372-384.
- Kite GC, Veitch NC, Boalch ME, Lewis GP, Leon CJ, Simmonds MS. Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of *Fructus Sophorae* and *Flos Sophorae*. *Phytochemistry* 2009; 70(6): 785-794.
- Kleinkauf-Rocha J, Bobermin LD, Machado P de M, Gonçalves CA, Gottfried C, Quincozes-Santos A. Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2013; 31(3): 165-170.
- Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods* 1987; 20(1): 83-90.
- Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58(7): 3996-4000.
- Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *Journal of Controlled Release* 2002; 78(1-3): 43-54.

- Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 2014; 115: 157-188.
- Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *The FASEB Journal* 2010; 24(7): 2533-2545.
- Li P, Ding G, Deng Y, Punyapitak D, Li D, Cao Y. Determination of malondialdehyde in biological fluids by high-performance liquid chromatography using rhodamine B hydrazide as the derivatization reagent. *Free Radical Biology & Medicine* 2013; 65: 224-231.
- Li Q, Li C, Mahtani HK, Du J, Patel AR, Lancaster JR Jr. Nitrosothiol formation and protection against Fenton chemistry by nitric oxide-induced dinitrosyliron complex formation from anoxia-initiated cellular chelatable iron increase. *The Journal of Biological Chemistry* 2014; 289(29): 19917-19927.
- Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E y Guevara J. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico* 2010; 34: 143-154.
- Lin LZ, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL. The polyphenolic profiles of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 2008; 107(1): 399-410.
- Lin PY, Lai HM. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(11): 3807-3814.
- López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 2013; 138(1): 547-555.
- López-Amorós ML. Estudio de la composición fenólica en legumbres. Influencia de la variedad y del proceso de germinación. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2000.
- López-Amorós ML, Hernández T, Estrella I. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006; 19(4): 277-283.
- López-Amorós ML, Estrella I, Hernández T. 3º European Conference on grain Legumes (AEP) Valladolid, España, 1998; pp. 190.
- Machado CM, Ferruzzi MG, Nielsen SS. Impact of the hard-to-cook phenomenon on phenolic antioxidants in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56(9): 3102-3110.

Maldonado-Rojas W, Olivero-Verbel J. Food-related compounds that modulate expression of inducible nitric oxide synthase may act as its inhibitors. *Molecules* 2012; 17(7): 8118-8135.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 81(suppl 1): 230S- 242S.

Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology* 2006; 2(12): 679-689.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 1974; 47(3): 469-474.

Martin Andrés A, Luna del Castillo JD. *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Ed. Norma. 2ª edición, Madrid, 1989; pp. 263-263.

Martin-Carrasco M. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica. *Psicogeriatría* 2009; 1(2): 101-114.

Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *British Journal of Pharmacology* 2003; 139(6): 1095-1102.

Martín S, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Protective effects of Merlot red wine extract and its major polyphenols in PC12 cells under oxidative stress conditions. *Journal of Food Science* 2013; 78(1): H112-H118.

Martín S, Gómez-Serranillos P, Carretero ME, Naval MA, Ortega T, Villar AM. Estudio de la actividad neuroprotectora de vinos monovarietales (C. de Madrid). *Revista de Fitoterapia* 2006; 6 (2): 167-169.

Massaad CA, Washington TM, Pautler RG, Klann E. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106(32): 13576-13581.

Matsumoto H, Ichiyanagi T, Iida H, Ito K, Tsuda T, Hirayama M, Konishi T. Ingested delphinidin-3-rutinoside is primarily excreted to urine as the intact form and to bile as the methylated form in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(2): 578-582.

McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51(16): 4539-4548.

- Milbury PE, Kalt W. Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood-brain barrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58(7): 3950-3956.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science Technology* 2004; 26(2): 211-219.
- Monagas M, Nuñez V, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo and Cabernet-Sauvignon wines produced in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 2003; 54(3): 163-169.
- Moriwaki H, Osborne MR, Phillips DH. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicology In Vitro* 2008; 22(1): 36-44.
- Möller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological section. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 1998; 248(3): 111-122.
- Muñoz-Fuentes RM, Vargas F, Bobadilla NA. Assay validation for determining nitrites and nitrates in biological fluids. *Revista de Investigación Clínica* 2003; 55(6): 670-676.
- Namiesnik J, Vearasilp K, Nemirovski A, Leontowicz H, Leontowicz M, Pasko P, Martinez-Ayala AL, González-Aguilar GA, Suhaj M, Gorinstein S. *In vitro* studies on the relationship between the antioxidant activities of some berry extracts and their binding properties to serum albumin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014. PubMed PMID: 24449373.
- Niranjan R, Rajasekar N, Nath C, Shukla R. The effect of guggulipid and nimesulide on MPTP-induced mediators of neuroinflammation in rat astrocytoma cells, C6. *Chemico-Biological Interactions* 2012; 200(2-3): 73-83.
- Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Research* 1974; 77(3): 507-512.
- Ortega-Molina A, Lopez-Guadamillas E, Mattison JA, Mitchell SJ, Muñoz-Martin M, Iglesias G, Gutierrez VM, Vaughan KL, Szarowicz MD, González-García I, López M, Cebrián D, Martinez S, Pastor J, de Cabo R, Serrano M. Pharmacological inhibition of PI3K reduces adiposity and metabolic syndrome in obese mice and Rhesus monkeys. *Cell Metabolism* 2015; pii: S1550-4131(15)00069-8. doi: 10.1016/j.cmet. 2015.02.017.
- Owolabi L. Progressive supranuclear palsy misdiagnosed as Parkinson's disease: a case report and review of literature. *Annals of Medicine and Health Sciences Research* 2013; 3(Suppl 1): S44-S47.

- Paixão J, Dinis TC, Almeida LM. Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an *in vitro* approach. *Apoptosis* 2011; 16(10): 976-989.
- Pappas E, Schaich KM. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2009; 49(9): 741-781.
- Park G, Park YJ, Yang HO, Oh MS. Ropinirole protects against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in mice via anti-apoptotic mechanism. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2013; 104: 163-168.
- Pascual-Teresa S. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; 559: 68-74.
- Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(18): 7029-7034.
- Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296(3): 631-636.
- Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, Zuo Y, Liu Y, Lei L, Ma KY, Huang Y, Chen ZY. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International* 2014; 2014:831841. doi: 10.1155/2014/831841.
- Persky V, Van Horn L. Epidemiology of soy and cancer: Perspectives and directions. *Journal of Nutrition* 1995; 125(3): 709-712.
- Peskin AV, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta* 2000; 293(1-2): 157-166.
- Petersen RC. Mild cognitive impairment: transition between aging and Alzheimer's disease. *Neurologia* 2000; 15(3): 93-101.
- Poirier J. Cuadernos de Histología nº1. Ed. Marban 1985; pp. 151-154.
- Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 1999; 6(2): 99-104.
- Poulose SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, Schauss AG, Shukitt-Hale B. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012; 60(4): 1084-1093.

- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders* 2014; doi: 10.1002/mds.25945.
- Prior RL, Wu X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research* 2006; 40(10): 1014-1028.
- Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Analytical Biochemistry* 1988; 169(2): 328-336.
- Quintanilla R, Orellana J, Von Bernhardt R. Understanding risk factors for Alzheimer's disease: interplay of neuroinflammation, connexin-based communication and oxidative stress. *Archives of Medical Research* 2012; 43(8): 632-644.
- Ramírez-Jiménez AK, Reynoso-Camacho R, Mendoza-Díaz S, Loarca-Piña G. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chemistry* 2014; 161: 254-260.
- Randhir R, Kwon YI, Shetty K. Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2007; 9(3): 355-364.
- Ranilla LG, Genovese MI, Lajolo FM. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57(13): 5734-5742.
- Ranilla LG, Genovese MI, Lajolo FM. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55(1): 90-98.
- Rao AV, Sung MK. Saponins as anticarcinogens. *Journal of Nutrition* 1995; 125(3 suppl): 717S-724S.
- Rendeiro C, Vauzour D, Kean RJ, Butler LT, Rattray M, Spencer JP, Williams CM. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology* 2012; 223(3): 319-330.
- Robert SM, Ogunrinu-Babarinde T, Holt KT, Sontheimer H. Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. *Neurochemistry International* 2014; 73: 181-191.
- Roghani M, Niknam A, Jalali-Nadoushan MR, Kiasalari Z, Khalili M, Baluchnejadmojarad T. Oral pelargonidin exerts dose-dependent neuroprotection in 6-

hydroxydopamine rat model of hemi-parkinsonism. *Brain Research Bulletin* 2010; 82(5-6): 279-283.

Rossi S, De Chiara V, Furlan R, Musella A, Cavasinni F, Muzio L, Bernardi G, Martino G, Centonze D. Abnormal activity of the Na/Ca exchanger enhances glutamate transmission in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behavior and Immunity* 2010; 24(8): 1379-1385.

Sánchez-Moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 2002; 8(3): 121-137.

Sandoval-Acuña C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014 May 27. pii: S0003-9861(14)00174-X.

Scheiber IF, Schmidt MM, Dringen R. Zinc prevents the copper-induced damage of cultured astrocytes. *Neurochemistry International* 2010; 57(3): 314-322.

Schippers PG, Prop FJ. Delphinidin- and cyanidin-chlorides, promoters of cell aggregation *in vitro*. *Cell Biology International Reports* 1978; 2(3): 231-235.

Shah SA, Yoon GH, Kim MO. Protection of the developing brain with anthocyanins against ethanol-induced oxidative stress and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 2014 Jul 6. PubMed PMID: 24997566.

Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55(23): 9427-9435.

Shim SH, Kim JM, Choi CY, Kim CY, Park KH. *Ginkgo biloba* extract and bilberry anthocyanins improve visual function in patients with normal tension glaucoma. *Journal of Medicinal Food* 2012; 15(9): 818-823.

Siddhuraju, P. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chemistry* 2006; 99(1): 149-157.

Siegel D, Kepa JK, Ross D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1(NQO1) localizes to the mitotic spindle in human cells. *PLoS One* 2012; 7(9): e44861.

Simmons ML, Murphy S. Cytokines regulate L-arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. *European Journal of Neuroscience* 1993; 5(7): 825-831.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 1999; 299: 152-178.

- Smith AD, Levander OA. High-throughput 96-well microplate assays for determining specific activities of glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* 2002; 347: 113-121.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinonic acid. *Analytical Biochemistry* 1985; 150(1): 76-85.
- Song J, Zhao M, Liu X, Zhu Y, Hu X, Chen F. Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 58: 306-310.
- Speciale A, Canali R, Chirafisi J, Saija A, Virgili F, Cimino F. Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF α -induced endothelial dysfunction: Involvement of nuclear factor-KB signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58(22): 12048-12054.
- Spencer JP. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proceedings of the Nutrition Society* 2010; 69(2): 244-260.
- Static. El Estado del arte de la enfermedad de Alzheimer en España. http://static.correofarmaceutico.com/docs/2013/06/18/in_al.pdf. 23-1-2014.
- Steinbrenner H, Sies H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2013; 536(2): 152-157.
- Strathearn KE, Yousef GG, Grace MH, Roy SL, Tambe MA, Ferruzzi MG, Wu QL, Simon JE, Lila MA, Rochet JC. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Research* 2014; 1555: 60-77.
- Sueishi Y, Ishikawa M, Yoshioka D, Endoh N, Oowada S, Shimmei M, Fujii H, Kotake Y. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of cyclodextrin-solubilized flavonoids, resveratrol and astaxanthin as measured with the ORAC-EPR method. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2012; 50(2): 127-132.
- Sultana R, Piroddi M, Galli F, Butterfield DA. Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochemical Research* 2008; 33(12): 2540-2546.
- Suzuki T. Nitrosation of uric acid induced by nitric oxide under aerobic conditions. *Nitric Oxide Biology and Chemistry* 2007; 16(2): 266-273.

- Takahashi S, Abe T, Gotoh J, Fukuichi Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry International* 2002; 40: 441-448.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 2004; 72(2): 111-127.
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Bensson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(10): 3902-3908.
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Bensson C, Manach C, Lamaison JL, Remesy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of Nutrition* 2004; 134(9): 2275-2279.
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Bensson C, Manach C, Lamaison JL, Remesy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *Journal of Nutrition* 2003; 133(12): 4178-4182.
- Tavasoli S, Zarnani AH, Vafa M, Moradi-Lakeh M, Pazoki-Toroudi H, Eghtesadi S. The effect of pomegranate extract on survival and peritoneal bacterial load in cecal ligation and perforation model of sepsis in rats. *International Journal of Preventive Medicine* 2014; 5(1): 104-109.
- Tian Q, Giusti MM, Stoner GD, Schwartz SJ. Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(4): 1467-1472.
- Tichauer J, Saud K, von Bernhardt R. Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14(3-4): 168-174.
- Tiwari V, Guan Y, Raja SN. Modulating the delicate glial-neuronal interactions in neuropathic pain: Promises and potential caveats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2014; 45: 19-27.
- Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology & Medicine* 2011; 51(5): 1000-1013.
- Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1792(7): 643-650.
- Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition Food Research* 2012; 59: 159-170.
- Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry* 2005; 93: 713-718.

- Ullah I, Park HY, Kim MO. Anthocyanins protect against kainic acid-induced excitotoxicity and apoptosis via ROS-activated AMPK pathway in hippocampal neurons. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2014; 20(4): 327-338.
- Urbano G, López-Jurado M, Frejnagel S, Gómez-Villalva E, Porres JM, Frías J, Vidal-Valverde C, Aranda P. Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by *in vitro* and *in vivo* techniques. *Nutrition* 2005; 21(2): 230-239.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160(1): 1-40.
- Van Muiswinkel FL, Riemers FM, Peters GJ, LaFleur MV, Siegel D, Jongenelen CA, Drukarch B. L-Dopa stimulates expression of the antioxidant enzyme NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO) in cultured astroglial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29(5): 442-453.
- Vanaclocha B, Cañigueral S. (Eds). *Fitoterapia, Vademécum de Prescripción*, 4ª edición. Barcelona: Masson, 2003. URL: <http://www.fitoterapia.net/vademecum/vademecum.php>; Acceso (3/2/2014)
- Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 2012: 914273. doi: 10.1155/2012/914273.
- Vauzour D, Ravaioli G, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Angeloni C, Spencer JP. Peroxynitrite induced formation of the neurotoxins 5-S-cysteinyl-dopamine and DHBT-1: implications for Parkinson's disease and protection by polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008a; 476(2): 145-151.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutrition* 2008b; 3(3-4): 115-126.
- Vidal-Valverde C, Frías J, Estrella I, Gorospe MJ, Ruiz R, Bacon J. Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994; 42(10): 2291-2295.
- Von Bernhardt RM. Neuroinflamación en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. *Boletín de la Escuela de Medicina. U. C. Pontificia Universidad Católica de Chile* 2007; 32(1): 143-154.
- Wahlqvist ML. Antioxidant relevance to human health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 2013; 22(2): 171-176.

- Wallace TC. Anthocyanidins in cardiovascular disease. *Advances in Nutrition* 2011; 2(1): 1-7.
- Walton MC, McGhie TK, Reynolds GW, Hendriks WH. The flavonol quercetina-3glucoside inhibits cyanidin-3glucoside absorption *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(13): 4913-4920.
- Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27(5-6): 612-616.
- Wang H, Cao G, Prior R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45: 304-309.
- Wang LS, Hecht SS, Carmella SG, Yu N, Larue B, Henry C, McIntyre C, Rocha C, Lechner JF, Stoner GD. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer Prevention Research* 2009; 2(1): 84-93.
- Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, Whiteman M, Spencer JP. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radical Biological Medicine* 2008; 45(3): 295-305.
- Wu X, Pittman HE3rd, McKay S, Prior RL. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism following berry consumption in the weanling pig. *Journal of Nutrition* 2005; 135(10): 2417-2424.
- Xia N, Pautz A, Wollscheid U, Reifenberg G, Förstermann U, Li H. Artichoke, cynarin and cyanidin downregulate the expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary smooth muscle cells. *Molecules* 2014; 19(3): 3654-3668.
- Xu B, Chang SK. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008a; 56(16): 7165-7175.
- Xu BJ, Chang SK. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *Journal of Food Science* 2008b; 73(2): H19-H27.
- Xu BJ, Chang SK. Effect of soaking, boiling and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chemistry* 2008c; 110: 1-13.
- Xu BJ, Yuan SH, Chang SK. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science* 2007; 72(2): S167-S177.
- Yoshida K, Mori M, Kondo T. Variation of anthocyanins' chemical structures at different pH values. *Natural Products Report* 2009; 26(7): 884-915.

- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 37(11): 1683-1693.
- Zhang B, Kang M, Xie Q, Xu B, Sun C, Chen K, Wu Y. Anthocyanins from Chinese bayberry extract protect β cells from oxidative stress-mediated injury via HO-1 upregulation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2011; 59(2): 537-545.
- Zhao ML, Liu JS, He D, Dickson DW, Lee SC. Inducible nitric oxide synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Research* 1998; 813(2): 402-405.
- Zhu JJ, Li YR, Liao JX. Involvement of anthocyanins in the resistance to chilling-induced oxidative stress in *Saccharum officinarum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 2013; 73: 427-433.
- Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007; 64(17): 2202-2210.
- Zielinski H, Frias J, Piskula MK, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. The effect of germination process on the superoxide dismutase-like activity and thiamine, riboflavin and mineral contents of rapeseeds. *Food Chemistry* 2006; 99(3): 516-520.
- Zorrilla A, Fernández A. Diabetes mellitus y estrés oxidativo. *Bioquímica* 1999; 24(3): 75-79.
- Zou Y, Chang SK, Gu Y, Qian SY. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59(6): 2268-2276.
- Zulet MA, Martínez JA. Corrective role of chickpea intake on a dietary induced model of hypercholesterolemia. *Plant Food for Human Nutrition* 1995; 48(3): 207-277.