

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

Departamento de Tecnología de Alimentos



**ESTUDIO COMPARATIVO DE ACEITE DE
OLIVA Y MAÍZ SOBRE EL METABOLISMO
OXIDATIVO DE RATA.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Eraci Drehmer Rieger

Dirigida por:

Dr. D. Guillermo Sáez Tormo

Dr. D. José R. Cabo Soler

Valencia, 2007.



DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

D. Guillermo Sáez Tormo, Catedrático del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

D. José R. Cabo Soler, Catedrático del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: que D^{ña}. Eraci Drehmer Rieger, Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad Politécnica de Valencia ha realizado bajo nuestra dirección en la Sección del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia el trabajo que lleva por título: “Estudio comparativo de aceite de oliva y maíz sobre el metabolismo oxidativo de rata” para la obtención del grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Para que conste en cumplimiento de la legislación vigente firmamos el presente certificado en Valencia a 15 de Octubre de 2007.

Fdo. Dr. Guillermo Sáez Tormo

Fdo. Dr. José R. Cabo Soler

AGRADECIMIENTOS

A continuación me gustaría manifestar mi más sincero agradecimiento a algunas personas, que de una u otra manera, han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar a mi hija Carolina y a mi marido Alexis por apoyarme y comprender la importancia del tiempo dedicado para realizar este trabajo.

A mis directores. Dr. Guillermo Sáez Tormo, por su continua dedicación y colaboración, que me ha permitido una vez más concluir mis propósitos. Al Dr. José Cabo Soler, por proporcionarme conocimientos en el campo de la nutrición humana.

Gracias a los doctores Antonio Mulet Pons y a Miguel Blasco Piquer, por motivarme y ayudarme a tener la iniciativa para desarrollar este trabajo.

A mis amigos y compañeros los doctores Antonio Iradi, Luis Such, Argemiro, Pilar Muñiz, Victória Valls, M^a Jesús Pagan Moreno, Raúl Grau Meló, José Vicente, por sus consejos e inestimable ayuda siempre que ha sido necesaria.

Muy especialmente, quiero dar las gracias a Maribel y a Enrique por estar siempre a mi lado y apoyar a mi familia.

A todos mis amigos de Montanejos y en especial los de la cuarta planta, por haberlos tenido a mi lado estos últimos años.

A mi hermana Eliana, por su cariño y por la felicidad de volver a vivir juntas.

Y por último, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas, que directa o indirectamente han participado en el desarrollo de este trabajo y que muchas veces me han dado fuerza para seguir adelante. No me perdonaría quedarme corta en los agradecimientos teniendo tantísimo que agradecer.

Gracias a Aitor, Débora, Máx, Mar, Mary Carmen, Susana, Olga, Jorge, Fabián, Lorena, Sergio, Vicent, Dr. Firas, Amparo, Jorge y Merche, y a la profesora Marcia Della Costa.

A mis padres y a mi familia.

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
RESUM	v
1. INTRODUCCIÓN	
1. 1. <i>ANTECEDENTES</i>	1
1. 2. <i>LOS LIPIDOS DE LA ALIMENTACIÓN</i>	3
1.2.1. Ácidos grasos saturados	7
1.2.2. Ácidos graso monoinsaturado	8
1.2.3. Ácidos grasos poliinsaturados	8
1.2.3.1. Ácidos grasos esenciales	8
1.2.4. Consideraciones nutricionales de salud	10
1.2.4.1. Grasa de pescado	10
1.2.4.2. Aceites de semillas	11
1.2.4.3. Aceite de oliva	12
1.2.5. Grasas y radicales libres	12
1.2.6. Efectos antioxidantes	13
1.2.7. Modelo de dieta experimental	14
1.3. <i>METABOLISMO OXIDATIVO</i>	17
1.3.1. Evolución celular: la vida con oxígeno	17
1.3.2. Radicales libres y tipos de especies reactivas del oxígeno (ROS)	24
1.3.2.1. Reducción del oxígeno molecular y formación de intermediarios reactivos	24
1.3.2.2. Concentraciones intracelulares de peróxido de hidrógeno y anión superóxido	35
1.3.2.3. Producción de ROS en los distintos biosistemas	39
1.3.3. Acciones de las especies reactivas del oxígeno	47

ÍNDICE

1.3.4. Sistemas defensivos antioxidantes	53
1.3.4.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos	56
1.3.4.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos	63
2. OBJETIVOS	75
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. <i>MATERIALES</i>	77
3.1.1. Animales	77
3.1.2. Aparatos	77
3.1.3. Productos reactivos	78
3.1.4. Componentes de las dietas	79
3.1.4.1. Dieta sólida	79
3.1.4.2. Dieta líquida	81
3.2. <i>MÉTODOS</i>	84
3.2.1. Composición de la dieta	84
3.2.1.1. Preparación, estabilidad y conservación de las dietas	89
3.2.1.2. Administración de las dietas	90
3.2.2. Obtención de muestras biológicas	91
3.2.2.1. Aislamiento de orgánulos subcelulares	91
3.2.2.2. Tratamiento de sangre	91
3.2.3. Determinación de proteínas	92
3.2.4. Determinación de hemoglobina	92
3.2.5. Determinación del malondialdehído (MDA)	93
3.2.6. Sistemas antioxidantes enzimáticos	93
3.2.6.1. Superóxido dismutasa (SOD)	93
3.2.6.2. Catalasa (CAT)	94
3.2.6.3. Glutatión peroxidasa (GPx)	94
3.2.7. Determinación de glutatión reducido (GSH)	95
3.2.8. Estudios en hepatocitos aislados	95
3.2.8.1. Aislamientos de células hepáticas	95

3.2.8.2. Preparación de reactivos	98
3.2.8.3. Incubación de los hepatocitos aislados y preparación de muestras para análisis	99
3.2.9. Determinación de metabolitos por métodos enzimáticos	102
3.2.9.1. Determinación de piruvato	103
3.2.9.2. Determinación de L-Lactato	103
3.2.9.3. Determinación de acetoacetato	104
3.2.9.4. Determinación de la D-(-)-3-hidroxiacetato	104
3.2.10. Determinación de glutatión reducido (GSH)	104
3.2.11. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa	105
3.2.12. Determinación de malondialdehído	105
3.2.13. Análisis de la 8 oxo 2'deoxiguanosina (8-oxo-dG) en DNA de rata	106
3.2.13.1. Extracción de DNA	106
3.2.13.2. Digestión del DNA	106
3.2.13.3. Cuantificación de (8-oxo-dG)	107
3.2.14. Tratamiento estadístico de los resultados	108
4. RESULTADOS	
4.1. <i>VALIDACIÓN DE ALIMENTACIÓN CON DIETAS LIQUIDAS CONTROL</i>	109
4.2. <i>DESARROLLO CORPORAL DE LOS ANIMALES</i>	112
4.3. <i>DESARROLLO DEL HÍGADO Y DEL TEJIDO ADIPOSO</i>	114
4.4. <i>ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO</i>	116
4.4.1. Valoración de la actividad de la SOD, Catalasa; GPx, GSH en diferentes tejidos y compartimentos de la rata	116
4.4.1.1. Hígado total	117
a) Valoración de la actividad de la SOD	117
b) Valoración actividad de la CATALASA	118
c) Valoración actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA	119
d) Valoración de los niveles de GLUTATIÓN REDUCIDO	120
e) Valoración actividad de la 8-oxo-2' deoxiguanosina	121
4.4.1.2. Grasa blanca abdominal	123

ÍNDICE

a) Valoración de la actividad de la SOD	124
b) Valoración actividad de la CATALASA	125
c) Valoración actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA	126
4.4.1.3. Grasa parda	127
a) Valoración de la actividad de la SOD	128
b) Valoración actividad de la CATALASA	129
c) Valoración actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA	130
4.4.1.4. Células sanguíneas	131
a) Valoración de la actividad de la SOD	132
b) Valoración actividad de la CATALASA	132
c) Valoración actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA	133
d) Valoración de los niveles de GLUTATIÓN REDUCIDO	134
<i>4.5. ESTUDIO DE LA PEROXIDACIÓN LIPIDICA MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DEL MALONDEALDEHIDO ENPALSMA</i>	136
<i>4.6. INTERACCIONES METABÓLICAS EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA</i>	138
4.6.1. Estudio de la liberación de LDH en hepatocitos aislados de ratas	138
4.6.2. Estudio de los niveles del GSH en hepatocitos aislados de ratas	140
4.6.3. Estudio de la producción de MDA en los hepatocitos aislados de ratas	142
4.6.4. Estudio del estado redox citosólico (NAD ⁺ /NADH) en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz	144
4.6.4. Estudio del estado redox mitocondrial (NAD ⁺ /NADH) en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz	148
5. DISCUSIÓN	151
6. CONCLUSIONES	169
7. NOMENCLATURA	171
8. BIBLIOGRAFÍA	175

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 01: Clasificación de los principales ácidos grasos naturales.	06
Figura 02: Objetivos nutricionales para la población española.	16
Figura 03: Mecanismos defensivos en la toxicidad del oxígeno.	55
Figura 04: Estructura de la vitamina E.	66
Figura 05: Vías seguidas por el radical tocoferoxilo	70
Figura 06: Representación de los valores de la actividad SOD en hígado total de rata	118
Figura 07: Representación de la actividad catalásica en hígado total de rata	119
Figura 08: Representación de los valores de la GPx en hígado total de rata.	120
Figura 09: Representación de los niveles de GSH en hígado total de rata.	121
Figura 10: Niveles de 8-oxo-2' deoxiguanosina (8-oxo-dG) en hígado de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	122
Figura 11: Representación de la actividad SOD en hígado total de rata.	124
Figura 12: Representación de la actividad catalásica en grasa blanca abdominal de rata.	125
Figura 13: Representación de los valores de la GPx en grasa blanca abdominal de rata.	126
Figura 14: Representación de la actividad SOD en grasa parda de rata.	128
Figura 15: Representación de la actividad catalásica en grasa parda de rata.	129
Figura 16: Representación de los valores de la GPx en grasa parda de rata.	130
Figura 17: Representación de la actividad SOD en células sanguíneas de rata.	132
Figura 18: Representación de la actividad catalásica en células sanguíneas de rata.	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 19:	Representación de los valores de la GPx en células sanguíneas de rata.	134
Figura 20:	Representación de los valores de la GSH en células sanguíneas de rata.	135
Figura 21:	Representación de los valores de la MDA en plasma de rata.	137
Figura 22:	Estudio de la liberación del LDH en los hepatocitos aislados de rata alimentadas con aceite de oliva y aceite de maíz.	140
Figura 23:	Estudio de la liberación de los niveles de GSH en los hepatocitos aislados de rata alimentadas con aceite de oliva y aceite de maíz.	142
Figura 24:	Estudio de la producción de MDA en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	144
Figura 25:	Estudio de los niveles del piruvato en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	147
Figura 26:	Estudio de los niveles del lactato en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	147
Figura 27:	Estudio de los niveles de acetoacetato en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	150
Figura 28 :	Estudio de los niveles de β -OH-butilato en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	150
Figura 29:	Producción de ROS.	157
Figura 30:	Ingesta de Vitamina E.	161
Figura 31:	Ciclo redox de interrelación entre GSH, el ácido ascórbico y la vitamina E en el sistema antioxidante celular.	164

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 01: Vision general del origen y evolución de la vida.	22
Tabla 02: Introducción histórica a la toxicidad.	23
Tabla 03: Tipos de especies reactivas del oxígeno.	28
Tabla 04: Peroxidación lipídica.	35
Tabla 05: Participación de metales de transición como catalizadores.	39
Tabla 06: Efecto de la peroxidación lipídica sobre algunos aspectos de la estructura y función de las membranas.	50
Tabla 07: Composición definitiva.	110
Tabla 08: Tratamiento dietético.	111
Tabla 09: Ingesta de vitamina E.	112
Tabla 10: Desarrollo corporal.	113
Tabla 11: Desarrollo de tejidos.	115
Tabla 12: Variaciones del peso corporal, del tejido adiposo blanco abdominal e hígado de ratas controles.	116
Tabla 13: Actividades antioxidantes en hígado total de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz.	117
Tabla 14: Niveles de 8-oxo-2'deoxiguanosina en hígado de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	122
Tabla 15: Actividades antioxidantes en grasa blanca abdominal de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz.	123
Tabla 16: Actividades antioxidantes en grasa parda de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz.	127
Tabla 17: Actividades antioxidantes en células sanguíneas de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz.	131
Tabla 18: Determinación de la peroxidación lipídica mediante la determinación del MDA en plasma.	136
Tabla 19: Estudio de la liberación del LHD en los hepatocitos aislados de rata alimentadas con aceite de oliva y aceite de maíz.	139

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 20:	Estudio de la liberación de los niveles de GSH en los hepatocitos aislados de rata alimentadas con aceite de oliva y aceite de maíz.	141
Tabla 21:	Estudio de la producción de MDA en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	143
Tabla 22:	Niveles de piruvato, lactato y el estado redox citosólico (NAD^+/NADH) en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	146
Tabla 23:	Nivel de acetoacetato y β -OH-butirato y el estado mitocondrial (NAD^+/NADH) en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.	149

RESÚMENES

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido estudiar comparativamente los efectos de dietas líquidas control, de composición definida, conteniendo aceite de oliva o, de maíz como fuente lipídica, respectivamente de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, sobre el metabolismo oxidativo de ratas. La presencia de dobles enlaces en la molécula de un ácido graso constituyen puntos vulnerables a las reacciones de oxidación generando los peróxidos lipídicos, compuestos potencialmente tóxicos que pueden producir graves daños celulares (alteración de la permeabilidad celular, alteración de las prostaglandinas, etc.). Frente a este daño oxidativo, los organismos aeróbicos cuentan con mecanismos de defensa intracelulares, sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. Entre los antioxidantes destaca el *alfa-tocoferol* como antioxidante lipofílico mayoritario.

En nuestro estudio también hemos considerado las posibles interacciones de los productos de la peroxidación lipídica con el DNA en hígado de ratas, a través de la inducción de la 8-oxo-2' deoxiguanosina, un marcador del daño oxidativo del DNA.

Se observó que la actividad de las enzimas antioxidantes *superóxido dismutasa* (SOD), *catalasa* (CAT), *glutatión peroxidasa* (GPX), aumentaban en el hígado y en la grasa blanca de las ratas control alimentadas con *aceite de oliva* al comparar con los grupos *control maíz*. Sin embargo, en la grasa parda y en las células sanguíneas las actividades enzimáticas presentaban una tendencia a disminuir en los grupos control alimentados con *aceite de oliva*.

Cuando se estudiaron los niveles del *glutatión reducido* (GSH) se observó que, tanto en el hígado como en las células sanguíneas de las ratas control alimentadas con *aceite de maíz*, los niveles de este tripéptido se habían reducido. Sin embargo, en los hepatocitos de las mismas ratas estos niveles

RESUMEN

habían aumentado. Esto pone de manifiesto el efecto protector de la vitamina E como antioxidante.

Se observó que tanto el indicador de la viabilidad celular, *lactato deshidrogenasa* (LDH), como el marcador de *peroxidación lipídica* (MDA) aumentaban en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con *aceite de maíz*.

Los resultados del estado *redox citosólico* (NAD^+/NADH) señalan un descenso en los hepatocitos de animales con *control oliva*, lo que indica un estado citosólico reducido, mientras que en el grupo *control maíz* el efecto es en sentido contrario. Con respecto al estado *redox mitocondrial*, los resultados demuestran que tanto en los animales alimentados con *aceite de oliva como de maíz* la situación hepatocelular está dirigida hacia la oxidación.

No se observaron diferencias significativas de daño oxidativo del DNA, determinado por la 8-oxo-2' deoxiguanosina, en hígado de rata alimentada con aceite de oliva y aceite de maíz.

ABSTRACT

The aim of the present doctoral thesis has to study the differential effects of control liquid diets containing either monounsaturated fatty acids (*olive oil*) or polyunsaturated fatty acids (*corn oil*) on the oxidative metabolism of rats. The double bonds of fatty-acid molecules represent vulnerable points for oxidation reactions which can cause lipid peroxidation. These peroxidation products are potentially toxic and can produce serious cell injury (e.g. alterations in cell permeability and production of prostaglandins). To prevent cellular damage induced by oxidative stress, aerobic organisms utilize intracellular defense mechanisms, antioxidant systems that may be classified as enzymatic and nonenzymatic. Vitamin E (α – tocopherol), a potent lipophilic antioxidant, belongs to the second group and acts as scavenger of free radicals.

Indeed, a possible interaction of lipid peroxidation products with DNA has been suggested in liver rat cells. The induction of 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a marker of oxidative DNA damage has been analysed.

In the present study, the status of antioxidant systems was differentially affected by the composition and intake levels of dietary lipids. Rats receiving *olive oil* with its high content of monounsaturated fatty acids were significantly more resistant to oxidative modifications than the group maintained on *corn oil* which contains a high proportion of polyunsaturated fatty acids. *Olive-oil fed rats* displayed higher levels of the endogenous antioxidants *superoxide dismutase*, *catalase* and *glutathione peroxidase* in liver and white adipose tissue. However, in brown fat and blood cells, the activity of these antioxidants was slightly decreased.

Rats which received *corn-oil fed controls* had lower levels of *glutathione* (GSH) in liver and blood as compared to *olive-oil fed controls*, thereby confirming that polyunsaturated fatty acids clearly induce lipid oxidation products. However, increased levels of GSH were observed in hepatocytes

ABSTRACT

isolated from these same rats fed with *corn oil*, indicating that *vitamin E* functions as an efficient antioxidant. Moreover, these hepatocytes from *corn-oil* fed rats displayed more leakage of *lactate dehydrogenase* (LDH) and an increase of *malondialdehyde* (MDA) levels as compared with those on a diet of *olive oil*.

Cytosolic redox (NAD⁺/NADH) was decreased in hepatocytes from the *olive-oil fed controls* as revealed by a reduced state, whereas in *corn-oil fed controls*, the effect was towards a situation of cellular oxidation. Regarding the *mitochondrial redox* state of hepatocytes, both diets *olive-oil* (CO) and *corn-oil* (CM) produced an oxidation effect.

The possible interaction of lipid peroxidation products with the DNA of rat hepatocytes was examined using the induction of *8-oxo-2'-deoxyguanosine* (8-oxo-dG) as a marker of oxidative DNA damage. No differences were observed between *olive-oil* and *corn-oil* fed rats in the present study.

RESUM

En la present tesi doctoral s'ha pretès desenvolupat un estudi comparatiu dels efectes en el metabolisme oxidatiu de les rates de dietes líquides control de composició definida a base d'oli d'oliva com a font dels àcids grassos monoinsaturats i, d'altra banda, oli de dacsa com a font dels àcids grassos poliinsaturats. La presència d'un doble enllaç en la molècula d'un àcid gras constitueix un punt vulnerable a sofrir reaccions d'oxidació i generar així els peròxids lipídics, compostos potencialment tòxics que poden produir greus danys cel·lulars (alteració de la permeabilitat cel·lular, alteració de les prostaglandines, etc.).

Enfront d'aquest dany oxidatiu els organismes aerobis posseeixen mecanismes de defensa intracel·lulars, com són els enzims antioxidants i les molècules captadores de radicals lliures; entre els antioxidants destaca l'alfatocoferol com a antioxidant lipofílic majoritari.

En el nostre estudi també hem considerat les possibles interaccions dels productes de la peroxidació lipídica amb l'ADN en fetge de rata a través de la inducció de la 8-oxo-2' desoxiguanosina, un marcador del dany oxidatiu de l'ADN.

Com a resultat es va observar que l'activitat dels enzims antioxidants superòxid dismutasa (SOD), catalasa (CAT) i glutatió peroxidasa (GPX) disminuïa al fetge i al greix blanc de les rates control alimentades amb oli de dacsa en comparar-les amb els grups control oli d'oliva. No obstant això, al greix gris i les cèl·lules sanguínies les activitats enzimàtiques presentaven una tendència a augmentar en els grups dels àcids grassos poliinsaturats (oli de dacsa). Quan es van estudiar els nivells de glutatió (GSH) es va observar que tant al fetge com a les cèl·lules sanguínies de les rates control oli de dacsa els nivells d'aquest tripèptid s'havien reduït. En canvi, als hepatòcits d'aquestes

RESUM

mateixes rates aquests nivells havien augmentat, la qual cosa posa de manifest l'efecte protector de la vitamina E com a antioxidant.

Es va observar que tant l'indicador de la viabilitat cel·lular, lactat-deshidrogenasa (LDH), com el marcador de peroxidació lipídica (MDA) augmentaven als hepatòcits aïllats de les rates alimentades amb oli de dacsa.

Els resultats de l'estat redox citosòlic (NAD⁺/NADH) presenten un descens als hepatòcits dels animals amb control oli d'oliva, la qual cosa indica la reducció de l'estat citosòlic, mentre que en el grup control oli de dacsa l'efecte és en sentit contrari, cap a una situació d'oxidació cel·lular. Quant a l'estat redox mitocondrial, els resultats demostren que tant en els animals alimentats amb oli d'oliva com en els d'oli de dacsa, la situació hepatocel·lular es dirigeix cap a l'oxidació.

Pel que fa a les diferències quant als possibles danys a nivell d'ADN entre els diferents tipus d'olis, no es van observar diferències significatives de dany oxidatiu en l'ADN en fetge de rata, estimat per la inducció de la 8-oxo-2' desoxiguanosina.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

La grasa de la dieta, al igual que los hidratos de carbono y las proteínas es un importante macronutriente para el crecimiento y desarrollo del organismo. Las grasas dietéticas abastecen el organismo con los ácidos grasos esenciales, tales como el ácido linoléico, que es especialmente importante para que los niños tengan un crecimiento adecuado. Además, la grasa proporciona una fuente de energía y componentes hidrofóbicos que son utilizados para la síntesis de lípidos complejos.

Por otro lado la grasa dietética está implicada en el comienzo y desarrollo de muchas enfermedades asociadas con la acción de especies reactivas oxigenicas (ROS), incluyendo enfermedades coronarias, hipertensión, varios tipos de cáncer, tal como el de mama, próstata y colón (Steinberg *et al.* 1989; Curber, 1997; Gerber *et al.* 1997).

Sin embargo, en los países del mediterráneo, dónde el aceite de oliva es la principal fuente alimentaria de grasa, ha menos incidente de enfermedades crónicas cuando comparados con el norte de Europa y Estados Unidos (Willet *et al.* 1995; Bautista MC. 2005). El alto contenido de ácido oleico y antioxidantes fenólicos de la fracción insaponificable del aceite de oliva, le hace el principal responsable de los beneficios a la salud (Wisseman *et al.* 1996; Visioli *et al.* 1998; Colomer R. *et al.* 2006)

En general, el daño oxidativo es más frecuente y más rápido en ratas o ratones alimentados con dietas compuestas con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados al comparar con aquellos alimentados con dietas ricas en grasas saturadas (Marate *et al.* 2000).

Además, los productos de la oxidación lipídica de la grasa han sido responsables de ejercer efectos citotóxicos y genotóxicos en varios ensayos usando células mamíferas (Kok *et al.* 1994; Drehmer *et al.* 1997; Solanas M *et al.* 2002).

INTRODUCCIÓN

Varios estudios de investigación han sido llevado a cabo a fin de obtener una mejor comprensión en los procesos básicos de la auto oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y los efectos de la descomposición de los productos de la oxidación lipídica (Halliwell *et al* 1999). Así, la acción de los radicales libres y de las especies reactivas de oxígeno provocará la oxidación de las proteínas, la peroxidación lipídica y la oxidación del DNA, lo que supondrá, por ejemplo, la alteración de los enzimas, de las membranas celulares y la aparición de mutaciones, efectos genotóxicos y carcinogénicos, pudiéndose incluso llegar a la muerte celular o apoptosis . Este sería el cuadro conocido como *daño oxidativo*.

Por eso, una posible interacción de los productos de la peroxidación lipídica con el DNA ha sido propuesta. La inducción de la 8-oxo-2' deoxiguanosina, un marcador del daño oxidativo del DNA (Floyd *et al.* 1990), permite que se aplique el análisis de bases modificadas causadas tanto por procesos endógenos como por mecanismos exógenos inductores de estrés oxidativo.

Como parte del sistema fisiológico de defensa, se debe también a la importante acción antioxidante de moléculas de bajo peso molecular, tal como el ácido ascórbico (vitamina C), alfa tocoferol (vitamina E); carotenóides y flavonóides que son consumidas para la prevención del daño oxidativo (Burton *et al.* 1990; Yu 1994; Ghosh *et al.* 1996).

La vitamina E, que es la vitamina liposoluble más ampliamente distribuida en la naturaleza; de los cuales, el alfa tocoferol es la forma más abundante y con actividad antioxidante más potente. Su acción consiste en proteger las membranas celulares, plasmáticas y mitocondrial, de la lipoperoxidación, reaccionando con los radicales superóxido, hidroxilo y peroxilo, dándoles un hidrógeno y transformándolos en hidroperóxidos lipídicos, poco reactivos, para así interrumpir la reacción de propagación de la cadena de peroxidación lipídica (Basu G *et al.* 1996).

La situación del metabolismo oxigénico ha sido poco estudiada en este importante problema metabólico, que tienen relación con una alimentación inadecuada en la que abundan las grasas, muchas de ellas con ácidos grasos

insaturados, y que podrían condicionar modificaciones en dicho metabolismo oxigénico. Por eso creemos interesante estudiar cómo se encuentran algunos aspectos del mismo en un modelo experimental nutricional, con dieta líquida control, a base de aceite de oliva y maíz y el eventual efecto que sobre dicha situación pueda tener un antioxidante lipofílico clásico, el alfa tocoferol.

1.2. LOS LIPIDOS DE LA ALIMENTACIÓN

Los lípidos alimentarios están constituidos por muchos compuestos químicos diferentes que comparten su insolubilidad en agua y solubilidad en disolventes orgánicos.

Desde el punto de vista alimentario, los componentes lipídicos cualitativa y cuantitativamente más importantes y característicos son los *triglicéridos* (triacilgliceroles). Estos compuestos son ésteres del glicerol con ácidos grasos que tienen gran contenido energético: proporcionan alrededor de 9 kcal/g (38 kJ/g) frente a las 4 kcal/g (17 kJ/g) que originan los hidratos de carbono y las proteínas.

A los triglicéridos se les suele identificar propiamente como “la grasa”. A veces, esta grasa es *visible* para el consumidor (mantequilla, aceite o tocino, por ejemplo) pero en otras ocasiones no es *visible*, bien porque esté mezclada con otros componentes de los alimentos o porque forme parte de tejidos. La grasa no visible constituye obviamente un problema para la valoración de la ingesta lipídica.

Los ácidos grasos son constituyentes tanto de los *triglicéridos* como de los *lípidos complejos* (glicerolípidos y esfingolípidos) con funciones estructurales y funcionales, ya que forman parte de las membranas biológicas y modulan su actividad. Pueden también esterificar el *colesterol*, en otra sustancia lipídica que forma parte de las membranas y es precursor de esteroides hormonales, ácidos biliares y vitamina D. Además, algunos de los ácidos grasos que entran en su composición originan unos compuestos de gran actividad biológica: los *icosanoides*, (Mataix, J. I. Nutrientes y alimentos, 2002).

INTRODUCCIÓN

El alto contenido energético de los triglicéridos se ha asociado siempre con la obesidad. Más recientemente se está prestando atención extraordinaria al colesterol y los diferentes tipos de ácidos grasos por su relación con las enfermedades coronarias, el cáncer y otras enfermedades diversas. Por eso, se preconiza la disminución de los altos contenidos grasos en nuestra dieta occidentalizada, así como el equilibrio entre grasa saturada, monoinsaturada y poliinsaturada (Wahrburg U, 2004; Pacheco YM *et al.* 2006).

Los ácidos grasos de interés biológico son ácidos carboxílicos de número par de átomos de carbono (fundamentalmente entre 4 y 26). Son compuestos muy insolubles en agua y ricos en energía metabólica. Se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con la longitud de su cadena:

- a. Ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos)
- b. Ácidos grasos de cadena media (8-12 carbonos)
- c. Ácidos grasos de cadena larga (14-20 carbonos)
- d. Ácidos grasos de cadena muy larga (22 o más carbonos)

Dependiendo del grado de saturación de la cadena de los ácidos grasos pueden ser: saturadas (sin doble enlaces); monoinsaturadas (con un doble enlace); poliinsaturadas (con dos o más dobles enlaces).

En la Figura 1 listamos los ácidos grasos más frecuentes en alimentos de consumo habitual con sus nombres comunes o triviales; (Mataix, J. *et al.* .I- Nutrientes y alimentos. "Lípidos",p.65, 2002).

Las propiedades que presentan los ácidos grasos van a depender tanto de su longitud como de su grado de insaturación.

Así, la longitud de la cadena hidrocarbonada es la principal determinante del punto de fusión de los ácidos grasos saturados y por lo tanto va a determinar la consistencia de las grasas, de las que forman parte, a temperatura ambiente. A medida que aumenta la longitud de la cadena de los ácidos grasos aumenta concomitantemente el punto de fusión siguiendo una relación logarítmica. El punto de fusión en los ácidos grasos insaturados desciende rápidamente por la presencia de los dobles enlaces en la molécula;

así el ácido oleico tiene un punto de fusión de 10,5° y el del linoleico es de -5°. (Mataix *et al.* 1993).

Por otro lado, los ácidos grasos pueden presentar dos tipos de "isomeria": posicional y geométrica. Esta última depende de la configuración de los átomos de hidrógeno que se encuentran en los carbonos que están unidos por los dobles enlaces.

FIGURA 1: CLASIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES ÁCIDOS GRASOS NATURALES.

Nombre común	Abreviatura
A. Ácidos Grasos Saturados	
Acido Butirico	C4:0
Acido Caprónico	C6:0
Acido Caprílico	C8:0
Acido Cáprico	C10:0
Acido Laúrico	C12:0
Acido Mirístico	C14:0
Acido Palmítico	C16:0
Acido Esteárico	C18:0
Acido Aráquico	C20:0
Acido Behénico	C22:0
Acido Lignocérico	C24:0
B. Ácidos Grasos Moninsaturados	
Acido Palmitoleico	C16:1
Acido Oleico ω -9	C18:1
Acido Erúcico	C22:1
C. Ácidos Grasos Poliinsaturados ω -6 (PUFA)	
Acido Linoleico ω -6	C18:2
Acido γ -Linolénico	C18:3
Acido Dihomo- γ -linolénico	C20:3
Acido Araquidónico	C20:4
D. Ácidos Grasos Poliinsaturados ω -3 (PUFA)	
Acido alfa Linolénico ω -3	C18:3
Acido Estearidónico	C18:4
Acido Timnodónico	C20:5
Acido Clupanodónico	C22:5
Acido Clupadónico o Cervónico	C22:6

Fuente: Mataix, J. et al . (2002).I- Nutrientes y alimentos. "Lípidos",p.65

Los ácidos grasos insaturados que se encuentran normalmente en la naturaleza, es en general, de tipo *cis*. Así sucede con los ácidos linoleico, oleico y araquidónico, entre otros. Pero por acción de agentes físicos - calor, principalmente - puede producirse una isomerización estereoquímica, pasando el ácido graso a *trans*. En este último caso, la molécula es más lineal, y las zonas de la misma molécula, a partir del doble enlace, se encuentran en lados opuestos. Esto no ocurre en las formas *cis*.

Las formas *trans* de los ácidos grasos insaturados no se comportan bioquímicamente como las *cis*, perdiendo las propiedades fisiológicas propias y beneficiosas de los primeros.

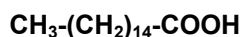
La mayoría de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados que se encuentran en el organismo proceden de la dieta, o de la síntesis de "novo" a partir principalmente de carbohidratos. Sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados esenciales solo pueden proceder de la dieta, ya que los tejidos de los mamíferos y en concreto del hombre carecen de las enzimas necesarias para su síntesis. Estos son los ácidos linoleico y linolénico, precursores de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las células, todos los demás ácidos grasos poliinsaturados se forman por la actuación de dos tipos de enzimas: las "desaturasas" (que introducen dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada) y las "elongasas" (que elongan en 2 átomos de carbono la cadena). Los compuestos obtenidos por desaturación y elongación a partir de estos dos ácidos grasos, son de gran actividad biológica y tienen gran importancia fisiológica, ya que forman parte de muchas estructuras cerebrales y de la retina (Mataix, *et al.* 2002).

1.2.1. Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados no poseen dobles enlaces y no son esenciales en nuestra alimentación, ya que pueden ser sintetizados por el organismo humano, un ejemplo es el ácido palmítico.

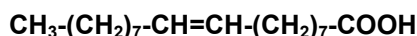
Todas las grasas de procedencia animal son saturadas, a excepción de las del pescado y marisco, que son poliinsaturadas. El aceite de coco y de palma aún siendo vegetal, son ricos en ácidos grasos saturados. Los distintos

ácidos grasos saturados se diferencian entre sí por la longitud de su cadena. El ácido palmítico (16:0) tendría como estructura:



1.2.2. Ácidos grasos monoinsaturado.

Son aquellos que sólo tienen un doble enlace, tampoco son esenciales y están ampliamente distribuidos por la naturaleza. El más importante en nutrición humana es el ácido oleico (C18:1 n-9) que con 18 átomos de carbono tiene un doble enlace en el carbono 9, es el precursor de la serie n-9 y el componente fundamental del aceite de oliva. Su estructura correspondería:



1.2.3. Ácidos grasos poliinsaturados

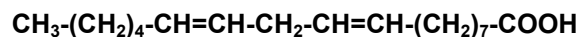
1.2.3.1. Ácidos grasos esenciales

Cuando existen dos o más dobles enlaces y poseen un papel importante en el transporte de grasas y en la manutención de la función e integridad de las membranas celulares. Son precursores de los ácidos grasos más importantes en la nutrición humana, no pueden ser sintetizados por el organismo humano y por lo tanto, deben ser aportados por la dieta y son considerados AGE (ácidos grasos esenciales), (Cervera, *et al.* 1993; Mataix, *et al.* 1993 y 2002).

Se han venido considerando AGE los ácidos grasos linoleico, linolénico y araquidónico, (Cervera, *et al.* 1993; Mataix, J. 2002).

En animales de experimentación se han realizado estudios que ponen de manifiesto cómo la ausencia de estos ácidos grasos esenciales provoca problemas dermatológicos, disminución del crecimiento y otros. En humanos es difícil que existan deficiencias absolutas, excepto en casos de nutrición artificial exenta de lípidos durante un largo período de tiempo, ya que el organismo presenta una reserva importante de ácidos grasos esenciales en el tejido adiposo (Medina JM *et al.* 1996).

De los tres ácidos considerados tradicionalmente como esenciales, el *ácido linoleico* (C18:2 n-6) es el ácido graso esencial por excelencia. Tiene importantes funciones metabólicas, entre los que destaca ser precursor en la síntesis de prostaglandinas. Abunda en los aceites de semilla (maíz, girasol, soja, cártamo, germen de trigo, pepita de uva y cacahuete) y su estructura es:



A partir del ácido linoleico de la dieta se puede sintetizar en el hígado el ácido araquidónico (C20:4 n-6), por lo que este último no es esencial siempre que exista suficiente cantidad del primero, (Cervera *et al.* 1993; Mataix, J. 2002).

El *ácido alfa linolénico* (C18:3 n-3) es imprescindible para la formación de estructuras celulares del sistema nervioso y la retina, a parte de otras funciones, está presente en muchos vegetales (aceite de soja, entre otros). A partir del mismo pueden formarse dos ácidos grasos "omega 3", el ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3), que se encuentran en el pescado azul.

En una dieta rica en aceites de semillas, con abundancia en ácido linoleico (C18:2 n-6) hará que predominen en las membranas los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 y se formen sobre todo los eicosanoides de la serie 2, (20:4 n-6), derivados del ácido araquidónico, ver Figura 1.

Por el contrario, las dietas ricas en pescado harán que predominen en las membranas los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 y se formen especialmente los eicosanoides de la serie 3 derivados del ácido eicosapentaenoico, llevando a cabo sus funciones correspondientes.

En la generalidad de las ocasiones las cosas no son tan sencillas. Debe recordarse que las enzimas "desaturadas" y "elongadas" tienen mayor preferencia por los ácidos más insaturados, es decir, los de la serie n-3.

Sin embargo, las dietas occidentales, especialmente las de los países no mediterráneos, son muy ricas en ácido linoleico. En estos casos, siempre

habrá un buen funcionamiento de la vía de formación de ácido araquidónico y de sus eicosanoides derivados (PGE₂; PGI₂, TXA₂, LTB₄).

Para que funcione mucho la síntesis de ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3) y se formen cantidades relativamente importantes de eicosanoides de las serie 3 (PGE₃; PGI₃, TXA₃, LTB₅) debe sustituir prácticamente toda la grasa procedente de semillas y de animales terrestres por grasa de pescado (Glew RH, 1999; Mataix J. 2002).

Alternativamente, como ocurre con la dieta mediterránea, la sustitución de la grasa de semillas (n-6) por el aceite de oliva (n-9) permite un mayor funcionamiento de la síntesis de ácido eicosapentaenoico (EPA) con un consumo moderado de pescado.

1.2.4. Consideraciones nutricionales y de salud

Las grasas desde el punto de vista nutricional, deben ser ingeridas de manera adecuada. La gran riqueza energética de la grasa, y un exceso alimentario de la misma, sea del tipo que sea, puede conducir a la obesidad y sus complicaciones correspondientes (riesgos cardiovasculares), pero también un exceso de grasa poliinsaturada puede conllevar la modificación estructural de numerosos sistemas del organismo.

1.2.4.1. Grasa de pescado

Investigaciones han puesto de manifiesto que las grasas poliinsaturadas de la familia n-3 tienen una serie de propiedades beneficiosas sobre distintos parámetros relacionados con enfermedades cardiovasculares. Como ya se indicó, estos eicosanoides, con actividad biológica vasodilatadora y anti agregante plaquetario, siendo por tanto menor la posibilidad de formación de trombos o coágulos dentro de los vasos, y consecuentemente la posibilidad de obstrucción de vasos sanguíneos importantes como las coronarias y las cerebrales, (Jequier E, *et al.* 1999; Mataix, J., 2002).

También en los países mediterráneos, y especialmente en España y Portugal, el consumo de pescado es importante, pudiendo justificar este hecho

junto con otros factores dietéticos la menor mortalidad cardiovascular, en relación a otros países occidentales.

Asimismo, se conoce que los leucotrienos derivados del ácido araquidónico (LTB₄, LTC₄ y LTD₄), así como determinados hidroácidos derivados del mismo compuesto, desempeñan un importante papel en la dinámica del aparato respiratorio y en la presentación de crisis de asma. La ingestión de pescado con el aporte correspondiente del ácido graso eicosapentaenoico (EPA) permite la biosíntesis de los leucotrienos (LTB₅, LTC₅ y LTD₅), que presentan una menor actividad biológica, lo que puede contribuir a reducir la incidencia y gravedad de las crisis asmáticas en determinados individuos.

1.2.4.2. Aceites de semillas

En los últimos años se ha incrementado de forma importante el consumo dietético de aceite de semillas ricos en ácido linoleico, en los países mediterráneos, tras el conocimiento de sus propiedades hipocolesterolemiantes.

No hay que olvidar que la ingesta excesiva de estos ácidos grasos poliinsaturados aumenta la susceptibilidad de oxidación de las membranas celulares dando lugar a compuestos de que pueden afectar a la funcionalidad de éstas.

También es conocido que el ácido araquidónico formado en el organismo a partir del ácido linoleico, da lugar a la síntesis de una serie de compuestos biológicamente activos del grupo de eicosanoides que podrían afectar a la agregación plaquetaria y por tanto favorecer la formación de trombos en las arterias y la constricción de los vasos sanguíneos, disminuyendo la luz de éstos y agravando así su efecto aterógeno, (Pérez – Jiménez F *et al.* 2001).

1.2.4.3. Aceite de oliva

El aceite de oliva tiene una capacidad antiaterógena y antitrombógena, que lo hace especialmente recomendable tanto a nivel de prevención como de medidas terapéuticas (Stark AH, 2002).

Las razones de la ventaja antiaterógena radica en que el aceite de oliva reduce los niveles de colesterol total y colesterol **-LDL** comparativamente a las grasas saturadas y de modo parecido a los aceites de semillas (Noseda G, 2005; Mesa MD. *et al*, 2004).

Sin embargo, consigue mantener e incluso aumentar el colesterol **HDL**, mientras que los valores de esta fracción son menores cuando se ingieren aceites de semillas, (Gil, A *et al*. 2001) .

En cuanto al efecto trombógeno parece deberse a la capacidad del aceite de oliva de favorecer la síntesis de eicosanoides de la *serie 3*, como prostaglandina E₃ (PGE₃), prostaciclina I₃ (PGI₃) y tromboxano A₃ (TXA₃), e inhibir los correspondientes de la serie 2, lo que en conjunto facilita la vasodilatación y antiagregación plaquetaria (Moreno JJ *et al*. 2001).

Los efectos cardiovasculares descritos del aceite de oliva, permiten explicar parcialmente la menor incidencia y prevalencia de la patología correspondiente en el mundo mediterráneo en general y en particular en España (Kris-Etherton PM, 1999) y (Martin Moreno JM. 2000)

1.2.5. Grasas y radicales libres

Los ácidos grasos de cadena larga tienden a sufrir una peroxidación espontánea con génesis de radicales libres que suelen estar implicados en los procesos oxidativos de sistemas biológicos. Los radicales libres influyen en la estabilidad de las membranas celulares, su fluidez y en mantener estable los múltiples receptores de membrana.

Por tanto, la presencia de radicales será mayor en función de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados. Por el contrario, se ha observado que la presencia de un mayor número de ácidos monoinsaturados conlleva una menor producción de radicales de oxígeno en monocitos y macrófagos,

reduciéndose así el daño oxidativo y favoreciéndose un efecto en la progresión de lesiones arterioscleróticas (Sitori, CR *et al.* 1992).

1.2.6. Efectos antioxidantes

Por lo tanto, los ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles a la autooxidación por lo que requieren la presencia de antioxidantes naturales que la eviten. Entre ellos se encuentran los tocoferoles, los β carotenos y los compuestos fenólicos, (Mataix, J. *et al.* 1993 y 2002).

La máxima protección observada después de dietas experimentales con aceite de oliva podría ser explicada por la presencia de "antioxidantes naturales" todavía sin identificar, además de la vitamina E, derivados de la ingesta del aceite (Sastre, A., 1990). Estos estudios sugieren que el aceite de oliva contiene antioxidantes activos, como los polifenoles, lo que explicaría en parte la evidencia epidemiológica de lo beneficioso de la dieta mediterránea, (Papadopoulos, G. *et al.* 1991; Hu FB, 2003; Trichopoulou A *et al.* 2003).

Los alimentos de la dieta mediterránea son la fuente principal de nutrientes antioxidantes, vitaminas y minerales. La existencia de estos compuestos antioxidantes obedece primordialmente, a la necesidad de auto-protegerse de la oxidación. Por ejemplo, la vitamina E, (Tauler P, *et al.* 2003; Frank Jan, 2005), que es la vitamina liposoluble más ampliamente distribuida en la naturaleza, de los cuales, el alfa tocoferol es la forma más abundante y con actividad antioxidante más potente (Burton G. 1990). Su acción consiste en proteger las membranas celulares, plasmáticas y mitocondrial, de la lipoperoxidación, reaccionando con los radicales superóxido, hidroxilo y peroxilo, dándoles un hidrógeno y transformándolos en hidroperóxilos lipídicos poco reactivos, para así interrumpir la reacción de propagación de la cadena de peroxidación lipídica (Basu TK *et al.* 1996).

Otro compuesto antioxidante presente en el aceite de oliva son los polifenoles, que contribuyen a reducir la formación de agentes oxidantes en el organismo, al ser capaces de captar los radicales libres, según la reacción general de perder un átomo de hidrógeno y convertirse en un radical poco reactivo, o bien formar quelatos con los iones hierro, conocidos catalizadores

de la *reacción de Fenton* que conduce a la formación de radicales hidroxilo, y así inactivar la formación de nuevas especies reactivas (Morel I *et al.* , 1994; López-Vélez M *et al.* 2003).

Por lo tanto, los polifenoles, al igual que los tocoferoles y carotenóides, desactivan las especies reactivas en sus etapas iniciales y evitan que tal proceso oxidativo continúe, es decir, son secuestradores no enzimáticos de las especies reactivas y de radicales libres.

1.2.7. Modelo de dieta experimental

Existe una amplia variedad de procedimientos para inducir modelos de dieta experimental en animales mediante manipulaciones dietéticas, todos ellos destinados a conseguir un incremento de la ingesta energética de estos animales o variando únicamente algún macronutriente, (Kanarek, *et al.* 1977).

En nuestro estudio hemos realizado un estricto control de los alimentos ofrecidos a los animales de experimentación, siendo posible calcular las cantidades de macro nutrientes y las calidades de los mismos y asegurar el correcto aporte de vitaminas y minerales a la dieta mediante el empleo de "dietas líquidas control" en donde la alimentación se realiza únicamente variando el tipo de lípidos, en este caso aceite de oliva y maíz , para posteriormente realizar un estudio del metabolismo oxigénico en diversos tejidos.

Este es un excelente modelo de experimentación para el estudio de modificaciones metabólicas asociadas exclusivamente en la modificación del tipo de aceite y sin depender de modificaciones cualitativas de la dieta. Se siguió el modelo de alimentación experimental formulado por (Estornell, *et al.* 1994 a-b) y cuyos trabajos e indicaciones nos sirvieron de base para desarrollar nuestro trabajo.

El consumo de grasa en la dieta ha ido creciendo desde principios de siglo hasta la actualidad, sobre todo en los países occidentales desarrollados, llegando en algunos casos a aportar el mismo porcentaje de las calorías que los hidratos de carbono. Este aumento en el consumo de lípidos ha dado lugar

a la realización de numerosos estudios acerca de la relación entre la *cantidad*, y en especial, de la *calidad de la grasa dietética* y ciertas patologías crónicas, entre las que se pueden subrayar ciertos tipos de cáncer y las enfermedades cardiovasculares (arterosclerosis, enfermedad coronaria isquémica, etc...), (Battino M. *et al.* 2004; Estruch R., *et al.* 2006). Todo ello ha conducido a que numerosos comités de expertos de distintos países, así como la Organización Mundial de la Salud (OMS) hayan dado una serie de directrices acerca de los niveles adecuados de grasa en la dieta, que esas ingestas *no superen el 30% de la energía total (t.e.)*, excepto en neonatos que esta recomendación debe ser superior. En nuestro país se aconseja el 35% si el consumo habitual es aceite de oliva y predomina éste en el hábito culinario, (Mataix , *et al.* 2002 ; Beaton, 1999).

Otro aspecto a destacar es *la naturaleza o calidad de la grasa de la dieta*, es decir, el tipo y la distribución de los ácidos grasos en el conjunto del componente lipídico.

Como se han indicado anteriormente la fracción grasa de la dieta es la que cada día se asocia más como una de las causas que contribuyen decisivamente al desarrollo de determinadas patologías degenerativas (Wahrburg U, 2004).

Por todo ello se comienzan a establecer las proporciones de los ácidos grasos en el conjunto lipídico de la dieta, como se indica en la Figura 2, (Mataix J, I-Nutrientes y Alimentos,2002. p. 264).

FIGURA 2: OBJETIVOS NUTRICIONALES PARA LA POBLACIÓN ESPAÑOLA.

	Objetivos Nutricionales Intermedios (a)	Objetivos Nutricionales Finales (b)
Grasas totales (energía)	< 35%	30-35%
Ácidos grasos saturados	< 10%	7-8 %
Ácidos grasos monoinsaturados	20%	15-20%
Ácidos grasos poliinsaturados	5%	5%
	n-3	2 g ác. Linolénico 200 mg DHA
Colesterol	<350 mg/día	<300 mg/día

(a) Corresponde fundamentalmente con el percentil 75 ó 25 según la circunstancia (favorable o desfavorable) de los estudios poblacionales de nutrición realizados en España, o bien cuando se trata de micronutrientes a valores nutricionales de regerencia.

(b) Objetivos nutricionales finales, de acuerdo a la evidencia científica actual y en base a los valores nutricionales de referencia.

DHA: ácido docosahexaenoico

Fuente: Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (2001).

Se recomienda que la cifra de ácidos grasos saturados, no sobrepase el 10% de la energía total de la dieta, es una recomendación bastante frecuente en muchos países, aunque hay autores que proponen un nivel inferior, del orden del 7-8%. Esto implica tener que reducir el consumo de grasas de origen animal manteniendo aumentado las de origen vegetal.

En este sentido se indica que el ácido oleico este entre 15-20% de la energía total y los ácidos grasos poliinsaturados entre 5-10%.

La recomendación para el colesterol es de no sobrepasar los 350 mg/ diario, a fin de evitar riesgos coronario.

1.3. METABOLISMO OXIDATIVO

1.3.1. Evolución celular: la vida con oxígeno

El estudio de los mecanismos de acción y efectos biológicos de los radicales libres representa en la actualidad uno de los aspectos de la investigación científica de mayor interés dentro de las diversas disciplinas o especialidades biomédicas.

El estilo de vida aeróbica, aunque lleno de ventajas para el desarrollo de vegetales y animales no está exento de una amenaza y un potencial citotóxico al que se encuentran expuestas las células vivas desde antes de su nacimiento. Durante el metabolismo oxidativo de las células aerobias, se generan especies derivadas de la reducción parcial o incompleta del oxígeno molecular conocidas como especies oxigénicas y responsables del estrés oxidativo .

La influencia de la dieta y el estado nutricional sobre los mecanismos oxidativos y actividades antioxidantes es un hecho conocido, aunque quedan importantes problemas por resolver. Recientemente se han revisados algunos de los aspectos del metabolismo oxigenico relacionados con el papel de la dieta, y más concretamente con el contenido de ácidos grasos y vitaminas antioxidantes.

A pesar de su reciente desarrollo, el estudio de los radicales libres constituye una fuente rica y esperanzadora de nuevos objetivos experimentales dirigidos al esclarecimiento de los mecanismos de acción citotóxica de las especies oxigénicas, la resolución y tratamiento de diversos procesos fisiopatológicos, implicados en el mejoramiento del estado de salud. El estrés oxidativo al que de forma inexorable se ven sometidas las células aeróbicas es el resultado de la alteración del balance o equilibrio entre la producción y acción citotóxica de los radicales libres oxigénicos y la eficacia de los sistemas antioxidantes defensivos, específicamente desarrollados para esta función.

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres derivados del oxígeno se definen como elementos químicos o especies moleculares que contienen en su configuración electrónica un número impar de electrones. El electrón desapareado no presenta en su mismo nivel energético apareamiento de spin. Un electrón desapareado puede asociarse a cualquier átomo o molécula, lo cuál le confiere una reactividad y por tanto poder de interaccionar con macromoléculas (Pryor, 1976).

Al inicio de la vida en nuestro planeta, la realidad metabólica era diferente a la actual ya que el oxígeno molecular, tan abundante hoy en día, era mas bien escaso y apareció como un producto de la fotosíntesis de algas y arqueobacterias cianofíceas, que son considerados como representantes de los organismos vivos más primitivos conocidos.

De forma aparentemente espontánea, se cree que la vida surgió hace 3,5 billones de años del conjunto de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos químicos elementales a los seres vivos producidos a partir de los componentes reducidos en la atmósfera primitiva mediante reacciones de radicales libres producidos por la radiación solar. La presencia constante de esta radiación ionizante suministró el ambiente propicio para la obtención de elementos necesarios para la supervivencia de las primeras protocélulas y produjo cambios en éstas mediados por reacciones que implicaban distintos tipos de radicales libres de forma más o menos randomizada.

La evolución de elementos celulares más complejos se consigue, sincrónicamente, con la selección y desarrollo gradual de mecanismos defensivos contra las determinadas especies reactivas que se iban generando. Junto a la capacidad de reparación de componentes moleculares como el DNA o proteínas deterioradas por estas especies, se asegura así el mantenimiento de actividades celulares, al mismo tiempo que se permite el establecimiento de cambios a nuevos estadios evolutivos de las especies.

Mas tarde, hace 2,5 billones de años, con la progresiva oxigenación atmosférica, resultado de la actividad fotosintética de las primeras algas verdi-azules, aparece sobre la superficie de la tierra una nueva presión evolutiva mantenida por la presencia de especies reactivas y decidida a imprimir sucesivos cambios para la correcta evolución en ambientes oxigénicos. Con el

incremento del oxígeno atmosférico, también estuvo acompañada de la creación subsiguiente del ozono en las capas altas de la atmósfera, lo que al mitigar la intensidad de la radiación ultravioleta solar, permitió la evolución de muchos organismos celulares complejos.

La presencia de oxígeno molecular sobre la superficie terrestre produce una serie de mutaciones selectivas en estos seres, induciendo una serie de mecanismos enzimáticos, no solo para la utilización de este nuevo elemento molecular sino para defenderse de sus especies reactivas.

Fridowich I. 1981, concluyó que en tales circunstancias, únicamente aquellas líneas celulares capaces de minimizar al máximo la producción o los efectos de estas especies reactivas, podrían sobrevivir en un ambiente cada vez más oxigenado. El oxígeno es actualmente el elemento más abundante en la Tierra (abundancia atómica del 53,8%) y su porcentaje en la atmósfera se mantiene en un 21% en el aire seco. Por ello estos mecanismos defensivos se han mantenido y perfeccionado hasta nuestros días, para seguir luchando contra la acción de radicales libres tanto de origen exógena, que incorporamos constantemente, como endógeno, que generamos como final del normal devenir metabólico oxidativo celular. Y así, desde el inicio de la vida celular, se produce un progresivo e inevitable deterioro de sus estructuras moleculares inducidas por la acción de especies reactivas oxigénicas o no, como tributo al estilo de vida aeróbica.

En 1939 Michaelis propuso la participación de radicales libres como intermediarios de las oxidaciones orgánicas. Durante las tres últimas décadas se aceptó la participación de estas especies reactivas en la mayoría de los procesos bioquímicos de los sistemas biológicos, si bien, es todavía objeto de discusión como se manifiesta, a través, de los debates en torno la química y física de los radicales libres. La discusión es por otra parte lógica en cualquier campo de la investigación de rápido desarrollo y evolución como es este, cuyos conocimientos son y han sido parejos al avance de nuevas tecnologías suficientemente precisas y adecuadas para la identificación de especies moleculares dotadas, dada su alta reactividad, de una vida media muy corta.

INTRODUCCIÓN

Y es en esa capacidad antioxidante en la que se apoyan las teorías que relacionan las expectativas de duración de la vida de los distintos seres de nuestro planeta con la cantidad y perfección de sus mecanismos antioxidantes, lo que nos viene a relacionar el estrés oxidativo con el envejecimiento.

La lucha contra la oxidación de los tejidos se conoce y se puso de manifiesto en tiempos tan tempranos como en la civilización egipcia, con la utilización de productos antioxidantes en el proceso de momificación tan perfecto por ellos utilizado. Pero no es sino a partir de los siglos XVII-XVIII (Tabla 2) y tras los experimentos de Johan Baptista van Helmont, John Majow y otros sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del oxígeno, aparece una de las primeras reseñas bibliográficas sobre la toxicidad del oxígeno. Esta se atribuye al farmacólogo Sueco Sheele quién se ocupó ya de la toxicidad del oxígeno puro.

Más tarde, se realizaron los primeros ensayos experimentales por Paul Bert quien describe cuadros compulsivos generalizados que preceden a la muerte de distintos tipos de aves sometidas a atmósferas hiperbáricas. Sin embargo, no fue hasta hace 40 años cuando se acepta la existencia del radical superóxido como intermediario en la reducción del oxígeno y como producto de varias reacciones enzimáticas.

La concentración de oxígeno en las células vivas va a depender de la movilidad de éste y de la rapidez con la que se consume. Así, la tensión del oxígeno en sangre venosa humana es únicamente de 40 mmHg ($53 \mu\text{mol l}^{-1} \text{O}_2$) aproximadamente el 25% del ambiental.

En algunas células eucariotas como corazón e hígado hay un gradiente de oxígeno, el cual disminuye en concentración desde la membrana celular a la mitocondria. Siendo el oxígeno de 7 a 8 veces más soluble en disolventes orgánicos que en el agua, de ahí que el daño oxidativo sea más importante en medios hidrofóbicos es decir en el interior de las membranas.

Esto condiciona que a elevaciones de la concentración de oxígeno se corresponden disminuciones de la supervivencia de las especies, de forma que en estudios donde se representa el logaritmo de tiempo de supervivencia frente al logaritmo de presión de oxígeno, ha aparecido una relación

aproximadamente lineal e inversa, para protozoos, peces, ratones, ratas o conejos.

Ahora bien como ya hemos indicado, esta misma agresividad del oxígeno, ha inducido el desarrollo de sistemas antioxidantes que controlan la producción y combaten el exceso de estas especies reactivas, en lo que se ha llamado equilibrio prooxidación-antioxidación, cuyo mantenimiento es crucial para la vida celular.

El descubrimiento de la superóxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridowich ante a los estudios de las características cinéticas por Michaelis, Greshman y Gilbert sobre el radical superóxido marcan el principio de un campo de investigación basado en la hipótesis de este radical como responsable de la toxicidad del oxígeno. La SOD es la enzima responsable de la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y como sugiere Fridowich la presencia de esta proteína enzimática en prácticamente la totalidad de las células aerobias puede interpretarse como el resultado de una presión evolutiva ejercida por el incremento progresivo de los niveles de oxígeno en la biosfera. Por otra parte, y como ha sido postulado a pesar de su significado paradójico, el mismo elemento que tanto necesitamos para nuestra respiración y nuestro crecimiento y desarrollo está implicado como factor etiológico en muchas situaciones fisiopatológicas así como en el progresivo deterioro y envejecimiento de los seres aeróbicos.

TABLA 1 - VISIÓN GENERAL DEL ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA VIDA.

	(D. Harman 1986; Alan R. Liss Inc.) (Ann. Int. Med. Davis Conference 1987)
3.5 Billones	Formación de los primeros componentes químicos por radicales libres inducidos por radiaciones ionizantes. RH ó H ₂ S + CO ₂ - (hv) -----CH
2.5 Billones	Aparecen las primeras algas cianofíceas. H ₂ O -----(hv) -----2H + O ₂
1.3 Billones	El oxígeno alcanza el 1% de su presión atmosférica actual. Desaparecen los procariotas anaeróbicos. Los Eucariotas se convierten en células dominantes. Eucariotas + algas cianof. -----plantas de hoja verde. Eucariotas + Procariotas capaz de reducir el oxígeno a H ₂ O ----- reino animal. Aparición de animales y plantas multicelulares (Meiosis).
500 Millones	El Oxígeno atmosférico alcanza el 10% de su presión atmosférica actual. Comienza a emerger vida del mar.
65 Millones	Aparición de primatas.
5 Millones	Aparición del hombre.

TABLA 2 - INTRODUCCIÓN HISTÓRICA A LA TOXICIDAD DEL OXIGENO.

Oxígeno como un Gas	J.Baptiste van Helmont siglo XVII	(1577-1644)
Oxígeno componente del aire	John Mayow (1641-1679)	
"Fotosíntesis y respiración " Manejo de gases e concepto de oxidación.	Joseph Priesley	siglo XVIII
Toxicidad del Oxígeno Puro.	Carl Wilhelm Sheele	
Elaboración de los primeros productos derivados del oxígeno.	L.Jacob Thenard (1818) C.F. Shonbeim (1840)	siglo XIX
Primeras observaciones sobre la toxicidad del Oxígeno.	Paul Bert	(1878)
Bases teóricas y científicas sobre la toxicidad del oxígeno. (El radical libre oxigénico)	Michaelis (1946) Gerschman (1954)	siglo XX
Radicales libres y envejecimiento.	Denham Harman (1955)	
Reducción monovalente del oxígeno; El radical superóxido Descubrimiento de la Superóxido Dismutasa	Irwin Fridowich (1962)	

Bannister J.V. (1996)
"Foreword" CRC Handbook of Methods of Oxygen Radical Research.
(Greenwald R.A. ed).

1.3.2. Radicales libres y tipos de especies reactivas del oxígeno (ROS).

La lesión de los sistemas biológicos causado por la generación de las especies oxigénicas (ROS) es referido como estrés oxidativo (Sies, H., 1986), que a su vez es el resultado de un desequilibrio entre la generación de las ROS y su inactivación del equilibrio pro-antioxidación.

Cuando nos referimos al estrés oxidativo conviene resaltar el papel crucial del O₂ molecular como agente del metabolismo intermediario. Debido al elevado potencial de reducción del par redox oxígeno-agua los electrones procedentes de las distintas oxidaciones metabólicas a partir de hidratos de carbonos, lípidos y proteínas, son conducidos mediante un perfecto sistema de proteínas y cofactores especializados hasta el oxígeno, último aceptor metabólico, para su reducción a agua. Este flujo continuo de electrones hacia el oxígeno proporciona, además, la base molecular para la síntesis de energía biológica en forma de ATP que se consigue gracias al perfecto acoplamiento entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna.

El hecho de que el oxígeno haya sido elegido por la naturaleza como oxidante terminal de la cadena respiratoria, es debido según George P. (1965), a que en su estado físico presenta una solubilidad satisfactoria en agua con las propiedades cinéticas y termodinámicas deseables. Esta inercia del oxígeno se puede explicar por su estructura electrónica.

1.3.2.1. Reducción del oxígeno molecular y formación de intermediarios reactivos.

El oxígeno en su estado fundamental contiene dos pares de electrones desapareados con el mismo spin y número cuántico. Estos son espines paralelos confiriéndole la propiedad de paramagnetismo, es decir, impide la entrada directa o apareamiento de estos electrones ofreciendo una restricción de spin. Esto hace difícil la reducción tetravalente para dar H₂O, ya que la entrada de dos electrones en los orbitales disponibles, obliga a un electrón a invertir su sentido de giro o rotación sobre si mismo. Hay mecanismos para

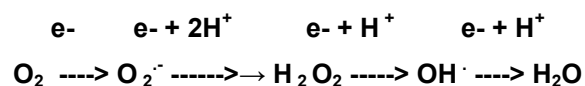
invertir el spin electrónico, de modo que esta restricción de spin no sea una barrera irremontable. El tiempo requerido para invertirlo es de un orden de magnitud más elevado que la vida media del complejo de colisión. Por lo tanto, la adición de electrones en su estado fundamental, es un proceso relativamente lento. Otro problema es que la reducción de un electrón del oxígeno molecular está termodinámicamente desfavorecida.

El potencial de la reacción de $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ es - 0,33V.

Por lo tanto el resultado neto de esta restricción de espines parece indicar que la reducción directa y completa del oxígeno molecular, mediante la adición de dos o cuatro electrones, no es un proceso favorecido, comparado con su reducción electrónica progresiva o monovalente que da lugar a la génesis de intermediarios altamente reactivos previa a la formación de agua.

Sin embargo estas restricciones han sido superadas en los organismos aerobios gracias a la inducción de la enzima oxidasa, último eslabón de la cadena respiratoria celular, que mediante un mecanismo en el que participan cuatro centros redox, lleva a cabo la reducción tetravalente del oxígeno hasta agua sin liberación de intermediarios parcialmente reducidos y altamente reactivos.

Aunque la proporción es escasa, ya que solo del 1-5% del oxígeno consumido durante la respiración mitocondrial sufre una reducción monovalente a radical superóxido, no debe de ser ignorado al ser en si mismo reactivo y además precursor de otras especies oxigénicas por sucesivas reducciones, y que, como es conocido poseen una elevada e indiscriminada agresividad lesiva celular (Barquinero 1992).



Radical	Peróxido de	Radical
Superóxido	Hidrógeno	Hidroxilo

INTRODUCCIÓN

Como se puede observar, la reducción completa de una molécula de oxígeno requiere cuatro electrones, y durante la secuencia sumatoria de electrones se pueden producir una serie de intermediarios que serán especies paramagnéticas o ROS que proceden de los pasos univalentes. Son el Radical Superóxido, el Radical Hidroxilo, el Peróxido de Hidrógeno, que sin presentar características paramagnéticas, es una especie altamente reactiva.

Los radicales o especies reactivas oxigénicas se definen como aquellas moléculas o fragmentos de moléculas que presentan un número impar de electrones ó sea electrones desapareados en su capa energética mas externa.

Esta propiedad de tener electrones desapareados le puede conferir al radical una enorme reactividad química, que le conducirá a interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas (radicales o no) con las que entren en contacto, tendiendo a ceder este electrón extra para estabilizar su orbital de valencia (radical reductor), a aceptar un electrón para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante), o a unirse a un radical, en cuyo caso, este último se convierte en un radical libre. Mediante estos mecanismos los radicales libres dan lugar a reacciones en cascada con formación de nuevos radicales libres. Sólo cuando coinciden dos radicales pueden combinar sus electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente, terminando así dichas reacciones, aunque pueden existir de manera estable compuestos en forma de radical libre (Marquina 2000).

Los radicales son generados in vivo como productos del metabolismo normal, teniendo en cuenta que cada célula humana metaboliza 10^{12} moléculas de oxígeno por día (Floid 1995; Jackson 2001). En el organismo pueden crearse intra y extracelularmente, mediante mecanismos en los que están implicados numerosos enzimas y tipos celulares. En condiciones normales, la inmensa mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno (Halliwell 1991).

Frecuentemente se utiliza de manera equivocada el término “*radicales libre del oxígeno*”, asignándosele a todas las especies reactivas del oxígeno intermedias, incluidas aquellas formas moleculares que no son radicales. Es

más apropiado hablar de especies reactivas del oxígeno en lugar de radicales libres del oxígeno, aunque esta denominación también podría matizarse, ya que como está expuesto más adelante, existen especies con una alta y otras con menor actividad.

Los tipos de especies reactivas del oxígeno (ROS) y algunos de sus precursores se muestran en la (Tabla 3).

TABLA 3.- TIPOS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).

ESPECIES	NOMBRE	ORIGEN
1O_2	Oxígeno singlete	$3 O_2$, Peroxidación
R.	Radical libre	RH
$ROO\cdot$	Radical Peroxi	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROOH$
$HL\cdot$	Radical ac. linoleico	H_2L (ac. linoleico)
$HLOO\cdot$	Radical peroxi del ac. linoleico	$HL\cdot + O_2$ $HLOOH$
$O_2 H\cdot$	Radical Hidroperoxi	$O_2^{\cdot -} + H^+$
$O_2^{\cdot -}$	Radical Superóxido	$O_2 + e^-$
$OH\cdot$	Radical hidroxil	H_2O_2, H_2O
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	$O_2^{\cdot -}$, Biogeneración
$RO\cdot$	Radical alcoxi	$ROOH, ROOR$
$HLO\cdot$	Radical alcoxi del ac. linoleico	$HLOOH + e^-$
$ROOH$	Hidroperóxido	$ROO\cdot, ^1O_2$
$ROOR$	Peróxido	Peroxidación
O-C-C	Epóxido	$ROO\cdot$ Insaturado

Radical Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

La transformación del oxígeno en especie reactiva puede efectuarse por reducción monovalente de la molécula de oxígeno (Farhataziz, y col., 1977) es decir, por captación de un electrón que transforma este elemento en lo que se llama una especie oxigenada activada, *el anión superóxido*. El peróxido de hidrógeno en su oxidación monovalente también genera superóxido.

Esta reducción monovalente del oxígeno fue estudiada por (Warburg, Battelli y Stern, 1928); posteriormente en 1946 Michaelis propuso que esta reducción monovalente lleva a la formación de un radical de importancia química y biológica, pero hubo que esperar hasta 1969 para que esta fuera puesta de manifiesto por I. Fridovich.

El radical superóxido es producido in vivo por casi todas las células aeróbicas (Fridovich, 1974). Dentro de las distintas evidencias que apoyan esto están:

- La superóxido dismutasa (enzima encargada de la metabolización del radical superóxido), ha desarrollado una carga de superficie para facilitar el uso específico de $O_2^{\cdot -}$ como su sustrato.

- La presencia de superóxido dismutasa es importante como antioxidante requerido para el crecimiento de aerobios evitando el excesivo daño en el DNA por el $O_2^{\cdot -}$. Esta enzima acelera la reacción de dismutación del radical superóxido cerca de cuatro órdenes de magnitud.

- $O_2^{\cdot -}$ es frecuentemente encontrado como intermediario de reducción del di oxígeno en sistemas bióticos y abióticos.

La fuente de electrones necesaria para su generación puede ser endógena (enzimas celulares), o exógenos (radiaciones ionizantes) u otros tóxicos. Sin embargo, parece ser que principalmente provienen de la fuga de electrones del oxígeno de la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias (Boveris, *et al.* 1972; Loschen, *et al.* 1974; Forman, *et al.* 1982). Así se vio que en mitocondrias dañadas se puede escapar un electrón vía un radical semiquinónico (Nohl *et al.* 1986) de ubiquinona (UQ) (Land, *et al.* 1971).



INTRODUCCIÓN

La toxicidad del radical superóxido se ve limitada por la existencia de la enzima superóxido dismutasa, (Fridovich, 1978) y por el otro lado por la escasa reactividad atribuida a esta especie (Saez, G. *et al.* 1988; Malmstrom, B., 1982). Sin embargo debemos tener presente que es un radical ambivalente, pues puede servir tanto como agente reductor como oxidante. Como reductor es monovalente con un potencial estándar $E^\circ (O_2/O_2^-) = -0,33V$. Y puede actuar como oxidante fuerte termodinámico con un potencial $E0 = +0,87V$, aunque su reacción es más lenta.

Su interacción con las biomoléculas está marcada por su corta vida media (10^{-3} sg) ya que espontáneamente o bajo la acción enzimática se dismuta a H_2O_2 , que fácilmente se transforma por ruptura del enlace O-O ó enlace peróxido en especies reactivas muy oxidante como el OH^\cdot , lo que nos viene a indicar, que el O_2^- con H_2O_2 y en presencia de metales de transición, como el Fe(III) y el Cu(II), puede dar lugar a un incremento en la producción de radical OH^\cdot como especie más reactiva.

Además de esta activación del oxígeno hay otra vía que permite la reacción de este elemento con las moléculas biológicas y la transformación de estos ROS. Esta reacción se produce mediante los enzimas del grupo de las oxigenasas y oxidasas.

Otra característica de este radical es su gran reactividad en medios hidrófobos apróticos, que disminuye de forma importante en medios acuosos.

En un medio aprótico, presenta alta reactividad, pudiendo actuar de cuatro maneras básicas incluyendo la transferencia de electrones, sustitución nucleofílica, desprotonación y abstracción de átomos de **H**, siendo el más común en sistemas biológicos la transferencia de electrones, proceso importante en los medios apróticos como las membranas celulares.

En medio acuoso, la protonación del radical superóxido produce el radical hidroperóxido como especie muy reactiva.



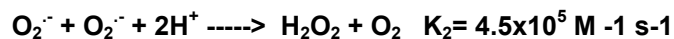
Su efecto es menor al estar limitada la movilidad intracelular del superóxido después de formado, por presentar la característica de no cruzar las membranas biológicas a no ser por la presencia de algún conducto aniónico que facilite su paso. El único ejemplo de tal canal se encontró en la membrana de los eritrocitos (Lyon, 1978) aunque es posible su existencia en membranas de células endoteliales vasculares.

Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

El concepto de transferencia de hidrógeno a oxígeno con la subsiguiente generación de peróxido de hidrógeno fue propuesto hace ya 60 años por Thunberg, Wieland y otros. Pero sería Michaelis en 1946, el que señaló que la oxidación bivalente de moléculas orgánicas tenía lugar mediante dos reducciones univalentes.

Es el más estable de los intermediarios de la reducción del oxígeno molecular, siendo el menos reactivo y el más fácil de detectar. Se genera directamente por reducción divalente del oxígeno molecular. Así la adición de un segundo electrón a O₂^{·-} hace que se forme el ión peróxido, o mediante dismutación espontánea para formar el peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

SOD



In vivo a pH fisiológico el radical superóxido rápidamente será protonado para formar el H₂O₂ (Halliwell, 1984) mediante la acción de la superóxido dismutasa.

La concentración estimada del peróxido intracelular varía de 10⁻⁹ - 10⁻⁷ M y se mantiene en equilibrio por la acción enzimática de Glutatió Peróxidasas (GPx) y Catalasa (Cat.) con Km de 10⁻⁶M y 10⁻³ M respectivamente. La GPx elimina el H₂O₂ producido a ritmo bajo, mientras que la catalasa actúa preferentemente cuando la producción es mayor (Freeman, 1985).

INTRODUCCIÓN

Los niveles equilibrados de H_2O_2 en el citosol pueden permitir su salida al líquido intersticial ya que las membranas biológicas son altamente permeables, con una constante de permeabilidad de 0,2 cm/min. para las membranas perixosómicas y de 0,04 cm/min para las de los eritrocitos, lo que significa una permeabilidad similar a la del agua.

Su toxicidad no está bien delimitada y hay quien la confiere toxicidad directa y quien opina que se trata de un intermediario hacia el hidroxilo y así algunas bacterias y células se afectan por concentraciones micromolares de H_2O_2 , mientras que otras bacterias y algas fotosintéticas generan y liberan grandes cantidades de este elemento (Halliwell, 1990). La variabilidad de su acción dependerá de la presencia de enzimas catalizadores y de su velocidad de conversión en radicales reactivos, y así su capacidad de reaccionar con el radical superóxido o con los iones metálicos como el Fe (II) o el Cu (I) y otros agentes reductores que lleva a la peroxidación del radical hidroxilo.

El peróxido de hidrógeno puede actuar como reductor u oxidante en distintas condiciones y así actúa de reductor sobre el Cu de la SOD o el Fe del Citocromo c, y como oxidante actuando sobre el Citocromo c reducido y oxidándolo con la producción de radicales hidroxilo.

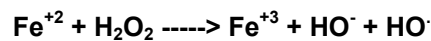
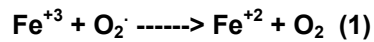
Una reacción similar ocurre con la superóxido dismutasa reducido llevando a la inactivación de éste (Bray, 1974).

Radical Hidroxilo (HO·)

De interés particular entre las especies activadas del oxígeno es el radical hidroxilo el cual se genera por las reacciones de *Haber-Weiss*, radiaciones ionizantes y presumiblemente en los procesos metabólicos normales o patológicos.

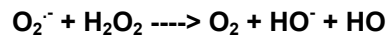
Fenton fue el primero en proponer la existencia de un radical hidroxilo en 1984 y sugirió que se formaba como producto de la oxidación de Fe^{+2} por parte del peróxido de hidrógeno. Estas reacciones tipo *Fenton*, que conducen a la producción de radicales hidroxilo, requieren al radical superóxido y al peróxido de hidrógeno como precursores y un catalizador intermediario, tal

como un metal de transición, éste es reducido por el superóxido y reacciona posteriormente con el peróxido de hidrógeno para producir HO· :



La catálisis de estas reacciones in vivo, se han demostrado con quelantes de hierro-ADP o hierro ATP y ácido picolínico, con hierro libre en distintos fluidos biológicos y con hierro asociado a la transferrina lactoferrina o ferritina.

La generación de radicales hidroxilo a partir de **Fe** ó **Cu** con peróxido de hidrógeno están racionalizadas en término de secuencias de reacción descritas anteriormente y dan como balance neto la reacción de Haber-Weiss (Halliwell, 1986):



La reacción también puede producirse con otros metales, aunque como hemos comentado el ion ferroso es el más abundante y puede ser aportado por la transferrina, lactoferrina, ferritina o hemoglobina y su frecuencia dependerá de la disponibilidad celular de metales de transición para catalizar el H₂O₂, aunque la misma reacción puede ser catalizada por otros metales como el Cobre reducido y por los quelantes del Fe y Cu (Aust, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1986). Otros metales también pueden catalizar cuando encuentran el ligando oportuno, como el Niquel al unirse a la histidina de pequeños oligopéptidos (Inoue y Kawanishi, 1989) o a la histidina aislada (Datta, *et al.* 1991; Kasprzak, 1991).

Parece claro que estas reacciones son un mecanismo fundamental de formación de radical **OH·** a partir del **O₂⁻**, ya que como vemos éste se dismuta rápidamente formando **H₂O₂**, de modo que cualquier reacción que produzca

INTRODUCCIÓN

$O_2^{\cdot -}$, producira en última instancia OH^{\cdot} a menos que exista algún sistema que lo evite.

El radical hidróxilo es el más reactivo entre las especies oxigénicas conocidas y sus implicaciones en los efectos biológicos de las radiaciones y otros fenómenos bioquímicos han hecho del mismo, el centro de interés en el estudio de la toxicidad del oxígeno, razón por la cual sigue siendo extensamente estudiado.

Ya propuesto por Van Hemmen y Meulin y posteriormente por Halliwell y Gutteridge, 1990, se postula que la lesión biológica causada por los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno mediada por la formación de radicales hidroxilo depende del sitio donde se encuentra los metales catalíticamente activos en la reacción de Haber-Weiss. Si están unidos a lípidos de membrana iniciará la peroxidación de lípidos y si está unido a DNA habrá modificación de bases o rotura de cadena, dependiendo del grado y localización en regiones más o menos frágiles de esta reacción.

Uno de los efectos más inmediatos del ataque sobre los sistemas biológicos, es la peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo, que localizada sobre los lípidos de las membranas celulares, una vez iniciada toma forma de "cascada" de producción de radicales libres, que lleva a la producción de otros peróxidos, a partir de los ácidos insaturados (Cohen, 1974; y Halliwell, 1984).

Como vemos en la Tabla 4, la peroxidación lipídica se inicia por lo general, tras la abstracción de un átomo de hidrógeno de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados, en su estructura divinilometano. A este momento iniciador siguen una serie de reacciones de propagación y ramificación para finalmente dar a especies más estables y medibles como el Malondialdehído (MDA).

Existe un acuerdo general sobre el hecho de que la peroxidación de los lípidos de las membranas celular y mitocondrial son los causantes principales de los efectos citotóxicos (Halliwell, 1984).

TABLA 4: PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

Iniciación	$LH \text{ ----- iniciador ---- } L^{\cdot}$
Propagación	$L^{\cdot} + O_2 \text{ ----- } LOO^{\cdot}$ $LOO^{\cdot} + LH \text{ ----- } LOOH + L^{\cdot}$
Ramificaciones	$LOOH \text{ ----- } LO^{\cdot} + OH^{\cdot}$
Final	$LO^{\cdot} + LO^{\cdot} \text{ ----- } LOO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \text{ ----- Etano,}$ Pentano, Malondialdehído, etc.

LH: ácido graso insaturado. L: Radical alil. LO^{\cdot} : radical alcoxil. LOO^{\cdot} : radical peroxil. LOOH: hidroperóxido.

1.3.2.2. Concentraciones intracelulares de peróxido de hidrógeno y anión superóxido.

Se ha estimado que las concentraciones en estado de equilibrio en la célula hepática aeróbica son de 10^{-12} 10^{-11} M de $O_2^{\cdot-}$ y de 10^{-9} 10^{-7} M H_2O_2 . El radical OH^{\cdot} es consumido cerca de sus sitios de producción y su vida media intracelular es de 10^{-9} sec. (Chance, 1979).

El nivel del anión superóxido, se mantiene en equilibrio por su enzima metabolizante superóxido dismutasa, mientras que los niveles de peróxido de hidrógeno menos reactivos están regulados a concentraciones 3 órdenes de magnitud superior 10^{-7} y 10^{-9} (Oshima *et al.* 1973). Las fuentes de producción de estos están moduladas por una serie de mecanismos fisiológicos y bioquímicos, como pueden ser el suministro de oxígeno o de sustratos.

La fuente de electrones para la formación del radical superóxido puede variar con la concentración de los enzimas, los distintos tipos de células, así como la disponibilidad de sustratos y cofactores; por lo tanto, la cantidad de

INTRODUCCIÓN

fugas y velocidad de producción del radical superóxido se incrementa con la concentración de O_2 (Boveris, *et al.* 1971).

Casi todas las células eucariota están perfectamente protegidas contra el peróxido por medio de dos sistemas enzimáticos que son la glutatión peroxidasa y catalasa con K_m de 10^{-6} M y 10^{-3} M respectivamente. La glutatión peroxidasa elimina el peróxido de hidrógeno producido con los ritmos bajos normales de producción, mientras que la catalasa adquiere mayor importancia cuando la disponibilidad de peróxido de hidrógeno es mayor (Freeman, 1985).

Tanto catalasa como glutatión peroxidasa desempeñan importantes funciones metabólicas en el control de la concentración de peróxido de hidrógeno a niveles diferentes y en partes diferentes de la célula. La catalasa es efectiva como una válvula para tratar de eliminar las grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que puedan ser generadas en los peroxisomas. La glutatión peroxidasa es capaz no solamente de utilizar hidroperóxidos sino también de metabolizar el peróxido de hidrógeno en el citosol o compartimiento mitocondrial. La compartimentalización facilita su colaboración efectiva en el metabolismo del peróxido de hidrógeno; cada enzima será principalmente responsable de la descomposición de peróxido de hidrógeno generado en el sitio celular donde la enzima está localizada. Sin embargo, se ha visto que la adición de glicolato a los peroxisomas de hígado perfundido activa la glutatión peroxidasa. Esta respuesta podría indicar la presencia de glicolato oxidasa citosólica o la existencia al menos de gradientes intracelulares mínimos de peróxido de hidrógeno desde los peroxisomas al citosol.

Los niveles en equilibrio de peróxido de hidrógeno en el citosol pueden permitir a una porción difundirse de la célula al fluido intersticial y subsecuentemente hasta a la sangre. Tal difusión provee un eficiente mecanismo de defensa para estos órganos bajos en catalasa, tales como cerebro, pulmón y corazón o esos otros con ausencia de glutatión peroxidasa como músculo. Las membranas biológicas son altamente permeables al peróxido de hidrógeno, siendo la constante de permeabilidad de 0.2 cm/min para las membranas peroxisómicas y 0,04 cm/min para la de eritrocitos, pudiendo ser comparada con la constante de permeabilidad del agua en una

alta variedad de membranas celulares, cuyo rango va desde 0.02 a 0.42 cm/min. La permeabilidad de la membrana de los eritrocitos para el peróxido de hidrógeno es mayor que para muchas moléculas no electrólitos.

El radical hidroxilo ocupa un estado de alta energía, lo que lo hace altamente reactivo siendo capaz de reaccionar con biomoléculas, como azúcares, aminoácidos, lípidos y DNA, en un orden de $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, (Buxton, *et al.* 1988) y su vida media es extremadamente corta. Únicamente puede difundir de 5^{-10} dm desde su sitio de formación hasta donde reacciona; de ahí la importancia de los lugares específicos donde se forman éstos radicales hidroxilo.

Estos niveles de radical hidroxilo se pueden ver alterados "in vivo" por distintas rutas o mecanismos: reacciones de Fenton, interacción radical-peróxidos orgánicos.

En relación con la catálisis metálica, se ha sugerido que la compartimentalización de metales pesados como el hierro, de aquellos lugares de unión en los que su habilidad para catalizar la producción de radicales libres estaría inhibida, es un factor importante ya que éste podría ser transportado y alcanzar lugares críticos de reacción donde la producción del radical hidroxilo fuera bioquímicamente viable. Dicha compartimentalización o liberación podría ser, a su vez, inducida por la acción de drogas, xenobióticos tóxicos o incluso virus como ha sido propuesto para explicar el efecto tóxico de la hidroquinolina (Wilson, R.L. 1977 y 1979).

Por lo tanto la concentración de estas especies oxigénicas se puede ver alterado por la presencia de metales de transición donde éstos pueden tener un efecto dual en los biosistemas.

Por un lado como protectores contra el daño por radicales superóxido (Borg, 1989).



INTRODUCCIÓN

El efecto protector es debido a la abstracción de un protón del radical superóxido catalizado por algunos ligandos de cobre a través de un mecanismo "Ping-Pong", análogo a la reacción de la superóxido dismutasa.

Esta influencia de los metales de transición puede tener relevancia en condiciones tales como la hemorragia, la hemólisis y muerte celular, ya que ello conlleva a la destrucción de estructuras y la consecuente liberación de metales de transición al medio.

Por otro lado pueden tener efectos tóxicos, al actuar como catalizadores (Tabla 5) del daño oxidativo, al llevar a cabo la producción de radicales hidroxilo, que se pueden generar tanto lejos como cerca de la diana biológica donde servirá como un ligando efectivo. Así la estereo y regio selectividad de producción de radicales hidroxilo en la vecindad del DNA puede controlar el tipo de química observada. Siendo el radical hidroxilo el único oxi-radical que presenta reacciones termodinámicamente favorables en la interacción con el DNA, es comprensible la alteración de las bases nucleotídicas mediante la abstracción o adición de átomos de hidrógeno de su estructura y consecuente modificación oxidativa de la misma.

Aunque otros oxi-radicales de interés biológico, tales como los radicales alcoxil y peroxil son especies electrolíticas, el OH^\cdot parece ser el radical-oxi más electrofílico con una elevada propensión a ambas adiciones y extracciones. La expresión de uno u otro efecto puede relacionarse con las propiedades cinéticas de los metales ligandos, como las concentraciones en estado de equilibrio de las especies requeridas de oxígeno.

TABLA 5.- PARTICIPACIÓN DE METALES DE TRANSICIÓN COMO CATALIZADORES.

SUPEROXIDO ($O_2^{\cdot-}$)	Fe/Cu ----->	R. HIDROXILO (OH^{\cdot})
PEROXIDO DE HIDROGENO (H_2O_2)		
PEROXIDOS LIPIDICOS ($ROOH$)	Fe/Cu ----->	R. ALCOXI Y PEROXI (RO^{\cdot}) (ROO_2^{\cdot})
TIOLES (RSH)	Fe/Cu más O_2 ----->	R.TIOL (RS^{\cdot}), ($O_2^{\cdot-}$) (H_2O_2), (OH^{\cdot})
NAD (P) H	Fe/Cu más O_2 ----->	NAD(P)$^{\cdot}$, ($O_2^{\cdot-}$) (H_2O_2) Y (OH^{\cdot})
CATECOLAMINAS QUINONAS Y OTRAS MOL. OXIDABLES	Fe/Cu más O_2 ($O_2^{\cdot-}$), (H_2O_2), (OH^{\cdot}) ----->	SEMIQUINONAS Y R. EQUIVALENTE

1.3.2.3. Producción de ROS en los distintos biosistemas.

Conocido es y desde hace tiempo, el papel regulatorio que juega el oxígeno en los procesos metabólicos, pero la especificidad de su acción no se entendió hasta que reacciones bioquímicas y fisiológicas de anoxia e hiperoxia fueron examinadas desde el punto de vista de la activación del oxígeno, lo que llevo a reconsiderar procesos en los que se producen radicales oxigénicos y que tipo de participación poseían en estos procesos de las células vivas.

Actualmente la atención científica o experimental está desplazada hacia la inhibición de los procesos de ROS como paso previo a la prevención

INTRODUCCIÓN

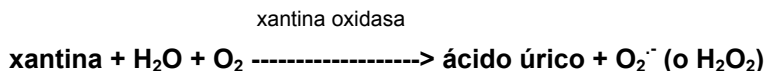
de aquellos procesos fisiopatológicos donde los ROS juegan un papel importante in vivo y la prevención de varias enfermedades en las cuales juegan un importante papel (Hinder, y col. 1991).

Como ya hemos mencionado, los ROS pueden generarse a partir de la reducción monovalente del oxígeno, siendo la fuente de electrones endógena o exógena. Ahora bien, esta adición electrónica puede generarse en estos sistemas biológicos, durante reacciones de tipo enzimático como no enzimático, como veremos.

Producción enzimática

Una gran variedad de enzimas, sencillos o complejos, al implicarse en el metabolismo celular, pueden transferir electrones al oxígeno, dando lugar a la formación de radicales, y así la producción de radical O_2^- y H_2O_2 pueden ser originados como resultado normal de la acción catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario. La generación de uno u otro por las mismas enzimas y la producción neta, será el resultado de las distintas condiciones y composición del medio.

Ejemplo de ello son las reacciones catalizadas por las enzimas xantina-oxidasa y aldehído-oxidasa, ambas son flavoproteínas que contienen FAD, centros con Fe-S y Mo que pueden sufrir ciclos de oxidorreducción donde el oxígeno molecular es un sustrato oxidante eficiente llevando a la producción de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno (Kellog, *et al.* 1975) y la proporción con que se produce cada uno de estas especies oxigénicas va a depender del pH y PO_2 .



Las reacciones enzimáticas en las que se ha demostrado la presencia de radicales superóxido son numerosas y de naturaleza variada. El O_2 es el sustrato de oxidasas y oxigenasas dependiendo de si su reducción ocurre por la abstracción de un electrón de un sustrato (oxidasa) o al menos

parcialmente por interacción del electrón con un sustrato (incorporación O₂ por oxigenasas). Capaces de tomar un átomo de hidrógeno a ciertos compuestos orgánicos rompiendo de este modo un enlace covalente y transformando las moléculas poco reactivas en radicales libres prontos a reaccionar con el oxígeno. Oxidasas y oxigenasas son proteínas conjugadas, en cuyos grupos prostéticos aparecen flavinas, Cu y Fe. La actuación de estos grupos prostéticos como flavinas facilita a la enzima los factores necesarios para superar la inercia cinética del oxígeno, de varias formas:

- Primero, mediante una oxidación monovalente de una flavina reducida, que produce un radical flavin, conservando el spin cuando el aceptor es el oxígeno molecular.

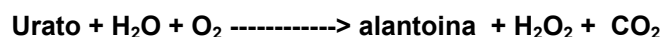
- En segundo lugar las flavinas poseen un bajo potencial de reducción, lo que dificulta su misión pro-oxidativa.

Otras oxidasas e hidrolasas son inhibidas por la superóxido dismutasa lo que sugiere que el radical superóxido es un intermediario enzimático en los mecanismos de transferencia electrónica como en el caso de la galactosa oxidasa, triptofano dioxigenasa y citocromo P-450 oxidasa.

La reducción monovalente del O₂ también es llevada a cabo por NAD(P)H oxidasas unidas a la membrana de granulocitos o macrófagos (Forman, *et al.* 1980; Gabig, *et al.* 1978).

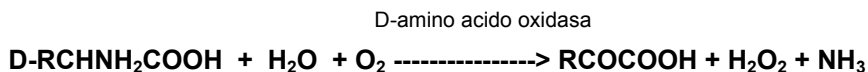


Refiriéndose al peróxido de hidrógeno bajo determinadas condiciones de pH, concentración de sustrato, etc, puede ser el producto final de reacciones catalizadas por enzimas como urato oxidasa, enzima peroxisomal que lo genera durante la conversión de urato a alantoina.



INTRODUCCIÓN

D-amino ácido oxidasa, enzima también peroxisomal genera peróxido de hidrógeno:



Al igual que la glicolato-oxidasa, L-hidroxiácido-oxidasa y monoamino-oxidasa.

Entre las oxigenasas, nos interesan especialmente las Ciclooxygenasa y lipooxygenasas que generan H_2O_2 durante su acción en la vía del Ác. Araquidónico , (Cross *et al.* 1987).

Producción no enzimática

Implica la autooxidación de determinados componentes celulares y extracelulares, como quinonas (Misra, 1972), catecolaminas y otras hormonas (Cohen, *et al.* 1974), autooxidación de tioles (Saez, *et al.* 1989), leucoflavinas (Ballon, *et al.* 1969), hidropterinas (Misra, 1971), hemoproteínas, como la oxihemoglobina, considerada fuente importante (Misra, *et al.* 1972), aminoácidos y metales de transición, que en las metalproteínas implican las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Bannister, *et al.* 1982).

La mayor fuente de producción de ROS en células intactas parece ser debido a la autooxidación de componentes reactivos químicos producidos durante procesos de reducción asociados con la cadena de transporte electrónico y microsomal (Cadenas, 1977; Chance, 1979;). El transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial implica la reducción secuencial de flavoproteínas, ubiquinona y citocromos mitocondriales. Aunque son dos los electrones transferidos desde el sustrato a la cadena respiratoria la reducción de la ubiquinona ocurre por la transferencia de un simple electrón para generar la ubisemiquinona que en gran parte será reoxidada por el complejo del citocromo **b**, pero parte puede reaccionar con el oxígeno molecular para generar radical superóxido (Cadenas, 1977). El anión

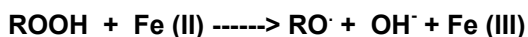
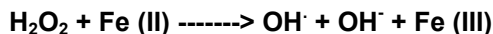
superóxido es el radical primario producido seguido por la producción secundaria de otros radicales por dismutación enzimática o espontánea.

La generación de H₂O₂ suele producirse en los perixosomas, produciendo una molécula de H₂O₂ por cada 2 de Carbono en el metabolismo de los ácidos grasos (Cross *et al.* 1987).

Debe de ser destacada la producción de radicales hidroxilo en las reacciones de algunas metaloproteínas reducidas con H₂O₂ (reacción de Fenton), y si el reductante es el radical superóxido, es una reacción de Haber-Weiss (Bannister, 1982).

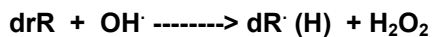
Otra fuente de ROS son los generados a partir de compuestos orgánicos como:

- Los peróxidos generados endógenamente como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o hidroperóxidos (ROOH). Estos compuestos peroxy pueden ser reducidos por las reacciones de Haber-Weiss en las cuales el ion ferroso y algunos de sus complejos actúan como donadores de electrones:



Estas reacciones son relativamente rápidas con una $k = 1.10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y no requieren una elevada concentración de Fe (II).

- Los radicales con un carbono activado, como son los radicales desoxiribosa generados en la reacción con el radical hidroxilo:



Producción exógena

En cuanto a la producción exógena, se refiere esencialmente a la aparición de ROS durante la oxidación de drogas en general, como el paracetamol y otros xenobioticos como el tetracloruro de carbono, paraquat, diquat aloxana y antibióticos tumorales de estructura quinónica como la adriamicina, rifamicina, daunomicina, menadiona, capaces de instaurar ciclos de oxido-reducción dando lugar a la producción de vários tipos de radicales orgánicos (Frenkel, K. *et al.* 1989; Trush, M., *et al.* 1991).

La génesis de estas especies ha sido relacionada con la aparición de los efectos adversos asociados, por ejemplo con los tratamientos quimioterápicos. Otros factores ambientales como humo del tabaco, radiaciones ionizantes (Bertsche, V., 1984), la luz solar, así como compuestos que oxidan grupos tiólicos han sido referidos como importantes fuentes potenciales de radicales libres.

Producción intra y subcelular

Como ya hemos visto, la producción de ROS durante el metabolismo celular es muy variada tanto en cuanto a los lugares de producción como a los mecanismos implicados.

El citosol (Chance, 1979), las mitocondrias (Loschen, G., *et al.* 1974) y los perioxosomas (De Duve, 1969) son los orgánulos celulares más importantes en la producción del radical superóxido y peróxido de hidrógeno. La producción por estos orgánulos puede variar con la concentración de enzima y la disponibilidad de substratos y cofactores (Boveris, *et al.* 1972).

El peróxido de hidrógeno puede atravesar las membranas biológicas y O_2^- pueden difundir a distancia desde el sitio de producción (Pryor, 1986); consecuentemente la generación de radicales por los compartimentos subcelulares pueden tener consecuencias para la viabilidad de la célula. La contribución al pool oxidante celular es modificada por los procesos enzimáticos como la dismutación del radical superóxido por la superóxido dismutasa mitocondrial y citosólica y la liberación del peróxido de hidrógeno por la catalasa en perioxosomas y por la glutatión peroxidasa en el citosol.

En el citosol se ha encontrado, que parte del H_2O_2 producido (aproximadamente el 5% del total celular) se debe a la acción de la xantina oxidasa (Xo) y la del aldehído oxidasa (Alo). La contribución por parte de la xantina oxidasa está verificada por la acumulación de su producto, ácido úrico, observado en homogenados después de la separación de las uricasas peroxisómicas. La producción debida a sustratos endógenos en hígado de rata perfundido comparado con hígado in situ sugiere que sustratos extrahepáticos también contribuyen a la producción de peróxido de hidrógeno.

La velocidad de generación de ROS por la mitocondria es dependiente de la presión parcial de Oxígeno y así en condiciones de presión de oxígeno normal, la cadena respiratoria mitocondrial, produce H_2O_2 y O_2^- en proporción del 1-4% del oxígeno total consumido, la cual se incrementa linealmente con los incrementos de la presión parcial de oxígeno. Un aumento en la media de la presión de oxígeno al nacer puede incrementar in vivo el radical superóxido y peróxido de hidrógeno por la cadena respiratoria.

De tal manera es así, que diversos estudios bibliográficos han podido demostrar que en situaciones normóxicas la producción de O_2^- justifica el 1-2% del consumo de O_2 por la mitocondria. Mientras que en medios hiperóxicos la mitocondria puede contribuir hasta un 25% de la producción de todos los ROS por el pulmón, observación que es congruente con la respuesta histológica, es decir agrandamiento de la mitocondria e hinchazón de su membrana interna que se observa en los comienzos de la lesión por oxígeno en los pulmones.

Como ya hemos destacado, es importante el papel jugado por la cadena de transporte electrónico en la generación oxidativa, demostrándose un incremento de la producción de O_2^- tras el aumento del H_2O_2 después de la adición en mitocondrias aisladas de varios sustratos metabolizables (Boveris, 1973).

El uso de inhibidores tales como antimicina A o cianuro que bloquean la transferencia de electrones en la cadena respiratoria llevan a un aumento en la concentración de intermediarios reducidos resultando en un incremento de la velocidad de producción del radical superóxido. Este hecho se ve apoyado por la medida de la producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias con y

INTRODUCCIÓN

sin depleción de ubiquinona, comprobándose que es la reacción que produce mayor cantidad de radical superóxido (Boveris, 1973).

Como ya se ha mencionado el radical superóxido puede también generarse por autoxidación de flavoproteínas deshidrogenasas reducidas en la cadena mitocondrial, aunque este mecanismo parece ser cuantitativamente menos importante que la reacción de la ubiquinona (Chance, 1979).

Las membranas mitocondriales son las fuentes fisiológicas de peróxido de hidrógeno, ya que partículas submitocondriales, obtenidas por sonicación o tratamiento alcalino, muestran producción de cantidades importantes de esta especie por unidad de tiempo.

La velocidad generadora mitocondrial de H_2O_2 , depende primariamente de su estado metabólico y así, en condiciones fisiológicas, la generación es elevada y se caracteriza por el alto grado de reducción de los transportadores de la cadena respiratoria, en especial el ADP. En mitocondrias de hígado de rata se ha visto que en presencia de sustratos como el NAD o el succinato, se generan aproximadamente de 0,3-0,6 nmoles H_2O_2 /min por mg de proteínas, lo que representa un consumo de un 2% del oxígeno total utilizado.

Por otra parte y en cuanto a la relación estrecha entre H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, se ha visto en estudios realizados con partículas submitocondriales de corazón de rata, que la formación de superóxido como producto primario de la reducción del oxígeno, se produce directamente en la cadena respiratoria.

En presencia de succinato y antimicina A, estas partículas liberan SOD, generando H_2O_2 , indicando que el superóxido es en efecto un precursor estequiométrico del peróxido mitocondrial.

Por consiguiente, la membrana mitocondrial debe producir cerca de 24 nmoles de superóxido /min/gr de tejido con un cociente $O_2^{\cdot-} / H_2O_2$ de 1,5-2,1. La producción de H_2O_2 va ligada al exceso generador de $O_2^{\cdot-}$ para mantenerlo en un nivel intramitocondrial aproximado de $8 \times 10^{-12} M$.

En un intento de identificar la fuente de equivalentes reductores para la generación del anión superóxido, se inhibió la succinato deshidrogenasa, por tratamiento alcalino. Como resultado se observó que NADH-ubiquinona

reductasa y ubiquinol-citocromo c reductasa, ambas con un componente común la ubiquinona dan lugar al radical superóxido y peróxido de hidrógeno.

1.3.3. Acciones de las especies reactivas del oxígeno.

Como normal atributo de la vida aeróbica, el daño estructural a componentes orgánicos es de una gran variedad (DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos) lo cual puede ocurrir como una consecuencia de reacciones de oxidación, y se define como la relación entre prooxidante/antioxidante balanceado en favor de la formación del primero (Sies, 1986).

El fenómeno de la toxicidad del oxígeno fué propuesto hace mas de un siglo por Bert al objetivar convulsiones en animales sometidos a presiones de oxígeno de 2 a 3 atmósferas, siendo posteriormente Gerschman *et al.* los que implicaron a los ROS en la toxicidad tisular de los Rayos X y del oxígeno.

Diversos procesos biológicos como inflamación, carcinogénesis, envejecimiento, daño por radiación y efectos fotobiológicos, parecen implicar la presencia de ROS (Lunec, 1990; Ames, 1989; Li 2002).

Aunque actualmente los mecanismos responsables del envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad todavía no están claros hay cada vez más evidencias de que el daño ejercido por ROS sobre el DNA así como la peroxidación lipídica están implicados.

El mecanismo de acción del estrés oxidativo se refiere en la actualidad al conjunto de consecuencias bioquímicas, que siguen a una superproducción de especies reactivas fundamentalmente oxigénicas, como resultado de un exceso de activación fagocitária, un incremento en la PO_2 o una intoxicación por xenobióticos inductores de la activación redox.

Como paso inicial, se produce el daño directo de estructuras clave para el mantenimiento de la viabilidad y función celular como DNA, lípidos, proteínas y carbohidratos. Bien directamente o como consecuencia de la degradación del DNA y activación de la poli(ADP)-ribosa sintetasa, se asegura la depleción de coenzimas como ATP, NADPH y glutatión reducido (GSH) necesarios para la

regulación de procesos metabólicos y actuación de importantes mecanismos antioxidantes y reparadores de la peroxidación lipídica molecular.

Sobre proteínas y aminoácidos

La reacción de los radicales oxigénicos con proteínas intracelulares es reciente y se transfiere a los compuestos que siguen un ciclo redox, al lado de los grupos tiólicos existen un gran número de sitios susceptibles de ser oxidados alterando la homeostasis del calcio (Di Monte, *et al.* 1984) llegando a la muerte celular. Especies reactivas oxigénicas pueden modificar la estructura de las proteínas, aumentando dicho daño la presencia de sistemas proteolíticos intracelulares.

La oxidoreducción reversible de los grupos tiol esta íntimamente relacionada con el estrés oxidativo. Así la alteración en el estatus tiol/disulfuro se ha visto que reduce distintos efectos biológicos, incluyendo cambios en las propiedades (k_m o V_{max}) de ciertas enzimas. Los aminoácidos son altamente reactivos con el radical hidroxilo (Stone, *et al.* 1988) con $k=10^9 - 10^{10}$ M.

Algunos aminoácidos presentan reacciones particulares, que puede ser reversibles, como la metionina presente en algunas enzimas, como la Lisozima, Pepsina, Ribonucleasa, etc., que puede oxidarse tras la acción del hidroxilo ó peróxido de hidrógeno sobre el sulfóxido dando sulfona y produciendo una pérdida de función del enzima, que revierte posteriormente. Sin embargo en otros aminoácidos como la Histidina o Triptófano, su escisión oxidativa es irreversible con inactivación del enzima.

Finalmente, la reacción de las proteínas con las ROS puede dar lugar a subproductos que aumenten el daño inicial (Martinez 2001).

Sobre carbohidratos

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical OH para producir sustancias reactivas (Sies1985; Blake 1987).

Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy (Greenwald et al 1984) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.

Paralelamente la glucosa se puede unir a las proteínas en el grupo amino terminal iniciando la glicación de las mismas dando productos altamente reactivos (productos de Amordi, de Maillard), (Wolf 1987).

Tanto la autooxidación como la glicación de proteínas son reacciones extremadamente lentas (requieren días o semanas) y son responsables en gran medida de las interacciones glucosa-proteína, interacciones muy importantes pues la formación y detoxificación de las ROS están moduladas por enzimas (SOD; Catalasa, GPX...), disminuyendo la acción de éstas y exagerando los efectos de aquellas.

Sobre lípidos

De entre los efectos biológicos más agresivos de los ROS, destacamos los producidos por los lípidos de la membrana, induciendo su desnaturalización y poniendo en peligro la viabilidad celular.

La autooxidación de los lípidos es quizás de las reacciones químicas descritas con más precocidad y así en 1820 Saussure describe el cambio del aspecto de los ácidos grasos tras el contacto con el oxígeno y Dam y Granados en 1945 indican el papel antiperoxidante de la vitamina E al observar que los peróxidos lipídicos se incrementaban en los animales con deficiencia de vitamina E.

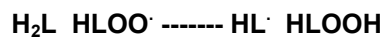
TABLA 6: EFECTO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA SOBRE ALGUNOS ASPECTOS DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS.

- 1.- Disminución del contenido de ácidos grasos (C20:4, C22:6, C18:2).
 - 2.- Formación de peróxidos lipídicos capaces de estimular o inhibir enzimas específicas asociadas con biomembranas.
 - 3.- Oxidación de grupos tiólicos que pueden afectar a las actividades enzimáticas y conformación de proteínas de membrana.
 - 4.- Disminución de la fluidez de las biomembranas.
 - 5.- Liberación de productos a nivel del foco de peroxidación capaces de producir efectos lesivos a distintos niveles.
-

Como consecuencia de la peroxidación lipídica (Tabla 4), se produce una alteración de la conductibilidad, fluidez, permeabilidad y transporte de las membranas celulares y ejemplo de ello son la hemólisis que sufren los eritrocitos sometidos a fuentes de estrés oxidativo o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes. Es sabido ya desde hace años que el acumulo de lipofucsina que tiene lugar con el envejecimiento de los tejidos es el resultado de la degradación peroxídica de estructuras en su mayoría lipídicas cuyos productos son retirados y almacenados de esta forma, mientras los mecanismos reparadores procurarán llevar a cabo su reposición.

La peroxidación lipídica presenta la característica de que es capaz de generar daño múltiple a partir de un único radical. Se inicia, por lo general, tras la abstracción de un átomo de hidrógeno en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados, cuya estructura divinilo-metano representa el punto de inicio del proceso peroxídico. A este evento desencadenante inicial, le siguen una serie de reacciones de propagación, ramificación y terminación, con la formación de intermediarios peroxídicos, que rápidamente dan lugar a especies mas estables.

La cadena de peroxidación lipídica del ácido linoleico (H_2L), considerado componente fundamental de la membrana, consiste en 2 reacciones:



$$K = 60 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ (Howard e Ingold, 1967)}$$

En cada paso de peroxidación de la cadena se forma un hidroperóxido HLOOH, mientras que el radical peroxil HLOO· aparece y desaparece de manera intermitente, debido a que los radicales peroxil pueden escapar del medio lipídico, difundirse hacia el DNA sin ser reducidos por biocomponentes y reaccionar con él, basado en las propiedades reactivas de azúcares y bases del DNA con el radical peroxil.

Este radical puede reaccionar con el DNA de tres formas:

1. Abstraer un H, con una velocidad menor de $k=60 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Simic y Taylor, 1987).
2. Adicionarse a dobles enlaces, proceso bastante lento incluso en las condiciones más favorables $k= 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.
3. Oxidar purinas y pirimidinas, reacción energéticamente no factible (Simic y Jovanovic, 1986).

Sobre el DNA

Conger y Fairchil fueron los que describieron por primera vez que los niveles de oxígeno presente en el aire podrían ser capaces de escindir parcialmente y de forma espontánea los cromosomas. Las especies reactivas oxigénicas reactivas como el radical superóxido, radical peróxido y el radical hidroxilo, muestran su capacidad de dañar el DNA en células "in vitro" (Marnett, 1987; Cochrane, 1991).

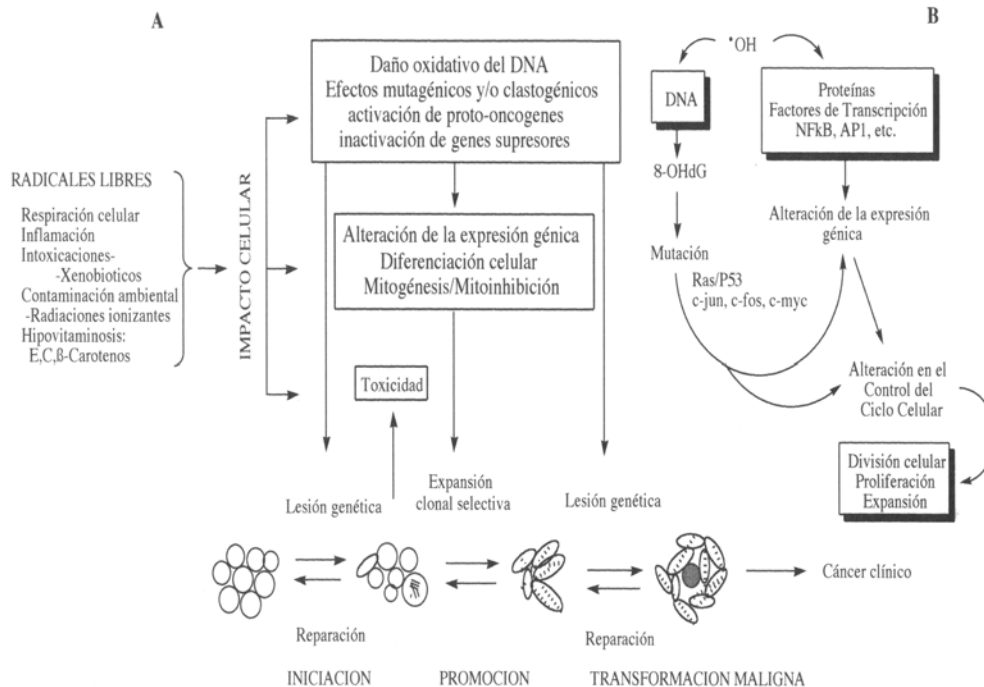
El espectro de las alteraciones oxidativas inducidas por estos radicales sobre el DNA es amplio, desde modificaciones oxidativas en la estructura de la desoxirribosa y bases nucleotídicas hasta la escisión parcial o total de la cadena con rupturas cromosómicas e intercambios de cromátides hermana, entre otras alteraciones cromosómicas. Como resultado de esta acción citotóxica, se producen diversos derivados de degradación y/o modificación oxidativa, cuya identificación y cuantificación, por técnicas cromatográficas, electroquímicas e inmunológicas, son utilizadas en el estudio de la interacción entre los radicales libres del oxígeno y del DNA.

Uno de los parámetros más conocidos del daño oxidativo sobre el DNA son las bases nucleotídicas modificadas, como son la timidina y timidina glicol, 5-hidroxi-metil-uracilo y 8-oxo-2-deoxiguanosina (ésta última, la más importante y representativa, *ver esquema del daño oxidativo del DNA*). Se produce casi con especificidad por la acción de los radicales hidroxilos, representando su cuantificación una medida bastante fiel de la formación de estas especies paramagnéticas tanto "in vivo" como "in vitro".

La transformación neoplásica "in vivo" de la 8-oxo-2-deoxiguanosina (8-oxo-dG) se estudió por primera vez en 1987 tras la administración de KBr_3 a ratas observándose que la formación de esta base modificada se localizaba en el riñón, donde tiene lugar de forma específica la acción cancerígena del bromuro potásico. Además se han estudiados otros agentes potencialmente cancerígenos inductores importantes de la formación de 8-oxo-dG.

La importancia de las modificaciones oxidativas del DNA en el proceso tumoral se puso de manifiesto cuando se observó que la presencia de 8-oxo-dG en las cadenas del DNA inducía errores en la replicación de éste, dando lugar a un espectro mutacional en los nucleótidos modificados y en aquellos que enfrentaban bases vecinas.

De esta forma se demuestra el poder mutagénico de los radicales hidroxilo y por lo tanto su potencial cancerígeno



Esquema: Daño oxidativo del DNA

1.3.4. Sistemas defensivos antioxidantes.

El estrés oxidativo se conceptúa como el desequilibrio entre las actividades pro-oxidantes y las antioxidantes, ya que de entrada los radicales oxigénicos cumplen su misión determinada en el lugar adecuado. Ahora bien la supervivencia de las células aerobias precisa de mecanismos que contrarresten los efectos negativos de los ROS.

Este sistema defensivo actúa tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Así, a nivel fisiológico el primer obstáculo que presentan los organismos superiores a la acción del oxígeno se localiza precisamente en el mantenimiento de los niveles tisulares apropiados de este gas, siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas. En este aspecto, el sistema microvascular que irriga los diferentes tejidos juega un papel decisivo respondiendo, ante un aumento de la presión parcial del oxígeno sanguíneo, con la disminución del flujo en órganos como el cerebro, riñón y otros, pero no

INTRODUCCIÓN

en el pulmón. Por otra parte, también contribuyen a la regulación de la concentración del oxígeno tisular la distancia intercapilar, relativamente amplia en tejidos de considerable actividad metabólica y funcional como el cerebro o el corazón donde la tensión del gas cae de uno a dos órdenes de magnitud con respecto a la sangre arterial.

Desde el punto de vista bioquímico, la defensa contra la acción citotóxica de los radicales libres consiste esencialmente en la aportación antioxidante de las células tisulares. Se ha propuesto una terminología que introduce una diferenciación entre defensas antioxidantes primarias (mediante mecanismos no enzimáticos y enzimáticos) y secundarias o coadyuvantes.

En el grupo de defensas primarias se incluyen diversos tipos de moléculas antioxidantes no enzimáticas como vitaminas (ác. ascórbico, alfa tocoferol, β -caroteno), flavinas, glutatión reducido y ácido úrico. Su acción defensiva dependerá de una interacción directa sobre la especie reactiva, para rendir complejos estables o de menor reactividad. También se incluyen defensas enzimáticas como la DT-diaforasa y una tríada de reacciones enzimáticas catalizadas respectivamente por la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Su eficacia reside en una triple acción defensiva, al disminuir la producción de especies oxigénicas, impedir la interacción de éstas entre sí para dar lugar a especies de mayor reactividad y reparar la peroxidación de macromoléculas.

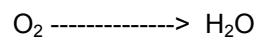
En el grupo de elementos secundarios o coadyuvantes se encuentran enzimas proteolíticas y lipolíticas y sistemas reparadores de DNA como N-glicosilasas que reconocen bases oxidadas del DNA, endonucleasas y poli (ADP) ribosa transferasa (Teebor *et al.* 1988; Beimer, 1990).

Por su acción de secuestro sobre determinadas moléculas paramagnéticas, se les denomina "scavenger" de radicales libres. Junto a estos se encuentran otros compuestos como el manitol, la tiourea, el etanol y el DMPO que exhiben propiedades estabilizadoras importantes.

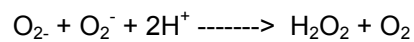
FIGURA 3: MECANISMOS DEFENSIVOS EN LA TOXICIDAD DEL OXIGENO.

A) A NIVEL TISULAR: mantenimiento de la presión parcial del oxígeno por el sistema microvascular. Vasoconstricción arteriolar.

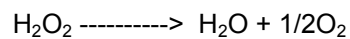
B) A NIVEL CELULAR : 1.- Citocromo Oxidasa



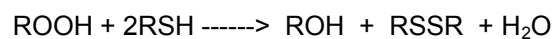
2.- Superóxido Dismutasa (SOD)



3.- Catalasa



4. Peroxidasa (Glutation Peroxidasa)



C) SCAVENGERS :

Alfa Tocoferol
Ácido Ascórbico
Beta-Caroteno
GSH
Coenzima
Manitol
Etanol
Tiourea
etc...

1.3.4.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos

El sistema antioxidante enzimático lo forman un conjunto de enzimas que muy posiblemente están presentes en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno. Este sistema está representado principalmente, por la triada enzimática Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutathion peroxidasa.

SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

El estudio de la SOD (Superóxido: superóxido óxido-reductasa E.C.1.15.1.1.), empezó en 1938 cuando Mann y Keilin describieron una proteína azul-verde, sin actividad catalítica aparente, que aislaron de sangre de buey con un peso molecular aproximado de 35.000 Daltons y que contenía 0,38% de cobre, a la cual le denominaron hemopreína.

Posteriormente, en 1953, fue aislada una proteína similar del hígado de caballo a la que se denominó hepatocupreína que, al igual que la anterior, no detectaron ninguna actividad catalítica, circunstancia que les hizo suponer que era una proteína que almacenaba cobre.

La función de la proteína fue desconocida hasta que McCord y Fridovich en 1969, observaron la reducción del citocromo c por el radical superóxido generado por la reacción xantina/xantina oxidasa, y descubrieron que la hemocupreína de función desconocida inhibía esta reacción al catalizar la dismutación del O_2^- y así la denominaron superóxido dismutasa.

El aislamiento y purificación de ésta permitió comprobar que además de Cu llevaba Zn.

Posteriormente, Fridovich en 1974 observó que esta enzima existía como una familia de metalo-proteínas donde, además de la SOD Cu-Zn, presente en células eucariotas se aislaron otras dos enzimas, una que se encuentra en mitocondrias y en procariotas y otra en procariotas que contiene en su centro activo Mn y Fe respectivamente. Ambas mostraron tener similitudes en la composición de aminoácidos y su comportamiento frente a determinados reactivos permitió distinguir distintos isoenzimas:

- El cianuro inhibe el Cu-Zn pero no el Mn
- El producto de la reacción, el peróxido de hidrógeno, inhibe a el Cu/Zn y Fe pero no el Mn
- La azida inhibe las isoenzimas en grado diferente Fe>Mn>Cu-Zn.

La evolución de SOD está probablemente conectada directamente con la progresiva oxigenación de la atmósfera; así, cambios en las condiciones geoquímicas de la tierra llevaron a la necesidad de desarrollar mecanismos de defensa antioxidante en los organismos vivos (Bannister, W.H. *et al.* 1991). Esta enzima representa la primera línea de defensa contra la toxicidad del oxígeno. Su reactividad resultó ser indispensable no sólo en ambientes aeróbicos, sino también en los anaeróbicos. La evolución de SOD como una metaloproteína está directamente conectada con el modo en que aparecieron los metales de transición en la biosfera.

La superóxido dismutasa se encuentra en todos los organismos tolerantes al oxígeno, comportándose como la primera línea de defensa, al proteger a los organismos contra los efectos tóxicos del radical superóxido al catalizar su dismutación a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Esta reacción ocurre a través de la reducción y oxidación alternativa del ión metálico en el centro activo (Cu, Mn, o Fe) dando como total de la reacción (Fridovich, I., 1978; Crapo, J. *et al.* 1978):



Aunque el radical superóxido es inestable en un medio acuoso y espontáneamente dismuta a oxígeno molecular y a peróxido de hidrógeno, (a pH 7,4 la velocidad de dismutación espontánea esta alrededor de $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fridovich, I., 1974), sin embargo, esta dismutación sin catalizar implica la reacción directa de dos moléculas de superóxido, las cuales están sometidas a repulsión electrostática por la presencia de los dos aniones. In vivo la velocidad de dismutación sin catalizar está también afectada por la baja concentración de la superóxido (10^{-10} M). La SOD resuelve este problema por la reducción y

INTRODUCCIÓN

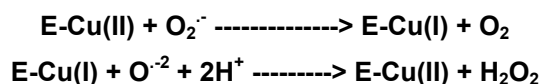
oxidación alternante del enzima durante sucesivos encuentros con el superóxido, de modo que cataliza la transferencia de electrones entre dos aniones superóxido sin que se requiera la interacción directa. Si se compara la constante de velocidad para la dismutación espontánea con la reacción enzimática a pH fisiológico, la enzima incrementa la velocidad 10,000 veces.

1. Superóxido Dismutasa Cu/Zn (SOD Cu/Zn)

Es una enzima citoplasmática, termoestable, predominantemente encontrada en eucariota, que protege a las células contra los efectos tóxicos del radical superóxido procedente del metabolismo aeróbico.

Es un homodímero con un peso molecular de cerca de 32,000 Daltons. Cada subunidad contiene 153 aminoácidos (dependiendo de las especies) con un ión Zn y un ión Cu en su centro activo. Ambas subunidades están asociadas solamente por interacciones no covalentes.

La ecuación para el mecanismo de SOD Cu-Zn ha sido determinado por radiolisis pulsátil (Rotilio, *et al.* 1972) e implica unas reacciones alternantes de reducción y reoxidación del cobre por el radical superóxido en una reacción "ping pong" para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno:



El ion Cu, cofactor esencial en la catálisis es cíclicamente oxidado y reducido durante sucesivos encuentros con superóxido. El Cu (II) acepta un electrón de un radical superóxido para producir oxígeno molecular y Cu (I), y cede un electrón a un segundo radical superóxido que con dos protones produce peróxido de hidrógeno. La rápida velocidad de ambas reacciones $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ esta probablemente limitada por la disponibilidad del sustrato (Fielden, E.M. *et al.* 1974).

2. *Superóxido Dismutasa Mn (SOD Mn)*

Las células eucariotas además de SOD Cu/Zn, contienen en la matriz mitocondrial otra SOD la cual tiene manganeso en su sitio activo. Esta enzima es un homotetrámero cuyas subunidades tienen un peso molecular de 20.000 Daltons, (Ludwig, 1986).

Estudios con *Resonancia paramagnética de electrones (RPE)* han permitido ver que el Mn se encuentra en el centro activo del enzima como Mn (II), y la existencia de dos protones en las proximidades a este manganeso, correspondientes a moléculas de agua ligadas a este ión.

Estas moléculas de agua son reemplazadas por el radical superóxido durante la catálisis (Fielden, E.M. *et al.* 1974). El mecanismo catalítico de este enzima es similar al del Cu/Zn en el cual el metal activo es alternativamente reducido y reoxidado durante sucesivas interacciones con el radical superóxido. Esta enzima también se encuentra en procariotas.

3. *Superóxido Dismutasa Fe (SOD/Fe)*

Se encuentra en procariotas y está ausente en eucariotas. Tiene un peso molecular de 39.000 Daltons, contiene un átomo de Fe⁺³ por molécula y está compuesta por dos subunidades de igual tamaño. Su composición de aminoácidos es similar a la de la SOD Mn y su mecanismo de acción parecido a las anteriores, con secuencias de reducción y reoxidación de los metales (Yost, *et al.* 1973).

Por tanto, el ámbito de actuación de la SOD es muy amplio, puede hacerlo a nivel extracelular, pero fundamentalmente lo hace en el intracelular, en la mitocondria y compartimentos citosólicos.

La regulación de su producción es sensible tanto a la cantidad de oxígeno tisular, como a la producción de radical superóxido intracelular (Yu 1994; Turnes 2003).

CATALASA (CAT)

Fue reconocida como enzima altamente distribuida en la naturaleza por Loew en 1901. Fue aislada y obtenida en forma cristalina por Summer y Doence en 1937.

La catalasa (E.C. 1.11.1.6) en mamíferos es un homotetrámero con un grupo ferriprotoporfirina por molécula y con un peso molecular de 240.000 Daltons. La protohemina es el mayor componente estructural del sitio activo (un contenido del 1,1%) y, de hecho, es el principal determinante de la actividad y especificidad. Catalizan la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular:

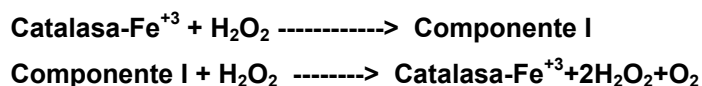


La velocidad de la reacción es rápida, con una constante de velocidad de $K = 10^7 \text{ sec}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

Durante su ciclo catalítico el hemo del centro activo sufre un ciclo alternante de oxidación y reducción durante sucesivos encuentros con el H_2O_2 . El enzima en estado oxidado, conocido como componente I, es una porfirina Fe (IV), lo que implica que durante la oxidación divalente del ferrihemo del centro activo por el peróxido de hidrógeno, un electrón se pierde del átomo de Fe central y el segundo de la porfirina.

Este componente I es un poderoso oxidante y podría ser reducido por otras sustancias aparte del H_2O_2 . Sin embargo, es altamente específico para este sustrato debido a la configuración del hueco donde se encuentra el grupo hemo, al cual sólo pueden acceder moléculas de pequeño tamaño.

El mecanismo catalítico que se postula es:



En esta ecuación el intermediario, componente I, es indudablemente un producto de la reacción de oxidación del Fe y peróxido; la tendencia de los

electrones del ion férrico a deslocalizarse a la periferia de la porfirina y probablemente hacia el peróxido puede variar extensamente, análogamente a la oxihemoglobina. Así un peróxido férrico ($\text{Fe}^{+3}\text{-HOOH}$) y una unión covalente ($\text{Fe}^{+5}=\text{O}$) proporciona ejemplos de no transferencia de electrones entre el donador, Fe^{+3} , y el aceptor H_2O_2 , por un lado, y la separación de carga completa por el otro.

El componente I, visto en células y tejidos, implica la transferencia de dos electrones desde el hierro al peróxido y así éste es reducido y puede ser disociado. El componente I puede tener ya un precursor no detectado, tal como el $\text{Fe}^{+3}\text{-HOOH}$, conteniendo ión férrico y el peróxido molecular sin alterar y debe tener una corta vida.

GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px)

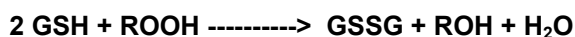
La Glutación peroxidasa: Glutathione: H_2O_2 oxireductasa (EC 1.11.1.9) fue descrita en 1957 por Mills, como enzima eritrocitaria que "protegia" a la hemoglobina de su ruptura oxidativa. Años más tarde, en 1973, Ronneck, comunicó la protección que sobre los glóbulos rojos producía ante los daños oxidativos de los radicales libres del oxígeno.

Es una macromolécula cuyo peso molecular se sitúa alrededor de 85.000 Daltons. Está formada por cuatro subunidades aparentemente iguales y contiene cuatro átomos de selenio. Forstrom en 1978, identificó en el lugar activo de la glutación peroxidasa la conjugación selenio-cisteina, que es esencial para su actividad sobre el substrato, incluyendo cambios de naturaleza redox.

La glutación peroxidasa es responsable de la eliminación del peróxido de hidrógeno en lugares con bajos contenidos en catalasa o sin catalasa; por lo tanto, se encuentra en el citosol y en la matriz mitocondrial, mientras que la catalasa es más abundante en microsomas, peroxisomas y núcleos, lugares donde la glutación peroxidasa es difícil de encontrar.

INTRODUCCIÓN

Catalizan la reducción dependiente de Glutación (GSH) de hidroperóxidos producidos durante la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y del H₂O₂:



La reducción del peróxido de hidrógeno o hidroperóxido a agua tiene lugar a expensas de la oxidación del GSH. Es altamente específica para su donador de hidrógeno, el GSH, y no es específica para el sustrato, extendiéndose el rango de sustratos desde el peróxido de hidrógeno a hidroperóxidos. La velocidad de la reacción viene dado por la concentración de GSH y es independiente de la naturaleza del hidroperóxido. La constante de velocidad para la reacción de la glutatión peroxidasa reducida con el H₂O₂ es similar a la de la catalasa.

Bajo el punto de vista de su actuación sobre los hidroperóxidos esta enzima puede estar involucrada en varios hechos metabólicos como son:

- Scavengers o secuestradores de H₂O₂ de compartimentos bajos en actividad catalásica.
- Mutagénesis inducida por hidroperóxidos.
- Protección de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares.
- Biosíntesis de prostaglandinas.
- Regulación de la síntesis de prostaciclina.

Su actividad se modifica por diversos factores, tales como la edad, el sexo, factores nutricionales y ambientales (exposición a ozono) o ingestión de lípidos peroxidados. En estudios realizados en ratas con dietas deficitarias en selenio, se observa una disminución de la actividad de la enzima (Flohé, L. *et al.* 1973).

1.3.4.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.

Los primeros estudios de antioxidantes datan de 1922 cuando los químicos franceses Moreau y Dufraise encontraron que algunos productos eran efectivos para frenar el estrés oxidativo. Este descubrimiento constituye la primera aplicación práctica en el uso de hidroquinonas, añadidas en pequeñas cantidades, para prevenir la explosión espontánea de detonadores.

El estudio de los antioxidantes se ha aplicado en el campo industrial como por ejemplo el uso de sustancias para la preservación de alimentos, con la finalidad de evitar su enranciamiento (producción de lipoperóxidos).

En los últimos años se ha prestado una gran atención al uso de estos antioxidantes como agentes con ciertos fines terapéuticos (Borok, Z. *et al.* 1991; Greenwald, A. 1991). Cabe resaltar las propiedades anticarcinogénicas, que pueden ser atribuidas, al menos en parte, a sus habilidades de neutralización o "secuestradores" de los radicales libres.

Así los antioxidantes localizados en la fracción citosólica o fluidos extracelulares, como los localizados en membranas lipídicas, actúan como anticarcinogénicos en potencia que interrumpen los procesos de los radicales libres responsables de la carcinogénesis (Terao, *et al.* 1988).

Dentro de los sistemas antioxidantes uno de los más estudiados en los últimos años, es el GSH, ya que se ha comprobado que tiene una implicación directa en diversos procesos patológicos.

GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)

El Glutatión (-Glu-CysH-Gly) está altamente distribuida en tejidos animales, plantas y microorganismos. Normalmente se encuentra presente a altas concentraciones (0.1-10 mM) y es el tiol más abundante, llegando a constituir en algunas células, más del 90% del total de sulfuros no proteicos. El GSH fue aislado hace cien años y su estructura fue establecida por Meister en 1935.

En general, los grupos sulfidrilo son altamente reactivos y pueden participar en diferentes tipos de reacciones, tales como oxidación e intercambio de tioles disulfuro. Todas estas reacciones pueden implicar la modificación de

INTRODUCCIÓN

proteínas tiólicas, como consecuencia de su interacción con intermediarios reactivos formados durante el metabolismo de químicos tóxicos. Estas modificaciones de tioles pueden ser particularmente importantes durante el estrés oxidativo (Di Monte *et al.* 1984).

Su síntesis es iniciada por la gamma glutamil transpeptidasa, enzima que se encuentra en la superficie externa de ciertas membranas celulares. Por la acción secuencial del d-glutamyl cisteína y GSH sintetasa es exportado al exterior de las células. (Meister, A., 1983 y 1985).

Gran parte de sus funciones se deben a la presencia del grupo tiólico reducido que le confiere la cisteína, el cual promueve su estabilidad intracelular. Se ha adaptado a través de la evolución para llevar a cabo diversas funciones y puede actuar tanto como regulador, mantenedor de procesos bioquímicos y fisiológicos, así como en la defensa celular contra las agresiones externas:

- Protege las células de los efectos tóxicos causados por componentes oxigénicos reactivos.

- Participa en mecanismos de catálisis, metabolismo, transporte y en reacciones implicadas en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, en los cuales, entre otras funciones, actúa como detoxificador de radicales libres y peróxidos.

- Forma conjugados con una variedad de componentes de origen exógeno o endógeno y es un cofactor de varios enzimas.

Juega un papel en la defensa celular contra intermediarios reactivos, donde además de su función como reductor en el metabolismo peroxídico de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos, forma complejos con metabolitos electrofílicos (Orrenius, *et al.* 1984; Saéz, G. *et al.* 1993). Participa en el metabolismo de la glutatión peroxidasa donde sirve como donante de un electrón, además de jugar un papel importante en la protección contra el daño ejercido sobre tejidos como resultado de la exposición a medios oxidantes como hiperoxia u ozono, además de proteger contra la radiación, luz ultravioleta y efectos fotodinámicos. Los intermediarios producidos durante la

destoxificación de xenobióticos, vía la reacción de la glutatión transferasa, están implicados en la carcinogénesis.

Como resultado de la formación excesiva de radicales durante el estrés oxidativo se observan cambios significativos en el estatus intracelular del glutatión (Thor, H. *et al.* 1982; Wefers, H., *et al.* 1983; Viña, J., *et al.* 1986; Saéz, G. *et al.* 1987), disminuyendo en la reducción peroxidásica del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos, como los lipídicos, formados por la dismutación de radicales superóxido o por abstracción hidrogénica de un ácido graso poliinsaturado respectivamente.

El mecanismo propuesto de actuación es:



Aunque el mecanismo no justifica la formación de sulfonato de glutatión, algunos investigadores describen la formación de éste como producto de oxidación (Finley, M. *et al.* 1981; Oae, S. *et al.* 1981).

La relación entre el glutatión y el balance homeostático de la salud ha recibido considerable atención en los últimos años y sus implicaciones en procesos patológicos, son estudiados intensamente en distintas áreas de la biomedicina. (Viña, J. *et al.* 1986; Meister, A. 1988; Saéz, G. *et al.* 1989, 1992).

Así se han ido desarrollando métodos para incrementar los niveles de GSH y proteger a la célula contra el daño oxidativo (Kurokawa, Y., *et al.* 1990; Muñiz, P. *et al.* 1994). Un ejemplo práctico de esto lo tenemos en que la aplicación del GSH exógeno es capaz de inhibir la mortalidad y nefrotoxicidad inducida con bromuro potásico, mientras que estos efectos tóxicos se ven incrementados cuando se induce la depleción del GSH (Kimie, S., *et al.* 1991).

En el campo de la nutrición también se destaca el papel que juegan los déficit nutricionales como factor predisponente al daño oxidativo, fundamentalmente en la disminución de los mecanismos antioxidantes. Esta disminución afecta tanto a enzimas como a sustratos antioxidantes. Por lo tanto el estado nutricional del animal de experimentación debe de tenerse en cuenta a la hora de sacar conclusiones sobre los mecanismos generadores de

INTRODUCCIÓN

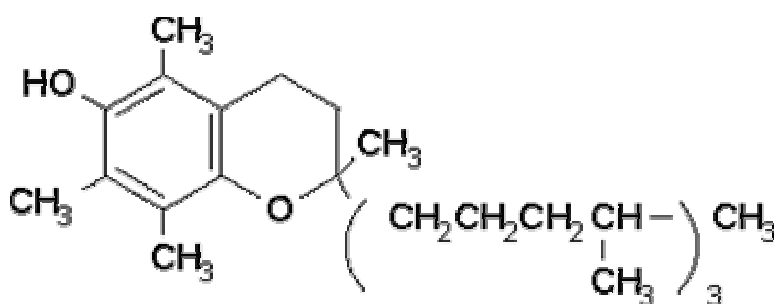
radicales libres y sus efectos sobre los sistemas biológicos (Slater, F. *et al.* 1990; Godin, N. *et al.* 1988).

Como en nuestro estudio hemos utilizados aceites vegetales de oliva y maíz especialmente ricos en tocoferol, haremos a continuación una actualización de la importancia nutricional y la capacidad antioxidante de la vitamina E.

VITAMINA E

En 1922, Herbert Evans y Bishop fueron los primeros en identificar un compuesto liposoluble en los aceites vegetales que resultó ser esencial para la fisiología reproductora de las ratas de laboratorio, y al que denominaron tocoferol. Sure, en 1924, denominó a este factor *Vitamina E*. Posteriormente se descubrió que también se encontraba en otros alimentos como germen de trigo, alfafa y lechuga y aparece siempre en forma de ésteres de tocoferol. En 1936, Evans consiguió aislar la vitamina y en 1938, Fernholz dilucida la estructura química del alfa tocoferol.

FIGURA 04: ESTRUCTURA DE LA VITAMINA E.



Existe en las plantas, al menos ocho formas isoméricas de tocoferoles que forman parte de nuestra ingesta alimentaria; todas estas formas se diferencian por la posición de diferentes grupos metilo en el anillo fenólico y en la cadena lateral de la molécula. El grupo hidroxilo del anillo fenólico puede estar eterificado, pero ha de desesterificarse para que el compuesto manifieste actividad vitamínica.

De todas estas formas isómeras es el α -tocoferol el predominante en muchas especies, siendo a su vez la forma activa biológicamente, así como el mejor antioxidante liposoluble en células de mamíferos y sangre (Kiyose C *et al.* 1997) y (Leger CL., 2000).

Las otras formas naturales de vitamina E (β , γ , δ -tocoferoles y los cuatro trienoles) no contribuyen a la satisfacción de los requerimientos vitamínicos porque, aunque se absorben, no se produce la conversión en α -tocoferol en humanos. Además se reconocen muy pobremente por la proteína de transferencia hepática (α -TTP). Por ello, las ingestas recomendadas se basan solamente en la forma α -tocoferol de vitamina E.

Los tocoferoles, en general, están presentes en los aceites vegetales (girasol, maíz, etc.). Asimismo se encuentra en granos de cereales, alimentos de origen vegetal y en el tejido adiposo de los animales. En las plantas se localiza principalmente en las hojas y partes verdes.

Durante el procesamiento, almacenaje y preparación de los alimentos, ocurren pérdidas considerables en el contenido de vitamina E, siendo la fritura, asado o cocción a fuego lento cuando se producen las mayores pérdidas de esta vitamina, al existir un mayor contacto con el calor y el oxígeno (Mataix J, Ochoa J, 2002).

La vitamina E es muy utilizada como aditivo para proteger alimentos con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de los procesos de enranciamiento (Gassman B., 1995).

1. Digestión, absorción y metabolismo

La vitamina E sigue el mismo proceso de absorción que otras vitaminas liposolubles en la mucosa intestinal, disuelta en las grasas alimentarias, lo que hace que su digestión y absorción dependan de una buena funcionalidad biliar y pancreática. La vitamina pasa por el torrente linfático unido a los quilomicrones, llega al hígado y a partir de aquí se distribuye a todo el organismo vía lipoproteínas plasmáticas, acompañando a los triglicéridos y demás lípidos (Linder M. 1991).

La mayor parte de la vitamina E en el plasma sanguíneo se encuentra en las lipoproteínas de baja densidad (Bjorneboe A. *et al.* 1990) y (Fitó M. *et al.* 2000). Su principal función consiste en neutralizar los radicales libres, originados por procesos metabólicos o bien por contaminantes (metales pesados, humo), e impedir que reaccionen con los ácidos grasos poliinsaturados, desencadenando una serie de reacciones oxidativas.

No parece existir un órgano concreto para el almacenamiento de la vitamina E, siendo posiblemente el tejido adiposo la principal reserva, aunque la liberación de esta vitamina desde este tejido es muy lenta. En el hígado existe también una cierta capacidad de depósito para la vitamina E pero, dado el rápido *turnover* o movilización que allí ocurre, la citada capacidad es pequeña. Otro órgano donde se puede almacenar es en el tejido muscular. Realmente, el tocoferol absorbido se distribuye ampliamente por todos los tejidos y células sanguíneas incorporándose a las membranas de las células junto al colesterol y los fosfolípidos (Mataix J, Ochoa J, 2002).

2. Efectos fisiológicos

Sin lugar a dudas la principal función fisiológica de esta vitamina es la de actuar como un poderoso antioxidante, siendo el mejor antioxidante liposoluble en células de mamífero y sangre. Las acciones a ella atribuidas como estabilizador de membranas celulares, agregación plaquetaria, efecto protector ante la hemólisis, modulador de la actividad de ciertas enzimas, etc., probablemente sean consecuencia de esta capacidad antioxidante. No obstante, lo cierto es que en la actualidad aún no se conocen completamente

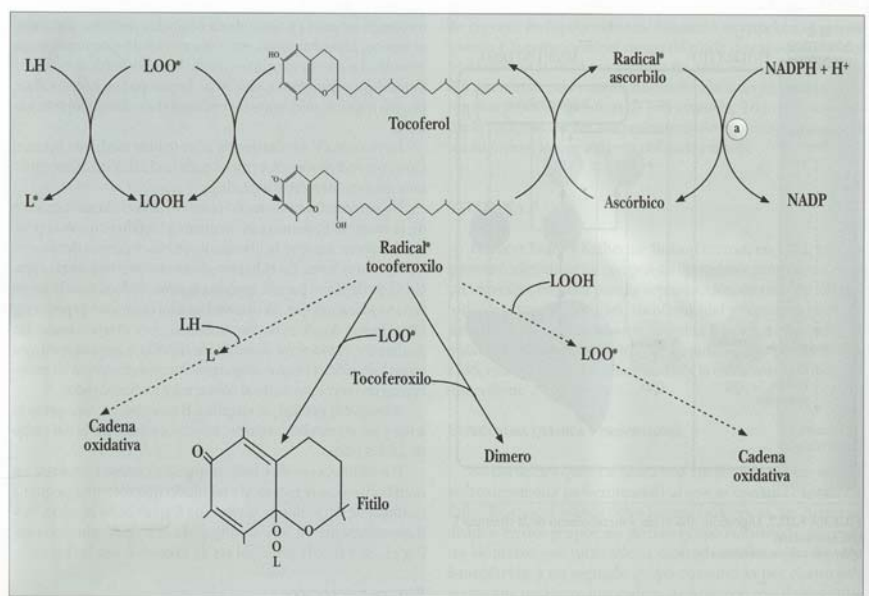
los mecanismos de acción de esta vitamina, aceptándose que existen otras posibles vías de actuación para explicar su diversidad.

3. Capacidad antioxidante

Como se acaba de indicar la capacidad antioxidante es, sin duda, la principal función biológica de esta vitamina, siendo numerosos los estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que demuestran que el α -tocoferol actúa como un potente antioxidante lipofílico (Porta P *et al* 1991) y supresor del daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos, mediante la eliminación de radicales libres, tales como oxígeno singlete, radical superóxido, radical hidroxilo y radical peroxilo (Neuzil J *et al.* 1997) y (Halliwell B, 2000).

La vitamina E actúa como agente reductor en su mecanismo de inhibición de la oxidación, especialmente de lípidos, siendo la actuación del α -tocoferol la mejor establecida. Así, en lo que respecta a la cadena de propagación de la peroxidación lipídica, es a nivel del radical lipídico (LOO \cdot) donde lleva a cabo su acción, eliminándolo e impidiendo que continúe la cadena y por lo tanto la formación de nuevos radicales (Mataix J *et al.* 2002).

FIGURA 05: VÍAS SEGUIDAS POR EL RADICAL TOCOFEROXILO.



Fuente: Mataix J et al, 2002

Figura 05: Vías seguidas por el radical tocoferoxilo. (Las vías señaladas con guiones son las posibles vías prooxidantes)..

a) de modo semejante el ácido ascórbico puede actuar el glutatión y el CoQ.

Durante esta reacción se forma radical α -tocoferoxilo, que es un radical libre, el cual puede seguir varias vías:

- Reaccionar con otro radical peroxilo (LOO^\bullet), generando un aducto, que ya no es un radical libre.
- Reaccionar con otro radical de tocoferoxilo y dar un dímero, que tampoco es un radical libre.
- Ser reducido por un reductor como puede ser la vitamina C, ubiquinol (CoQ) o glutatión, regenerándose el α -tocoferol.

Pero también puede ocurrir que el radical tocoferoxilo pueda sustraer un átomo de hidrógeno de lípidos (LH) o hidropéroxidos (LOOH), dando lugar a la formación de un radical lipídico (L^\bullet) o peroxilo (LOO^\bullet), respectivamente, lo que pone de nuevo en funcionamiento la cadena de propagación, mostrando la

vitamina E en este caso una actividad prooxidante (Halliwell B, 2000) y (Keaney JF, 1994).

La potencia de la vitamina E como antioxidante va a depender de estas reacciones competitivas. Así, existen estudios en los que esta vitamina ha mostrado una capacidad prooxidante, aunque al parecer esta actividad *in vivo* no es tan importante, debido a la actuación de agentes reductores como ascorbato, ubiquinol y glutatión, que regeneran rápidamente el tocoferol, impidiendo la reacción del radical tocoferoxilo con lípidos o hidroperóxidos (Kagan, V. *et al.* 1900 a-b).

Se ha observado que la deficiencia en vitamina E da lugar a alteraciones estructurales en las membranas biológicas, por lo que el mantenimiento de las mismas por parte de esta vitamina podría ser debido en parte a la acción antioxidante al proteger las membranas del ataque de los radicales libres, los cuales alteran la estabilidad de la misma, pero también podría ser consecuencia de la existencia de interacciones fisicoquímicas de los grupos metilo del tocoferol con los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos.

Además de las propiedades antioxidantes y anti-radical libre, la vitamina E participa en la síntesis del grupo hemo de las proteínas hemínicas, tales como la catalasa (enzima antioxidante ya descrita como eliminadora de hidroperóxidos). Es conocido que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados producen deficiencias de vitamina E y, por otro lado, como antes se ha citado, que la catalasa está directamente relacionada con ella. Es probable que estos ácidos grasos produzcan efectos perjudiciales sobre el equilibrio *oxidación-antioxidación*, al provocar aumento de radicales libres en cascada peroxidativa lipídica y secundaria disminución de “*scavengers* o *secuestradores*” tales como la catalasa y la vitamina E por aumento de su consumo. La oxidación de estos ácidos grasos determina un aumento de las necesidades de catalasa y, secundariamente de vitamina E, con el fin de recuperar el estado de equilibrio (Halliwell B, 2000).

Otro aspecto de gran importancia, desde el punto de vista aterógeno e inmune, es la participación de la vitamina E en el metabolismo del ácido

araquidónico y la formación de tromboxanos, prostaglandinas y prostaciclina. El metabolismo del ácido araquidónico a través de las enzimas lipooxigenasa y ciclooxigenasa, involucra reacciones mediadas por radicales libres, existiendo evidencias de una disminución, por parte de la vitamina E, en la actividad de la 5-lipooxigenasa, así como reducción de la síntesis de tromboxanos e incremento de prostaciclina. Estos cambios en la síntesis de ambos componentes, podrían explicar la inhibición por parte de la vitamina E de la agregación plaquetaria, al ser estos compuestos los mayores determinantes de dicha agregación (Vericel E. *et al.* 1992; Mataix J, Ochoa J, 2002) y (Brzosko S *et al.* 2002).

4. Requerimientos nutricionales

Los requerimientos de la vitamina E dependen en gran medida de otros factores nutricionales, que determinan mayores o menores ingestas de esta vitamina, destacando los siguientes:

- a. *Ingesta de ácidos poliinsaturados.* Un incremento de consumo de aceites vegetales, especialmente los de mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados (girasol, maíz, etc.), implica una mayor demanda de esta vitamina, como consecuencia de su función antioxidante. En este sentido se recomienda una ingesta 0,4 mg de tocoferol por cada gramo de ácido graso poliinsaturado (Barrionuevo, M. y Fornos, J. A. 1993).
- b. *Contenido en selenio y aminoácidos azufrados alimentarios.* Otro factor que altera los requerimientos de esta vitamina es el contenido en selenio y aminoácidos azufrados en la dieta, compuestos que participan en el sistema antioxidante del glutatión, lo que significa que alta ingestas de estos nutrientes mantienen activo este sistema y por lo tanto existe un ahorro de tocoferol.
- c. *Situaciones de estrés oxidativo.* También hay que tener en cuenta que la ingesta vitamínica se debe incrementar en situaciones en las que exista un fuerte estrés oxidativo (situaciones de oxigenoterapia,

frecuente e intensa actividad física, etc.), como consecuencia del mayor gasto de la misma.

En humanos, el deficiente aporte dietético en vitamina E normalmente tarda mucho tiempo en manifestarse, y se ha relacionado con enfermedades degenerativas como síndrome neurológico progresivo (Sokol RJ. 1988), el cáncer, la aterosclerosis y otras formas de enfermedades cardiovasculares. La ingestión diaria recomendada de vitamina E varía de unos países a otros, de 8 a 10 mg de equivalentes de α -tocoferol (National Research Council. RDA, 1989).

Un aumento de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en la dieta se ha observado que disminuye el nivel de vitamina E en corazón, hígado, tejido adiposo y plasma; en cambio, el nivel de vitamina E en cerebro no se modifica por las distintas dietas (D. Aquino, M. *et al.* 1991; Javouhey-Donzel A. *et al.* 1993).

Mediante la utilización de biopsias se puede tomar muestra de tejido adiposo y estudiar la existencia y concentración de diferentes antioxidantes. El nivel de vitamina E del tejido adiposo está fuertemente asociada con su ingesta alimentaria y no existe variación sistemática del contenido de vitamina E en el tejido adiposo de diferentes localizaciones; la concentración total de tocoferol en este tejido varía ampliamente (hasta 11 veces), siendo el α -tocoferol el más abundante, aproximadamente un 80% del total (Packer, L. 1988).

Estudios realizados en animales a los que, mediante ligadura del conducto biliar, se les crea una ictericia obstructiva revelan una disminución de los niveles hepáticos de enzimas antioxidantes principalmente la glutatión peroxidasa (GPx), así como del selenio sérico y la vitamina E plasmática y hepática y un marcado aumento del nivel del malondialdehído (MDA) en suero (Santos, M. 1980).

Esto sugiere un cambio en el equilibrio prooxidante/oxidante a favor de la peroxidación lipídica. Es posible que el origen de estos cambios sea la disminución del selenio y de la vitamina E por problemas de absorción intestinal (Singh, S. *et al.* 1992).

INTRODUCCIÓN

Numerosos artículos se han centrado en los efectos que tiene la suplementación dietética de antioxidantes sobre la peroxidación lipídica, ya que estudios epidemiológicos realizados en la población europea han demostrado una asociación inversa entre la mortalidad por cardiopatía isquémica y las concentraciones plasmáticas de antioxidantes (Gey, F. *et al.* 1991) y (The Heart Outcomes Prevention Evaluation Studies Investigators, 2000).

Investigaciones en las cuales la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares (ECV) se correlacionan inversamente con los valores plasmáticos de vitamina E, sirvieron para proponer a esta vitamina como factor protector de ECV (Prior WA, 2000).

Los procesos oxidativos están implicados en el desarrollo y en la expresión clínica de las enfermedades cardiovasculares. Evidencias experimentales y epidemiológicas indican que las dietas con elevado contenido antioxidante se asocian con un menor riesgo o progresión de enfermedad coronaria. La mayor incidencia de enfermedad aterosclerótica asociada con dietas pobres en vitaminas antioxidantes resalta la importancia de generalizar los regímenes con alto contenido en dichos compuestos (Rimm EB *et al.* 2000 y Lahoz Rallo *et al.* 2000).

Por consiguiente, si bien la utilidad de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades cardiovasculares precisa confirmación y diversos estudios sugieren que estas sustancias son seguras y eficaces, parece prudente en el momento seguir la recomendaciones de la Asociación Americana del Corazón, que recomienda para la población general el consumo de una dieta equilibrada, rica en frutas y vegetales como fuente de antioxidantes (Krauss RM, 2000 y Frank J, 2005).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el estudio del metabolismo oxidativo en animales alimentados con *dietas líquidas control*, de composición definida, en las que únicamente varía el tipo de lípidos y se mantienen las mismas proporciones en macronutrientes y energía.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Describir las modificaciones de los sistemas antioxidantes (SOD, CAT, GPx y el metabolito GSH) inducidos por la dieta a base de aceite de oliva y maíz, en distintos tipos de tejidos.
- Estudiar el índice de peroxidación lípidica por la producción de Malondialdehído (MDA).
- Evaluar el efecto “in vitro” de la dieta con aceite de oliva ó maíz sobre distintos marcadores de estrés oxidativo y estado redox en hepatocitos aislados de rata.
- Valorar “in vivo” el efecto comparativo de estos dos tipos de aceites sobre productos de oxidación molecular la 8-oxo-2’ deoxiguanosina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Animales

Se utilizaron ratas machos de la raza albina Wistar procedentes del animalario de nuestro laboratorio. Estos animales tras el período de lactancia, fueron alimentados con dieta sólida de laboratorio descrita posteriormente. Los animales cuando alcanzaron pesos comprendidos entre 150-180 gramos fueron sometidos a los distintos tratamientos dietéticos.

El animalario fue provisto de un sistema de regulación de temperatura a 25°C, humedad del 60% y de un control de exposición a la luz que nos permitió fijar un fotoperíodo de 12 horas diarias, comprendido entre las 7:00 y las 19:00 horas. Los animales se albergaron individualmente ó de dos en dos en jaulas de plástico especialmente diseñadas (Panlab- Barcelona), utilizando viruta de madera liofilizada como material absorbente. Los animales fueron agrupados en dos grupos de acuerdo con las dietas estudiadas: control oliva (CO), control maíz (CM).

Las dietas de aceite de oliva y maíz especificados más adelante, se suministraron en forma líquida durante 30 días, controlándose diariamente la ingesta y semanalmente el peso. Transcurrido este período los animales se sacrificaron por decapitación y/o la técnica quirúrgica de la perfusión, se procedió a la toma de muestra para las determinaciones analíticas.

3.1.2. Aparatos

La obtención de homogenados de las diferentes muestras analizadas se realizó en un dispositivo de tipo Potter-Evelheim, con émbolo de teflón e impulsado por un rotor Kika-Werk R wzodzm, modelo RW 20-DZM, provisto de control de velocidad de rotación.

Para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizaron las centrifugas Selecta Centromic RPM x 100, modelo S 577 y Heraeus Sepatech - Biofuge 17 RS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las ultracentrifugaciones se realizaron en una ultracentrifuga Kontron modelo TGA 65 y rotor de ángulo fijo TFT 7513.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un Shimadzu UV-160 y LKB Ultra Plus-4054 UV/Biochrom.

Otros instrumentos rutinarios utilizados han sido: pHmetro, marca Radiometer-modelo pH M83; balanzas de precisión: Precisa de Pacisa; agitador magnético:SBS, modelo Reax 2000; autoclave: marca Autester, modelo: S-437-G; baño unitronic termostatzado con agitación de ciclos regulables, marca: P/Selecta, modelo:320-OR; estufas, marca: Sampros de 0-80 °C y los microscopios: marca Zeiss, modelo 470914 y marca: Leitz, modelo Laborlux 11.

Como material para el aislamiento de hepatocitos se utilizaron: bomba peristáltica DASLO (Sandoz), modelo 261; termostato nivel Hacke Tipe FE, Haake instruments INC.; material quirúrgico adecuado; vaso de doble pared; otros instrumentos como: plataforma elevadora; Cámara Burkner; jeringuillas desechables; bandeja de disección; cánulas, matraces de distintos tamaños.

Congelador y Neveras Zanussi, Whirlpool, Philips.

Para estudiar los niveles basales del daño oxidativo inducido en el DNA digerido de hígado de rata, se midió la base modificada 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG), mediante HPLC-EC (High Pressure Liquid Chromatography). Waters ODS Columna (2.5x0.46 i.d.; 5µ de tamaño de poro. Detector de UV: modelo Waters 486. Detector E.C: ESA modelo 5100 Coulochem equipado con una cédula analítica modelo 5011. Integrador modelo 740 y registrador: ABB SE/20,

3.1.3. Productos Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de máxima pureza química (reagent grade), suministrados por Sigma Chemical Co., St. Louis Estados Unidos; Boehringer Mannheim, Alemania; Merck, Darmstadt - Alemania; Panreac (Montcada i Reixac-España).

Los *kits* utilizados en diversas determinaciones analíticas se obtuvieron de Boehringer Mannheim, Alemania, especificándose en cada caso su utilización.

Los productos utilizados en la elaboración de las dietas líquidas suministradas a los animales de experimentación se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos), indicándose en el correspondiente apartado sus características. La dieta sólida de laboratorio se obtuvo de LETICA S/A - Barcelona-España.

Los reactivos utilizados para análisis de 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) en DNA de hígado de rata fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Las bombonas de carbógeno (mezcla O₂+CO₂, 95:5 v/v) fueron provistas por Abelló. El agua bidestilada se obtuvo de Travenol y el agua desionizada de Ibys.

3.1.4. Componentes de las dietas

3.1.4.1. Dieta Sólida

Como dieta sólida no purificada control se utilizó la *Dieta IPM R-20*, comercializada por Letica S/A-Scientific Instruments (Barcelona-España), cuya composición proporcionada por el fabricante se expone a continuación, con la excepción de la cantidad de proteína bruta, que fue determinada en nuestro laboratorio, así como su cantidad de energía.

DIETA SÓLIDA: CONTROL

COMPOSICION	por 100 g
Proteína bruta	16.00 g
Materias grasas brutas	3.00 g
Glúcidos	63.00 g
Celulosa bruta	5.00 g
Cenizas brutas	5.00 g
Calcio	0.80 g
Fósforo	0.65 g
Humedad	9.00 g
Lisina	0.70 g
Metionina	0.50 g
Colina	750.00 mg
Vitamina A	9000.00 UI
Vitamina D ₃	1000.00 UI
Vitamina E (Tocoferol)	50.00 mg
Vitamina K ₃ , menadiona	1.20 mg
Complejo vitamínico B	43.50 mg
Vitamina PP, ácido nicotínico	30.00 mg
Ácido Pantoténico	15.00 mg
Minerales	106.20 mg
Energía	345 Kcal

3.1.4.2. Dieta Líquida

Los productos utilizados en la elaboración de las dietas líquidas suministradas a los animales de experimentación se obtuvieron de Sigma Chemical Co., (St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y de ICN-Biochemicals (Division of ICN-Biomedical, Cleveland, Ohio, Estados Unidos). Se utilizaron para su preparación los siguientes componentes:

Caseína pura, exenta de vitaminas, micropulverizada (ICN-Biochemicals, Cleveland, Ohio-Estados Unidos).

DL-Metionina, cristalina, 95.5% p/p (Sigma Chemical; St.Louis, Missouri, Estados Unidos).

Colina, clorhidrato, 99% p/p (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri,Estados Unidos).

Aceite de Oliva (Sigma Chemical,St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Aceite de Maíz (Sigma Chemical,St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Dextrina de Maíz, tipo III, aproximadamente 80% soluble en agua (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Mezcla de Vitaminas AIN-76A (ICN-Biochemicals, Cleveland, Ohio, Estados Unidos).

Mezcla de Minerales AIN-76 (ICN-Biochemicals, Cleveland, Ohio, Estados Unidos).

Goma Xantano, producida por fermentación de glucosa por *Xanthomonas campestris* (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Celulosa, Alfa-celulosa cristalina (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

MATERIALES Y MÉTODOS

La composición de las mezclas de vitaminas y minerales fue la siguiente:

MEZCLA DE VITAMINAS AIN -76A

COMPOSICION	por Kg de mezcla
Tiamina, clorhidrato	600.00 mg
Riboflavina	600.00 mg
Piridoxina, clorhidrato	700.00 mg
Ácido nicotínico	3.0 g
D-pantotenato de calcio	1.6 g
Ácido fólico	200.00 mg
D-Biotina	20.0 mg
Cianocobalamina - Vit. B ₁₂	1.0 mg
Retinol, palmitato; Vitamina A, 250000 U/g	1.6 mg
DL-alfa-tocoferol, acetato; Vitamina E, 250 U/g	20.0 g
Colicalciferol; Vit.D ₃ 400000 U/g	250.0 mg
Menaquinona; Vit. K	50.0 mg
Sacarosa, finamente pulverizada	972.9 g

MEZCLA DE MINERALES AIN - 76

COMPOSICION	por Kg de mezcla
Fosfato cálcico dibásico	500.0 g
Cloruro sódico	74.0 g
Citrato potásico monohidratado	220.0 g
Sulfato potásico	52.0 g
Oxido de magnesio	24.0 g
Carbonato manganoso(43-48%Mn)	3.5 g
Citrato férrico (16-17% Fe)	6.0 g
Carbonato de Zinc (70% Zn)	1.6 g
Carbonato cúprico (53-55% Cu)	300.0 mg
Yoduro potásico	10.0 mg
Selenito sódico	10.0 mg
Sulfato crómico-potásico	550.0 mg
Sacarosa finamente pulverizada	118.0 g

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Composición de la dieta.

Las dietas líquidas de composición definida utilizadas para el tratamiento dietético de los animales, se realizó siguiendo fundamentalmente los trabajos realizados por Estornell *et al.*, en este campo durante los años 1986 a 1991, según las indicaciones del *American Institute of Nutrition* y basadas a la forma de administración líquida según las indicaciones de Lieber, S. y De Carli, M. (1982, 1986).

A partir de estos trabajos ensayamos diversas cantidades de lípidos para nuestro grupo control con el fin de que la ingesta de estos no sobrepasara los límites fisiológicos y pudiera ser comparada con la de los animales alimentados con dieta normal de laboratorio.

Así las condiciones definitivas del tratamiento dietético al que fueron sometidos los animales de experimentación fueron las siguientes:

DIETAS LIQUIDA MODELO 1

COMPOSICION	CONTROL
Caseína	52.0 g
DL-Metionina	0.8 g
Colina, clohidrato	0.3 g
Aceite de Oliva	8.5 g
Dextrina	162.7 g
Celulosa	10.0 g
Goma Xantano	2.0 g
Vitaminas AIN-76A	2.6 g
Minerales AIN-76	9.1 g
H ₂ O	1000 ml

En un Segundo modelo de alimentación experimentado se utilizó la misma dieta formulada para el *Modelo 1*, pero variando el tipo de aceite empleado, en este caso utilizamos aceite de maíz. Siendo las condiciones del modelo:

DIETAS LIQUIDAS MODELO 2

COMPOSICION	CONTROL
Caseína	52.0 g
DL-Metionina	0.8 g
Colina, clohidrato	0.3 g
Aceite de Maíz	8.5 g
Dextrina	162.7 g
Celulosa	10.0 g
Goma Xantano	2.0 g
Vitaminas AIN-76A	2.6 g
Minerales AIN-76	9.1 g
H ₂ O	1000 ml

Formuladas de este modo, los *dos modelos* de dietas suministradas a los animales de experimentación correspondieron a la siguiente composición en macronutrientes y energía:

DIETAS LIQUIDAS: MODELO DEFINITIVO

COMPOSICION (por litro de dieta)	MODELOS 1	MODELOS 2
DIETAS CONTROL:		
Proteínas:		
Lípidos:	52.8 g	52.8 g
Glúcidos	8.5 g	8.5 g
Energía:	166.3 g	166.3 g
	960 Kcal	960 Kcal
Ingesta:		
	Limitada <i>iso-energéticamente</i> respecto a los animales alimentados con dieta de laboratorio.	Limitada <i>iso-energéticamente</i> respecto a los animales alimentados con dieta de laboratorio.
T. de tratamiento:		
	30 días.	30 días.

Para el cálculo de la energía aportada por las diversas dietas líquidas formuladas, se utilizaron los siguientes coeficientes de energía: caseína 4.27 Kcal/g; aceite de oliva/maíz 8.95 Kcal/g; dextrina 3.96 Kcal/g; sacarosa 3.75 Kcal/g.

La proporción de Sacarosa presente en las cantidades utilizadas de las mezclas de vitaminas y minerales fue tomada en cuenta como aporte glucídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

De igual modo los suplementos de aminoácidos se consideraron como aporte proteico.

La composición de ácidos grasos del lote de aceite utilizado para la preparación de las dietas es la siguiente:

COMPOSICIÓN (%)	ACEITE DE OLIVA	ACEITE DE MAÍZ
Ac. Palmítico (C-16:0)	8.6	10
Ac. Palmitoleico (C-16:1)	0.5	0.1
Ac. Margárico (C-17:0)	0.1	0.1
Ac. Margaroleíco (C-17:1)	0.1	0.1
Ac. Esteárico (C-18:0)	3.6	2.0
Ac. Oleíco (C-18:1)	81.3	25.2
Ac. Linoleico (C-18:2)	4.5	61.4
Ac. Linolénico (C-18:3)	0.5	0.4
Ac. Aráquico (C-20:0)	0.4	0.4
Ac. Gadoleico (C-20:1)	0.3	0.2
Ac. Behénico (C-22:00)	0.1	0.1

Los análisis se realizaron mediante cromatografía de gases en el Instituto de la Grasa de Sevilla.

Así mismo, la cantidad y tipo de antioxidantes que de forma natural contenían el lote de aceite utilizado fue la siguiente:

COMPOSICION (ppm)	ACEITE DE OLIVA	ACEITE DE MAIZ
Alfa Tocoferol	20.9	71.3
Gamma-Tocoferol	2.0	10.0
Delta-Tocoferol	4.0	240

3.2.1.1. Preparación, estabilidad y conservación de las dietas

Las dietas líquidas se prepararon en volúmenes pequeños de 1 litro. La mezcla de componentes se llevó al volumen adecuado con agua en un recipiente, homogenizándose la mezcla con una batidora doméstica a baja velocidad y evitando la incorporación de aire a la mezcla para prevenir la oxidación de vitaminas y del aceite. La goma xantano, utilizada como espesante, tarda algunas horas en hidratarse completamente y proporcionar a la dieta la consistencia adecuada, las dietas recién preparadas no se administraron a los animales de experimentación hasta transcurridas, al menos 6 horas y tras una nueva homogenización.

Todas las dietas ensayadas fueron estables físicamente tanto durante el período de administración a los animales (24 horas a 22°C) como durante el máximo período de almacenamiento (4 días a 4°C).

Puesto que a estas dietas no se les incorporó ningún agente conservador, cada lote mantuvo a 4°C, en recipiente cerrado, en oscuridad y durante un período máximo de 4 días.

3.2.1.2. Administración de las dietas

Los animales se han dispuestos en jaulas para configurar los distintos grupos, a los que se les administraron las diferentes dietas durante un período de 30 días.

* Grupo 1: Dieta Control Modelo 1.

* Grupo 2: Dieta Control Modelo 2.

Para la administración de las dietas líquidas a los animales de experimentación se utilizaron recipientes de vidrio especialmente diseñados para este fin, consistentes en cilindros y abiertos de 45 mm de diámetro y de 175 mm de longitud con una capacidad total de 200 ml, provistos de un codo en su parte inferior con una boca abierta de 12 mm de diámetro y de una escala graduada en el cuerpo principal, quedando cerrado, por su parte superior mediante un tapón de silicona de las dimensiones adecuadas (Afora, Barcelona, España). El diseño de estos bebedores y su disposición inclinada en la jaula permitieron el acceso cómodo del animal de experimentación al alimento, así como la ingesta de la cantidad total de dieta suministrada.

Diariamente entre 12,00 y 14,00 horas se proporcionó a los animales de experimentación la cantidad de dieta conveniente. Valorándose la cantidad ingerida por diferencia entre la suministrada y la consumida.

Así mismo se suministro diariamente a los animales alimentados con dieta sólida de laboratorio, entre 12,00 y 14,00 horas, una cantidad de dieta conocida y superior al consumo habitual de estos animales, con el fin de que se alimentaran "*ad libitum*". La porción de dieta no consumida fue pesada transcurridas 24 horas, así como los pequeños fragmentos hallados en el interior de las jaulas, obteniendo la ingesta diaria de cada animal.

3.2.2. Obtención de muestras biológicas

3.2.2.1. Aislamiento de orgánulos subcelulares

Inmediatamente tras la decapitación de los animales se recogieron 2 ml de sangre directamente en un tubo cónico graduado conteniendo 0,2 ml de heparina Rovi 5% para evitar la coagulación.

A continuación se extrajeron el hígado y la grasa blanca de la zona abdominal y toda la grasa parda de la parte dorsal del tórax. Las muestras se lavaron con una solución de NaCl 0,9% a 4°C como paso previo a su procesamiento. A partir de este momento todos los pasos se realizaron a 4 °C.

Para el aislamiento de orgánulos subcelulares se siguió el procedimiento descrito por Graham, J. (1978) para la elaboración de homogenados y aislamiento de fracciones por centrifugación diferencial.

Cada gramo de hígado se homogenizó con 12 golpes de embolos en un Potter Evelheim a 1.020 r.p.m., en un medio de tampón Tris-HCl 10 mM, con sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, pH 7,4 en la proporción 1:4 (p:v). Posteriormente fue filtrado a través de una gasa fina.

A continuación el homogenizado se centrifugó a 4.000 r.p.m., 20 min. Un mililitro del sobrenadante de esta centrifugación se guardó a 20°C para las determinaciones en hígado total.

La grasa blanca y parda se homogenizaron y centrifugaron de la misma forma que el hígado. Los sobrenadantes obtenidos fueron congelados a -20 °C para posteriormente realizar las determinaciones de las enzimas antioxidantes.

3.2.2.2. Tratamiento de sangre

Los dos mililitros de sangre se centrifugaron a 3.000 r.p.m. guardándose el sobrenadante a -20°C para la determinación del malondialdehído (MDA).

Al precipitado se le añadió un volumen de agua bidestilada igual al del sobrenadante y tras agitar en vortex se dejó 2 horas a 4 °C para producir hemólisis. Se recogieron alícuotas de 0,4 ml del hemolizado que se guardaron

MATERIALES Y MÉTODOS

a -4 °C para posterior determinación de la glutatión peroxidasa, hemoglobina y GSH.

Para precipitar la hemoglobina se añade cloroformo:etanol (3:5 v/v) y 0,3 ml de agua bidestilada. Se agitó y a continuación se centrifugó a 3.000 r.p.m., 10 minutos y se recogió el sobrenadante en un Eppendorf para el posterior estudio de la superóxido dismutasa (**SOD**) y catalasa (Maral, J. *et al.* 1977).

3.2.3. Determinación de Proteínas

La cantidad de proteína total en los diferentes tejidos estudiados de los animales de experimentación se determinó por la reacción de biuret, utilizando el *kit* colorimétrico de la casa Boehringer Mannheim. Se siguió el método de Weichsellbaum, T.E., 1946.

La reacción consiste en la formación de un complejo proteínas-cobre en medio alcalino, donde los iones Cu (II) forman un tetraligando con diversos grupos disponibles de los aminoácidos de las proteínas especialmente con los enlaces peptídicos adyacentes a residuos de histidina, arginina y glutamato. Se realizó la determinación espectrofotométricamente a 546 nm.

Este método es bastante fiable, porque proporciona un rango de 5 a 100 µg por muestra, y es preferido este ensayo frente a Lowry, por las elevadas interferencias ejercidas en este último por la presencia de sacarosa.

3.2.4. Determinación de Hemoglobina

La cantidad de hemoglobina fue valorada a través del test colorimétrico de la casa comercial Boehringer Mannheim, y según el método de Van Kampen, E.J. y Zijlstra, W.G. (1961), y basado en la reacción:



Se realizó la determinación espectrofotométricamente a 546 nm.

3.2.5. Determinación de Malondialdehído (MDA).

Para cuantificar la cantidad de MDA se siguió el método de Santos M., J. Valles, J. Aznar. (1980). Tras centrifugar la sangre a 3.500 r.p.m. se tomó 0,1 ml del sobrenadante (ppp= plasma pobre en plaquetas) y se añadieron 0,45 ml de suero fisiológico 0,9%, 1 ml de ácido tricloacético 100% (100g de TCA en 100 ml de HCl 0,6 N) y 0,2 ml de ác. tiobarbitúrico.

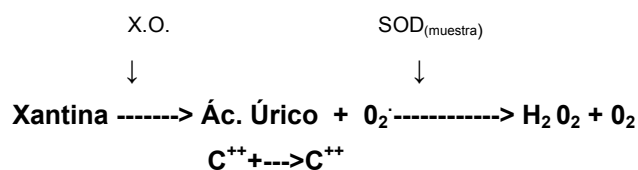
A continuación se incubó a 100 °C durante 30 min., se dejó enfriar durante 10 ó 15 min., y se añadieron 2 ml de agua bidestilada; se agitó y centrifugó a 3.000 r.p.m., 10 min.

El sobrenadante se midió espectrofotométricamente a 532 nm. Las muestras se hacen por duplicado, y se hacen dos blancos cuya absorbancia se restará de las muestras. El incremento de absorbancia es proporcional a la cantidad de MDA presente en el medio.

3.2.6. Sistemas Enzimáticos Antioxidantes

3.2.6.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

Para la determinación de la SOD se siguió el método de Fridovich, I (1986). Se basa en la capacidad de los aniones superóxido para la reducción del citocromo C oxidado y la inhibición de esta reacción por la enzima. La descomposición de la xantina como fuente de aniones superóxido por parte de la enzima xantina oxidasa (X.O.), se basa en la siguiente reacción acoplada:



La cantidad de citocromo C reducido en presencia de muestra que se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 546 nm, nos indica la cantidad de SOD existente.

3.2.6.2. Catalasa (CAT)

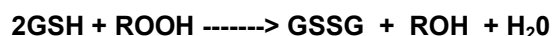
Para la determinación de la catalasa se siguió el método de Claiborne A.J. (1986), basada en la siguiente reacción:



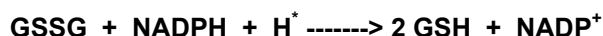
La reducción del peróxido de hidrógeno por unidad de tiempo medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 240 nm a una temperatura de 25 °C, es proporcional a la cantidad de catalasa existente en la muestra.

3.2.6.3. Glutación Peroxidasa (GPX)

Se siguió el método de Wolfgang A. Gunzler y Leopold Flohe (1986) basado en la reacción acoplada:



Por otra parte la enzima glutación reductasa catalisa la siguiente reacción:



El glutación oxidado (GSSG) formado por la reacción de la glutación peroxidasa es continuamente reducido por un exceso de la actividad de glutación reductasa, proporcionando un nivel de GSH. La oxidación del NADPH se sigue espectrofotométricamente a 340 nm y a una temperatura de 37°C.

Para la determinación de la glutación peroxidasa se trató el hemolizado con hexacianoferrato (II) y cianuro en exceso con la finalidad de formar cianometahemoglobina estable y no reactiva.

Para la cuantificación de los extractos tisulares se utiliza como sustrato peróxido de hidrógeno, y la catalasa es inhibida previamente con ácido sódica.

3.2.7. Determinación de Glutati3n Reducido (GSH)

Se sigui3 el m3todo de la Glutati3n-S-Transferasa descrito por Brigelius *et al.* 1983, basado en la siguiente reacci3n:



CDNB= Clorodinitrobencono

G.S.T.= Glutati3n-S-Transferasa

El GS-DNB se determino espectrofotom3tricamente a una longitud de onda de 340 nm.

3.2.8. Estudio en hepatocitos aislados de rata.

3.2.8.1. Aislamiento de c3lulas hep3ticas

Los hepatocitos fueron aislados siguiendo el principio general de perfusi3n descrito originalmente por Berry y Friend, 1969 y m3s tarde por Seglen en 1972 y 1974. La t3cnica quir3rgica as3 como otras modificaciones utilizadas normalmente en nuestro laboratorio, se resumen a continuaci3n:

Se utilizaron rata macho de tipo Wistar entre dos y tres meses de edad que fueron anestesiadas con pentotal s3dico, a la dosis de 62,5 mg/Kg de peso. Para evitar la formaci3n de trombos se le administra heparina 5% una dosis de 2 ml/Kg, v3a intravenosa a trav3s de la vena safena. A continuaci3n se cort3 la piel y posteriormente la pared muscular abdominal desde el l3mite superior de la regi3n p3blica hasta tropezar con el ap3ndice xifoides.

Se pasa una ligadura por la vena cava por encima de la desembocadura de las arterias renales, y otra por la vena porta unos 2 cm antes de su entrada en el h3gado: ambas se dejan sin anudar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Posteriormente se procede a una toracotomía amplia, de forma triangular, de base inferior a nivel diafragmático y vértice superior a la altura del final del manubrio esternal (Rowet, 1975) y se pasa una nueva ligadura a nivel de la cava posterior en su desembocadura en aurícula derecha, que también se deja sin anudar. A continuación se introduce una cánula de plástico de 1,5 mm de diámetro, que se lleva hasta la desembocadura de la cava posterior, dejando la punta a 1-2 cm del diafragma. Hecho esto, la ligadura se cierra y se pone en marcha el sistema de perfusión e inmediatamente después se anuda la cava posterior y se corta la porta, de esta forma, producimos una corriente en sentido cava - porta.

En este momento comienza a fluir por la porta el medio de perfusión Krebs-Henseleit sin calcio (con el fin de debilitar las uniones intercelulares) siendo la velocidad de flujo de 20 ml/min. durante 10 min., a 37°C y saturado de O₂-CO₂ 95/5%. Esta etapa tiene por objetivo lavar el hígado de sangre y disminuir el calcio extracelular para así favorecer la disgregación del órgano (Seglen, 1973a; Seglen, 1973b).

Posteriormente se procedió a aislar el hígado del resto de los órganos y se inició su perfusión con tampón con colagenasa (30 mg de colagenasa/4.3 ml de cloruro calcio + 40 ml de Krebs-Henseleit con calcio) en un circuito cerrado (flujo:20 ml/min; tiempo:12-15 min.; 37°C; O₂-CO₂ 95/5%).

La perfusión se termina interrumpiendo el flujo a través de la cava. El hígado se trocea y se bate suavemente toda la mezcla con un poco de medio de perfusión.

Esta mezcla se coloca en un matraz erlenmeyer de 250 ml en un baño a 37°C con agitación y continuamente gaseando con una mezcla de O₂-CO₂ (95/5%). Al cabo de 10 minutos la mezcla se pasa por un tamiz de nylon de 100 micrometros de diámetro para quitar los restos de parénquima o tejido conectivo de hígado que no se disgregaron.

El siguiente paso consiste en una centrifugación de las células. Las células fueron centrifugadas de la muestra a 500 rpm durante 3 min., con el objetivo de remover los restos celulares, las células dañadas y las células no parenquimales, (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 1986); se decanta el sobrenadante y resuspende otra vez

con tampón Krebs suplementado con Calcio a 37°C. Se centrifuga de nuevo a la misma velocidad y se decanta el sobrenadante y se pesa el sedimento; el peso del sedimento representa aproximadamente el peso húmedo de las células; se resuspende en una proporción de 10 ml/g de célula. La suspensión así conseguida contiene entre 9-11 mg de peso seco de células por ml (Krebs A. *et al*, 1979).

La suspensión celular es utilizada para los estudios metabólicos, los métodos se explicaran en los apartados correspondientes.

Los estudios metabólicos utilizan normalmente 2 ml de suspensión celular a la que se añaden 2 ml de Krebs-Henseleit que contienen los sustratos necesarios para el estudio que vayamos a realizar. La suspensión hepática fue distribuida en matraces de 25 ml . La incubación se realizó a 37° C con agitación suave y constante a una atmósfera de O₂-CO₂-95/5%.

Las incubaciones se interrumpen al cabo del tiempo deseado con ácido perclórico al 20% (2% concentración final). Los sobrenadantes ácidos se neutralizan con hidróxido potásico (20%). Los sobrenadantes neutros son utilizados para las determinaciones analíticas.

Para averiguar la cantidad de células por ml de suspensión, se toman 2 ml y se secan en una estufa. Igualmente se toman 2 ml de la solución salina Krebs-Henseleit y se secan en la estufa.

La diferencia entre el peso seco de la suspensión celular y el peso seco de la solución salina nos da el peso seco de la célula. Para obtener el peso húmedo de la misma, basta multiplicar el peso seco por 3.7 (Krebs, et al. 1979).

3.2.8.2. Preparación de reactivos utilizados

❖ Azul Tripán salino:

Consiste en una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de hepatocitos con una solución de azul tripán al 0,2 % en ClNa al 0,9% (Krebs *et al.* 1979).

❖ Tampón Krebs-Henseleit carente de Calcio (Ca^{2+}).

Cloruro Sódico (ClNa) 0.9%.....	910 ml
Cloruro Potásico (ClK) 1.15%	40 ml
Fosfato monopotásico (PO_4H_2) 2.11%	10 ml
Sulfato de magnesio Heptahidratado($\text{SO}_4\text{Mg}+7\text{H}_2\text{O}$) 3.82%.....	10 ml
Carbonato monosódico (CO_3HNa) 1.30%.....	30 ml

De ésta mezcla se toma 300 ml y se le añade 48 ml de Carbonato Monosódico 1.30% y un quelante Etilén glicol tetraacético (EGTA) previamente llevado a un pH 7 con hidróxido sódico, la concentración final del quelante es de 0.5 mM (Seglen 1972, 1973 a y b); luego se gasean con O_2/CO_2 (95/5% v/v) hasta conseguir un pH comprendido entre 7,2-7,4, a 37°C y se prepara el día previo al experimento.

❖ Tampón Krebs-Henseleit suplementado con Calcio (Ca^{2+})

Cloruro Sódico (ClNa) 0.9	880 ml
Cloruro Potásico (ClK) 1.15%	40 ml
Fosfato monopotásico (PO_4H_2) 2.11%	10 ml
Sulfato de Magnesio Heptahidratado ($\text{SO}_4\text{Mg}+7\text{H}_2\text{O}$) 3.82%	10ml
Cloruro Calcio (Cl_2) 0.11%	30 ml
Carbonato monosódico (CO_3HNa) 1.30%	30 ml

A un volumen de 200 ml de esta mezcla se le añadieron 32 ml de Carbonato monosódico 1,3%; luego se gasean con O_2/CO_2 (95/5 v/v) hasta conseguir un pH comprendido entre 7,2-7,4, se usa a 37 °C y se prepara el día previo al experimento.

El Krebs-Henseleit carente de calcio, es el primer medio utilizado en la perfusión para limpiar el hígado. Una vez limpio se prepara el tampón con colagenasa.

❖ **Tampón Colagenasa**

-30 mg Colagenasa tipo IV (E.C.3.4.24.3) Sigma N°C-5138, con una actividad enzimática de 512 unidades/mg liofilizado.

-4.3 ml Cloruro Calcio 0.11%40 ml K-H suplementado con Calcio.

-Preparar en el momento previo a la perfusión del hígado.

3.2.8.3. Incubación de los hepatocitos aislados y preparación de muestras para análisis.

1) Medidas de Viabilidad Celular

Normalmente la pérdida de viabilidad de las células se relaciona a una pérdida de la funcionalidad de la membrana celular. Esta se evalúa por cambios en la permeabilidad considerando que una célula cuya membrana es permeable ha sufrido daños severos e irreversibles. La viabilidad se determinó con *azul tripán*. Normalmente el azul tripán es expulsado por una célula viable y falla esta expulsión en células dañadas tiñéndose marcadamente su citosol y núcleo, y adhiriéndose ligeramente a la superficie celular.

Las células fueron contadas en una cámara de Buerke (previa adición del colorante) utilizando para ello un microscopio óptico (aumento 20X). Las células viables se distinguen de las dañadas por el colorante azul del citosol.

El porcentaje de células viables fue superior al 85% en todos los casos en los que se realizaron estudios metabólicos. Aquellas incubaciones con índices de viabilidad inferiores fueron desechadas.

2) Estudio metabólico de los hepatocitos aislados de ratas alimentadas con dietas control de oliva y maíz

En este trabajo se estudiaron los hepatocitos aislados de los animales tratados con dieta líquida control a base de aceite de oliva y maíz, (referida en el apartado de material y métodos).

Las incubaciones de los hepatocitos se realizaron en una batería de Erlenmeyers provistos de tampón de caucho, cuya capacidad es de 25 ml.

Los matraces controles de tiempo cero, no se incuban a 37°C y se les deja en hielo, por lo que el volumen total (2 ml) corresponde al medio de K-H-Ca⁺⁺. A este volumen añadimos 2 ml de suspensión celular equivalente aproximadamente a 85 mg de peso húmedo de hepatocitos. Con ello obtenemos un volumen final de 4 ml por matraz. La forma de proceder es la siguiente:

A los matraces considerados tiempo Inicial (cero), separamos alicuotas e inmediatamente se le añadió 0,4 ml de ácido perclórico (PCA) 20% para detener los procesos metabólicos celulares. Estos matraces se les deja en hielo.

Seguidamente extraemos 2 ml. de células de la suspensión de hepatocitos que debemos estar agitando suave y continuamente para que se mantenga homogénea y los introducimos en el primer Erlenmeyer de tiempo 60 minutos. Inmediatamente se comienza a gasear el matraz con una mezcla de O₂/CO₂ (95/5, v/v, durante 30 segundos. Una vez gaseado el matraz se cierra herméticamente con el tampón de caucho y se deposita en el baño termostatzado (37°C) con una agitación constante.

Transcurrido el tiempo de incubación todas las reacciones se pararon mediante la adición de ácido perclórico al 20%, siguiendo el mismo orden en el que fueron introducidas en el baño.

Seguidamente pasamos el contenido de los Erlenmeyers a una batería de tubos numerados. Estos son centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos y a continuación decantamos el sobrenadante de los tubos en otra batería de tubos numerados.

Después procedemos a neutralizar las muestras. Para ello añadimos una gota de indicador universal y vamos añadiendo KOH al 20% hasta que conseguimos neutralizar la muestra. La muestra neutra queda así lista para análisis. Caso que no se vaya a hacer determinaciones inmediatamente la muestra debe congelarse.

Mediante el procedimiento expuesto hasta ahora, obtenemos las muestras para la mayoría de los análisis. Las determinaciones de MDA, LDH, GSH requieren un tratamiento especial de las muestras, que se describe a continuación.

a) Preparación de muestras para la determinación de MDA.

El método es similar al general, salvo que al finalizar la incubación y *antes* de tratar las células con PCA 20%, debemos separar una fracción alícuota (0,5 ml) que iremos depositando en una batería de Eppendorf que contienen 100 µl de ácido tricloacético al 50%.

Luego continuaremos el procedimiento según se expone en el apartado de análisis de muestras, para la determinación del MDA.

b) Preparación de muestras para la determinación de LDH.

Para determinaciones de LDH, al finalizar la incubación y *antes* de destruir las células con PCA 20%, se extrae una alícuota de 0.5 ml y se

deposita en una batería de Eppendorf numerados. Estos Eppendorf son centrifugados a baja velocidad a 500 rpm durante 5 minutos, para evitar la ruptura de las membranas celulares y la consiguiente liberación de la LDH citosólica. Una vez centrifugados se decanta el sobrenadante en otra batería de Eppendorf numerados que debe ser inmediatamente analizada.

c) Preparación de muestras para determinación de GSH

Para hacer la determinación de GSH por el método de la GSH-transferasa la muestra debe estar ácida. Para ello, una vez tratadas las células con PCA al 20% y centrifugadas, separamos una alícuota de 0.4 ml, que debe permanecer ácida. Esta fracción no se neutraliza hasta instantes antes de su análisis. Para neutralizarla utilizamos CO_3K_2 , midiendo el pH con papel indicador. El resto del análisis se especifica en el apartado correspondiente de análisis de muestras.

3.2.9. Determinaciones de metabolitos por métodos enzimáticos.

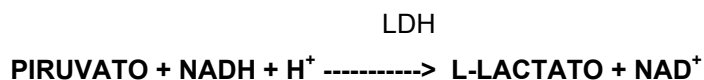
Todos los análisis realizados han sido hechos mediante procedimientos espectrofotométricos que tienen como características fundamentales su rapidez y sensibilidad.

La producción o el consumo de una sustancia durante una reacción enzimático son directamente proporcionales a la variación de su absorción óptica.

Así pues, conocido el coeficiente de absorción molar de la sustancia que absorbe específicamente la luz, y el volumen de la solución, podremos saber la concentración de la sustancia en el medio y por tanto en la célula.

3.2.9.1. Determinación de piruvato

Fue utilizado el método descrito por Czok y Lamprecht (1974), el cual se fundamenta en la siguiente reacción:



(LDH) = Lactato Deshidrogenasa. (E.C. 1.1.1.27).

La cantidad de piruvato transformado fue medida mediante la disminución de absorbancia del NADH a una longitud de onda de 340 nm.

3.2.9.2. Determinación de L-lactato

Fue utilizado para su determinación el método de Ingeborg Gutman y August Wahlefed, (Bergmeyer 1974), basado en la siguiente reacción:

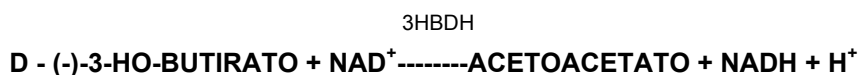


(LDH)= Lactato Deshidrogenasa. (E.C. 1.1.1.27).

El NADH formado fue medido espectrofotométricamente por el cambio de absorbancia a 340 nm. Este es proporcional a la cantidad de Lactato presente en la muestra.

3.2.9.3. Determinación de acetoacetato

Para la determinación del Acetoacetato seguimos el método descrito por Mellanby J. y Willianson D.M. (1974), basado en la siguiente reacción:

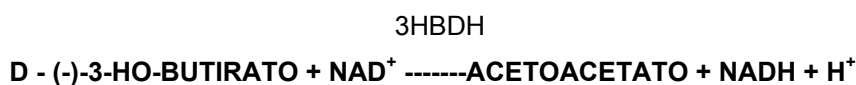


(3-HBDH)= 3-B- OH- Butirato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.30).

La oxidación del NADH, medida espectrofotometricamente a 340 nm, es proporcional a la cantidad de Acetoacetato presente en la muestra.

3.2.9.4. Determinación del D- (-) - 3 Hidroxibutirato

Para la determinación de D-(-)-3Hidroxibutirato se siguió el método de Willianson, D.H., Mellamby J. (1974), basada en la reacción:



(3-HBDH)= 3-B- OH- Butirato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.30).

La cantidad de NADH formado y medido por el incremento de absorbancia a 340 nm es proporcional a la cantidad de D-(-)-3-HO-Butirato presente en la muestra.

3.2.10. Determinación de Glutati3n Reducido (GSH).

El GSH se ha medido seg3n el m3todo de la Glutati3n-S-Transferasa descrito por Brigelius *et al.* 1983. M3todo ya descrito anteriormente.

3.2.11. Determinación de la actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).

Se utilizó la técnica de Hakala (descrita por Bergmeyer *et al* 1974), basada en la conversión del piruvato en lactato.

LDH



La oxidación del NADH medida espectrofotométricamente a 340 nm, es equivalente a la cantidad de LDH de la muestra.

La fracción alícuota obtenida *no* es sometida, a diferencia del resto, a la acción del ácido perclórico, ya que esto produciría desnaturalización y precipitación de enzimas celulares. Las células son centrifugadas a 500 rpm, durante 5 minutos. Una mayor velocidad produciría la rotura de membranas (Rodríguez Jerez, 1984).

3.2.12. Determinación de Malondialdehído (MDA).

Se cuantificó espectrofotométricamente (535 nm) las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), (Valenzuela, 1991b).

Protocolo: a 500 microlitros de muestra proveniente de la suspensión celular, se le adicionó 100 microlitros de TCA 50%, se agitó con vortex y centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se separó y utilizó para la determinación de los TBARS. Tras adicionar 700 microlitros de TBA 0,67% a un volumen de 350 microlitros del sobrenadante separado, se procedió a calentar la muestra durante 10 min. a 100°C. Una vez que las muestras se han enfriado, se añadió 1 ml de n-butanol. Volvemos a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 535 nm. el incremento de absorbancia es proporcional a la cantidad de MDA liberado al medio.

3.2.13. Análisis de 8 oxo 2'deoxiguanosina (8-oxo-dG) en DNA de hígado de rata.

Para estudiar los niveles basales del daño oxidativo inducido en el DNA digerido de hígado de rata, se midió la base modificada 8-oxo-dG, mediante HPLC-EC. La cantidad de 8-oxo-dG digerida se mide mediante detector electroquímico y U.V., según describe Muñiz P., *et al.* 1995.

Este método permite medir 8-oxo-dG, marcador del daño oxidativo del DNA, a nivel de fentomoles en DNA de tejidos de ratas normales, lo que permite que se aplique al análisis de bases modificadas causadas tanto por procesos endógenos como por mecanismos exógenos inductores de estrés oxidativo.

3.2.13.1. Extracción de DNA

El DNA geonómico fue aislado siguiendo el método de Gupta (1984) con las modificaciones descritas por Frenkel *et al.* 1991. Un gramo de hígado fue homogenizado en SDS 1%/1mM EDTA e incubado a 38°C con proteinasa K (500 µg/ml). Posteriormente se hizo sucesivas extracciones con fenol y SEVAG (Cloroformo:isoamialcohol (24:1)) en tubos de propileno. Las fases fueron separadas por centrifugación y de la fase acuosa se precipitó el DNA con la adición gradual de etanol. Para eliminar los restos de RNA se incubó a 38°C durante 30 minutos con una mezcla de RNasa A. Después de una nueva extracción con SEVAG y precipitación con etanol se disolvió el DNA purificado en 2 ml de tampón Tris-CLH 10 mM y se determinó espectrofotométricamente su concentración (unidad de A_{260} equivale a 50 µg de DNA) y su pureza ($A_{260}/A_{280} = 1.7-1.9$).

3.2.13.2. Digestión del DNA

El DNA aislado fue lavado dos veces con etanol 70%, secado, y diluido en 200 µL de Tris-HCl 10 mM , pH 7,0, para su digestión enzimática, descrita anteriormente por Frenkel *et al* (1991). Brevemente para la digestión se utilizó

0,5 µg DNA/µL de muestras con 100 unidades de DNase I en 40 µL de Tris-HCl 10 mM, se incubó durante 1 hora a 37°C. Para reajustar el pH de la reacción resultante de la mezcla se pipeteo 15 µl de Acetato de Sodio 0,5 M (pH 5,1).

A continuación se añadió 10 µL de nucleasa PI (5 unidades) y incubamos durante 1 hora. Después de reajustar el pH con 100 µL de Tris-HCl 0,4 M a pH 7,8 la muestra fue digerida con fosfatasa alcalina, y todas las muestras fueran incubadas por 1 hora más. Tras el tiempo de incubación, filtramos las muestras (filtros 0,22 µ), con el objetivo de cuantificarlas.

3.2.13.3. Cuantificación de 8-oxo-dG

El análisis de 8-oxo-dG en el DNA digerido fue medido usando HPLC-EC y empleando columnas Waters ODS (2.5x0,46 i.d.; 5µ tamaño de poro). La cantidad de 8-oxo-dG fue medido con detección electroquímica (LCED), descrita por Muñiz P., *et al.* 1995. Las condiciones de lavado fueran descritos por Richter *et al.* 1988, utilizando filtros y vacío con una solución tampón de Fosfato 50 mM, pH 5,5, con 10% de metanol. La cantidad de dG (2' deoxiguanosina) fue cuantificada por absorbancia U.V. situada en línea entre la columna del HPLC-EC y el detector electroquímico. Las muestras patrón de dG y 8-oxo-dG fueran analizadas a fin de garantizar una buena separación.

Las concentraciones de estas bases fueron calculadas respecto a sendas curvas de calibración y expresadas como *fentomoles* de 8-oxo-dG / 10⁶ dG.

3.2.14. Tratamiento estadístico de los resultados.

Todos los resultados experimentales se han expresados como la media y desviación estándar (**DS**).

Para comparar medias de dos grupos de determinaciones y averiguar se la diferencia entre ambas es significativa o debida al azar, se ha calculado la "*t*" de *Student*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. VALIDACIÓN DE ALIMENTACIÓN CON DIETAS LIQUIDAS CONTROL.

Utilizamos en este trabajo el modelo de alimentación con *dietas líquidas* control de composición definida, en donde la alimentación se realiza únicamente variando el tipo de lípidos, en este caso aceite de oliva y maíz y manteniendo las mismas proporciones en macronutrientes y energía, para posteriormente realizar un estudio del metabolismo oxigénico en diversos tejidos.

Con el objetivo de establecer una relación entre los resultados obtenidos y los datos previamente conocidos sobre este metabolismo, y también como estimación del efecto de las diferencias cualitativas entre ambos tipos de dietas, ajustamos el porcentaje de lípidos de nuestra dieta *Control* al porcentaje que incorpora nuestra *Dieta sólida de laboratorio*. Se utilizó caseína pura (52.8g/l) como fuente proteica y la dextrina (162.7 g/l) como fuente glicídica principal junto a la sacarosa (3.6 g/k) utilizada en las mezclas de vitaminas y minerales y como fuente lipídica el aceite de oliva y el aceite de maíz (8.5 g/l).

La composición de estas dietas esta detallada en la sección correspondiente del capítulo de Material y Métodos.

La dieta diaria ingerida por los animales (aproximadamente 60 ml con las dietas líquidas y 17,4 gr. con la *dieta sólida* de laboratorio) contiene la siguiente proporción de macro nutrientes y energía:

TABLA 07: COMPOSICIÓN DEFINITIVA

NUTRIENTE	Kcal/g	PIENSO	CONTROL
Proteínas	4,27	3,12	3,12
Lípidos	8,95	0,52	0,50
Glúcidos	3,85	10,96	9,85
Energía(Kcal/día)		60,16	55,71

Basándonos en esta formulación, utilizamos dos tipos de dietas (detalladas en el apartado de *Material y Métodos*).

Los animales de los grupos *Control*, tanto los tratados con aceite de oliva como de maíz, recibieron la dieta correspondiente de 960 Kcal/l durante un período de 30 días. La ingesta de los grupos *Control* alimentadas con esta dieta líquida fue limitada isoenergéticamente respecto al grupo de animales alimentados con la dieta sólida de laboratorio.

Los animales que tomaban dieta sólida de laboratorio fueron alimentados "*ad libitum*" y también se les hizo un seguimiento durante 30 días.

Los valores de ingesta diarias y totales de nutrientes y energía en relación con las dietas *Control* se muestran en la Tabla 08.

TABLA 08: TRATAMIENTO DIETÉTICO

INGESTA DE NUTRIENTES	PIENSO (g)	CONTROL OLIVA (ml)	CONTROL MAÍZ (ml)
Volumen de dieta			
Diaria (24h)	17,4±0,8	59,88±0,65	64,2±0,1
Total (30 días)	503,35±1,3	1796,49±19,49	1928,48±1,26
Proteínas			
Diaria (g/24h)	3,12±0,1	3,12±0,4	3,34±0,09
Total (g)	90,2±0,4	93,47±1,1	100,48±2,7
Lípidos			
Diaria (g/24h)	0,52±0,1	0,50±0,01	0,53±0,01
Total (g)	14,75±0,5	15,0 ±0,23	16,10±0,34
Glúcidos			
Diaria (g/24h)	10,96±0,2	9,82±0,12	10,54±0,28
Total (g)	315,37±2,5	294,56±3,48	316,33±8,4
Energía			
Diaria(Kcal/24h)	60,16±0,3	55,58±0,67	56,80±1,59
Total (Kcal)	1778,83±2,8	1667,42±20	1704,21±47,67

Los valores corresponden a la media \pm SD de 8 animales de cada grupo alimentados con estas dietas durante 30 días. Se aprecia un ligero incremento de la ingesta diaria y total de los animales alimentados con las dietas líquidas, sobre todo en el grupo Control de aceite de maíz.

TABLA 09: INGESTA DE VITAMINA E

FUENTES (mg/día)	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
En dieta	3,11	4,04
En el aceite	0,014	0,16
Total Vit. E	3,12	4,20

Como el principal objetivo de este trabajo es conocer el metabolismo oxigénico nutricional, es importante destacar la cantidad de vitamina E que toman diariamente estos dos grupos de animales, con los modelos de dietas líquidas *Controles* con aceite de oliva y maíz (960 Kcal/l) durante el período indicado de 30 días.

Estos resultados muestran que se ha conseguido obtener un modelo de alimentación con dietas control de composición definida, sin modificar el resto de los nutrientes de la dieta.

4.2. DESARROLLO CORPORAL DE LOS ANIMALES

El siguiente paso, una vez establecida la dieta definitiva, fue valorar el desarrollo de los animales de experimentación a lo largo del tratamiento dietético al que fueron sometidos.

En la Tabla 10 se muestra la evolución del peso corporal de los diferentes grupos de animales control alimentados con las dietas líquidas que contienen aceite de oliva y aceite de maíz, presentando los datos a intervalos semanales.

TABLA 10: DESARROLLO CORPORAL

DÍAS DE TRATAMIENTO	PIENSO (6)	CONTROL OLIVA (8)	CONTROL MAÍZ (10)
Día 0	180±0,00	181 ± 2,9	184 ± 17
Día 7	199±0,99	199 ± 3,4	201 ± 20
Día 14	219,3±1,59	212 ± 4	217 ± 27
Día 21	239,55±1,84	230 ± 5	238 ± 31
Día 28	259,99±3,34	241 ± 4,7	255 ± 34
Incremento Total (gramos)	79,9±1,55	60,3±4,6 •••	71±25

Los animales fueron alimentados con dietas sólida y líquida durante 30 días. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores corresponden a la media \pm SD y entre paréntesis número de animales de cada grupo. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01*** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01§§§ P<0,005 CO respecto CM.

Como se observa, los diferentes grupos de animales presentaron un crecimiento relativamente rápido, puesto que el tratamiento se realizó en un período todavía de desarrollo de los animales.

Los animales alimentados con *dieta sólida de laboratorio* incrementaron su peso en un 44% durante este período, aumentando una media de 79,9 gramos. Los animales alimentados con líquida incrementaron su peso entre un 33 a 38% durante los 30 días de tratamiento.

Investigaciones llevadas a cabo sobre este tema apuntan a que este mayor aumento de peso de los animales puede producirse no sólo a partir de un incremento del tejido adiposo, sino también a partir de un aumento de la masa magra, lo que supondría una utilización más eficaz de las proteínas de la dieta, puesto que la ingesta proteica es similar en ambos grupos.

4.3. DESARROLLO DEL HÍGADO Y DEL TEJIDO GRASO

Tras el sacrificio de los animales valoramos la magnitud de dos importantes masas de tejido graso: el *tejido adiposo blanco* (sólo se cuantificó la porción retroperitoneal) y el *tejido adiposo marrón* de la *zona interescapular*.

Así mismo, incluimos el dato del peso hepático ya que lo necesitamos para valorar los cambios existentes en él, tanto morfológicos como funcionales, en los diversos grupos de animales.

Así mismo se valoró la contribución de estas masas adiposas al peso total del organismo, con el fin de determinar si el aumento del peso del animal se debía exclusivamente al incremento del tejido adiposo.

El incremento del tejido adiposo en los animales del grupo *control maíz* respecto al *control oliva*, es de un 12,3% (Tablas 11 y 12).

Se observa, que los animales de los grupos *control maíz* experimentaron un mayor desarrollo hepático, acorde con su mayor peso corporal, respecto a los animales de grupos *control oliva* con una variación de peso hepático del entre un 14,7% (Tablas 11 y 12).

TABLA 11: DESARROLLO DE TEJIDOS

PESOS (g)	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
Hígado Total	9,12±1,44 (6)	8,37±0,59 (7)	9,60±0,74 (7) ^{sss}
Grasa Blanca	1,38±0,30 (6)	1,87±0,43 (6) *	2,1±0,76 (7) *
Grasa Parda	0,37±0,06 (6)	0,38±0,05 (7)	0,35±0,05 (8)

*Los animales fueron alimentados con dietas sólida y líquida durante 30 días.
Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).*

Los valores corresponden a la media ± SD y entre paréntesis número de animales de cada grupo. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01*** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01^{·§§§} P<0,005 CO respecto CM.

RESULTADOS

TABLA 12: VARIACIONES DE LOS PESOS CORPORALES, DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO ABDOMINAL E HÍGADO EN RATAS CONTROLES.

GRUPOS DE TRATAMIENTO	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ	%
Peso Corporal inicial (g)	180±0,00 (6)	181 ± 2,9 (8)	184±17 (10)	+0
Peso Corporal final (g)	259,99±3,34 (6)	241 ± 4,7 (8)	255 ± 34 (10)	+5,80
Tejido Adiposo Blanco (g)	1,38±0,30 (6)	1,87±0,43 (6)	2,1±0,76 (7)	+12,3
Hígado Total (g)	9,2±1,44 (6)	8,37±0,59 (7)	9,60±0,74 (7)	+14,7

Los valores corresponden a la media ± SD y entre paréntesis el número de animales de cada grupo. En la columna de la derecha, se indica el porcentaje (%) de cambio encontrado con respecto al valor correspondiente del grupo control oliva frente al grupo control de aceite de maíz.

4.4. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO

4.4.1. Valoración de la actividad de la SOD, Catalasa, GPx, GSH en diferentes tejidos y compartimientos de la rata.

En la Tabla 13 se reflejan los resultados numéricos de las diferentes actividades enzimáticas. Las Figuras presentan gráficamente las actividades de estas enzimas en los diferentes grupos de tratamientos.

TABLA 13: ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN HÍGADO TOTAL DE RATAS ALIMENTADAS CON ACEITE DE OLIVA Y MAÍZ

	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
SOD (UI/mg Prot)	17,5±1,9 (5)	32,88±7,33 (4) ***	17,2±3,0 (4) §§
CAT (UI/g Prot)	204,4±23,5(5)	174,5±28,1(5)	158,5±40(9) *
GPx (UI/g Prot)	136,2±14,9(4)	145,4±11,6(6)	120±10(8) * §§§
GSH (µmol/gProt)	16,85±3,79(5)	20,44±4,6(7)	15,9±2,3(8) §

La determinación se realizó según se especifica en el apartado de Material y Métodos. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM.

4.4.1.1. HÍGADO TOTAL

a.- Valoración de la actividad de la SOD

La Figura 06 presenta gráficamente la actividad de la SOD en los distintos grupos de tratamiento. Se puede apreciar un descenso significativo de la actividad de esta enzima en un 47% en los grupos control tratados con aceite de maíz (CM) respecto al grupo control oliva (CO).

SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

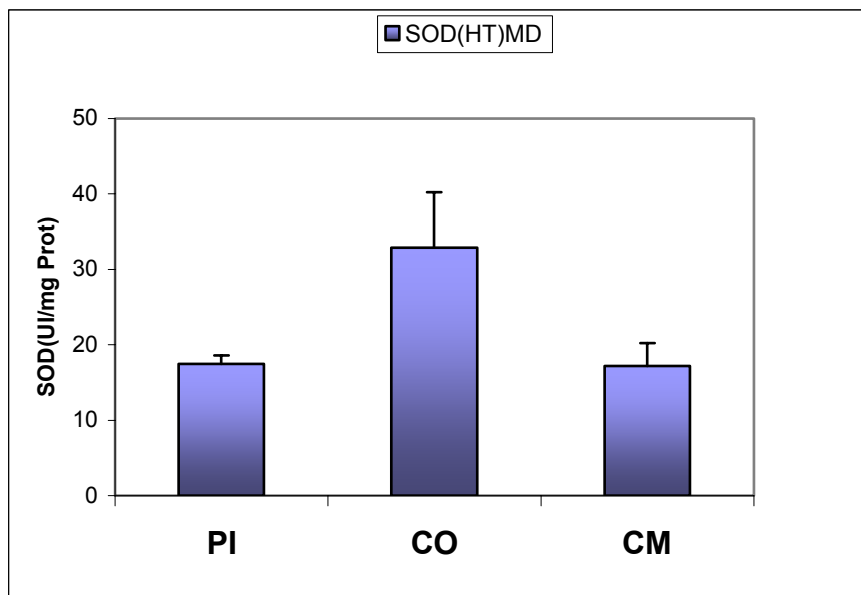


Figura 06: representación de los valores obtenidos de la actividad SOD en hígado total de rata.

b.- Valoración de la actividad de la CATALASA

La Figura 07 presenta gráficamente la actividad de la CAT en los distintos grupos de tratamiento. En el hígado, la actividad de ésta enzima es menor en los grupos control oliva y maíz al comparar con los animales tratados con dieta sólida de laboratorio (PI). (Tabla 13).

Destacando una disminución de la actividad enzimática en el grupo alimentado con aceite de maíz del 23% con respecto al grupo (PI), y una ligera tendencia a disminuir al comparar con el grupo control oliva (CO) 9,16%.

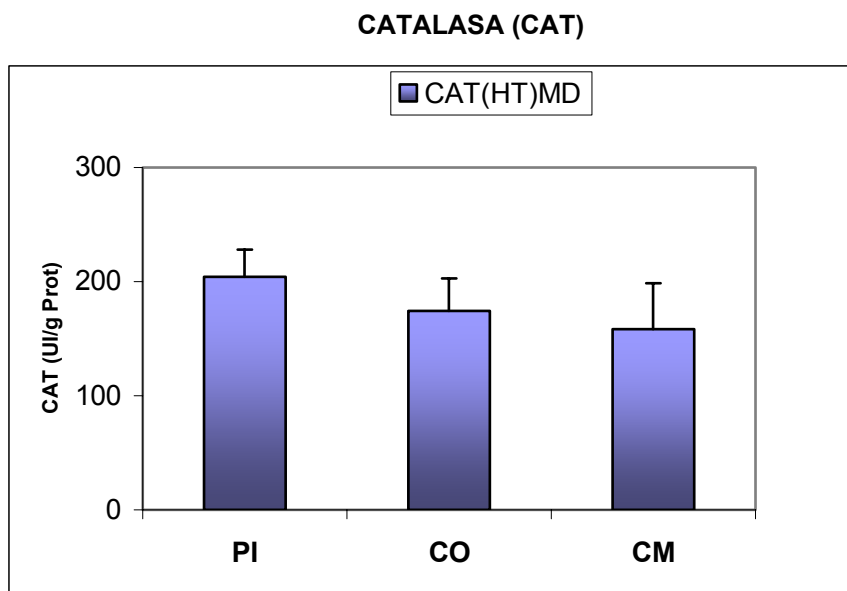


Figura 07: representación de la actividad catalásica en hígado total de rata.

c.- Valoración de la actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA

En la Tabla 13 se describen los valores numéricos correspondientes a la actividad Gpx. La Figura 08 representa gráficamente los valores obtenidos entre los distintos grupos estudiados.

Los grupos control cuya fuente lipídica es el aceite de maíz presentan menor actividad enzimática con respecto a los grupos alimentados con aceite de oliva y con *dieta sólida de laboratorio* (PI).

Sin embargo, nos encontramos que la actividad enzimática que presentan los grupos de aceite de oliva, son significativamente superiores ($p < 0,005$) a los resultados obtenidos con el aceite de maíz.

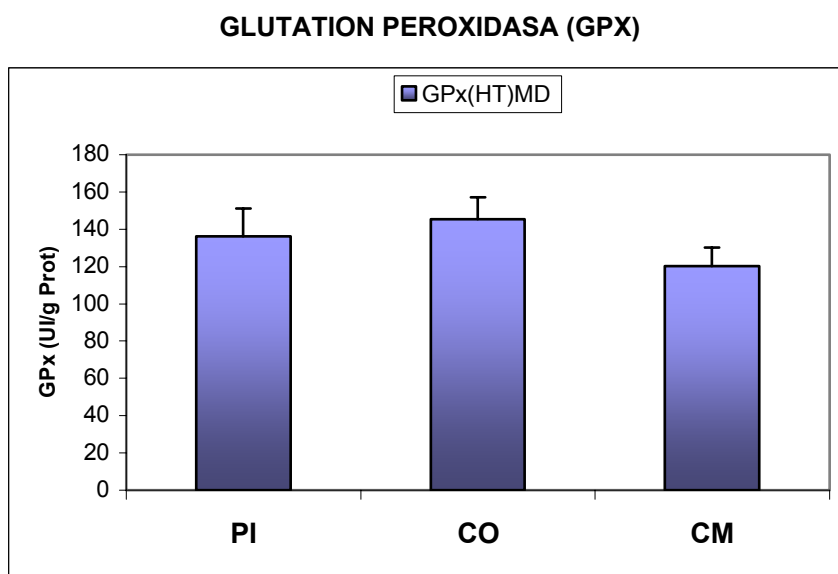


Figura 08: representación de los valores obtenidos de la actividad GPX en hígado total de rata.

d.- Valoración de los niveles del GLUTATIÓN REDUCIDO

En la Tabla 13 se describen los valores numéricos correspondientes al GSH. La Figura 09 representa gráficamente los valores obtenidos entre los distintos grupos de tratamiento.

El GSH en el hígado total de los grupos controles tratados con aceite de oliva se observa un aumento de la concentración de este tripéptido con relación a los distintos grupos controles estudiados.

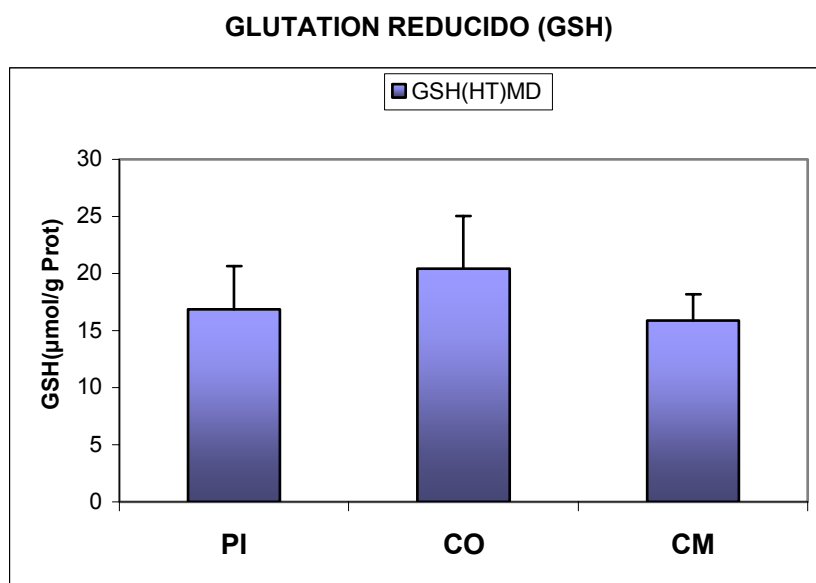


Figura 09: representación de los niveles de GSH en hígado total de rata.

e.- Valoración de los niveles de la 8-OXO- 2' DEOXIGUANOSINA

Para valorar el daño oxidativo del DNA genómico, durante el periodo de tratamiento de los animales alimentados con aceite de oliva y maíz, se ha cuantificado los niveles de (8-oxo-dG) a partir de DNA extraído del hígado de rata. En la Tabla 14 y Figura 10 se representan estos valores obtenidos entre los distintos grupos de tratamientos estudiados.

Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de (8-oxo-dG) entre los diferentes grupos controles estudiados, no se observan diferencias significativas. Sin embargo; estos niveles demuestran una tendencia a aumentar en los animales tratados con dieta a base de aceite de maíz al comparar con los grupos de aceite de oliva estudiados.

RESULTADOS

TABLA 14: Niveles de 8-OXO 2' DEOXIGUANOSINA (8-OXO-dG) en hígado de rata alimentada con aceite de oliva y aceite de maíz

DIETAS CONTROL	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
8-Oxo-dG/ 10 ⁶ dG	2,44 ± 0,33 (5)	2,26 ± 0,64 (8)	2,54 ± 1,27 (5)

La extracción de DNA en hígado de rata se realizó siguiendo las condiciones descritas en el apartado de Material y Métodos. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01, *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01, §§§ P<0,005 CO respecto CM.

8-OXO 2' DEOXIGUANOSINA

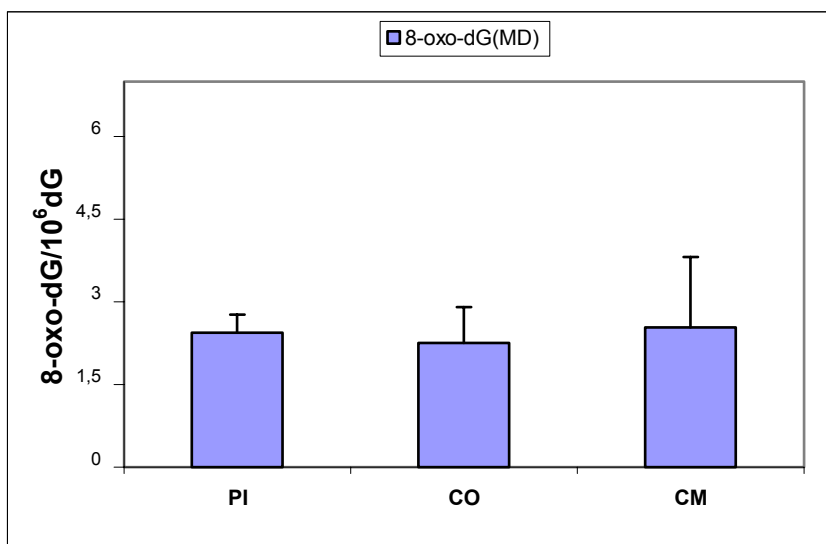


Figura 10: Niveles de (8-oxo-dG) en hígado de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

4.4.1.2. GRASA BLANCA ABDOMINAL

En la Tabla 15 y en las Figuras se reflejan los valores resultantes de las diferentes actividades enzimáticas en la grasa blanca de rata y en los diferentes grupos de tratamiento utilizados.

TABLA 15: ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN GRASA BLANCA ABDOMINAL DE RATAS ALIMENTADAS CON ACEITE DE OLIVA Y MAÍZ

	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAIZ
SOD (UI/mg Prot)	5,1±0,64 (4)	10,06±2,67 (5) **	7,15±1,98 (6) *
CAT (UI/g Prot)	43,6±11,5 (4)	38,23±12,3 (4)	28,68±2,29 (4) *
GPx (UI/g Prot)	30,94±1,91 (4)	36,34±2,8 (5) *	13,92±3,61 (4) *** §§§

La determinación se realizó según se especifica en el apartado de Material y Métodos. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM.

RESULTADOS

a.- Valoración de la actividad de la SOD

La actividad de ésta enzima en los grupos controles tratados tanto con aceite de oliva o con aceite de maíz, presentan una actividad enzimática significativamente superior al comparar con los animales tratados con dieta sólida de laboratorio (PI).

Sin embargo, en los grupos controles alimentados con aceite de maíz se observa una disminución de la SOD (28,92%) en relación con el control oliva.

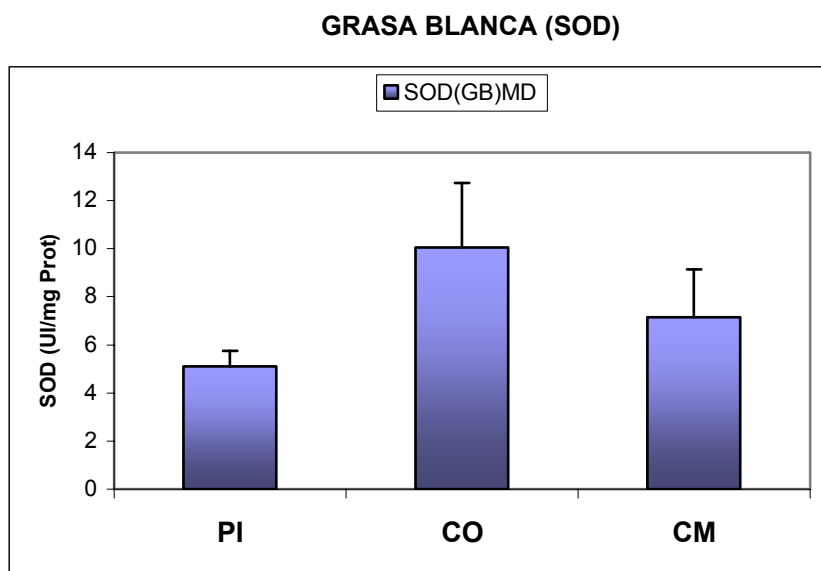


Figura 11: representación de los valores obtenidos de la actividad SOD en grasa blanca abdominal de rata.

b.- Valoración de la actividad de la CATALASA

La Figura 12 presenta gráficamente la actividad de la CAT en los distintos grupos de tratamiento. Se puede apreciar un descenso de la actividad de esta enzima en todos los grupos controles tratados con aceite de maíz y oliva con respecto a los de dieta sólida de laboratorio (**PI**).

El grupo que ingiere aceite de maíz (CM) tiene una actividad enzimática menor (24,98%) frente al grupo alimentados con aceite de oliva (CO).

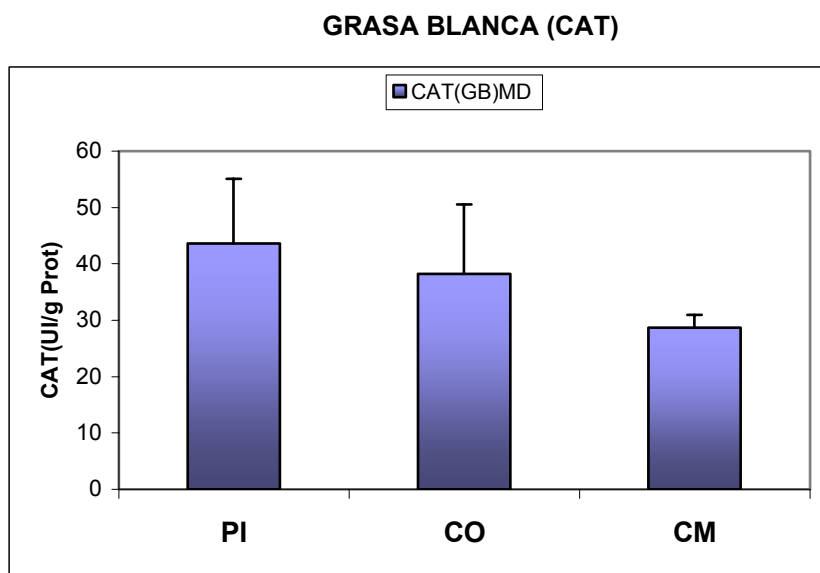


Figura 12: representación de los valores obtenidos de la actividad catalasica en grasa blanca abdominal de rata.

RESULTADOS

c.- Valoración de la actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA

La actividad de la enzima GPX disminuye significativamente en los grupos de tratamiento cuya fuente lipídica es el aceite de maíz. En la Tabla 15 se reflejan en valor numérico la actividad de esta enzima en la grasa blanca de los distintos grupos de tratamiento. La Figura 13 representa gráficamente éstos valores.

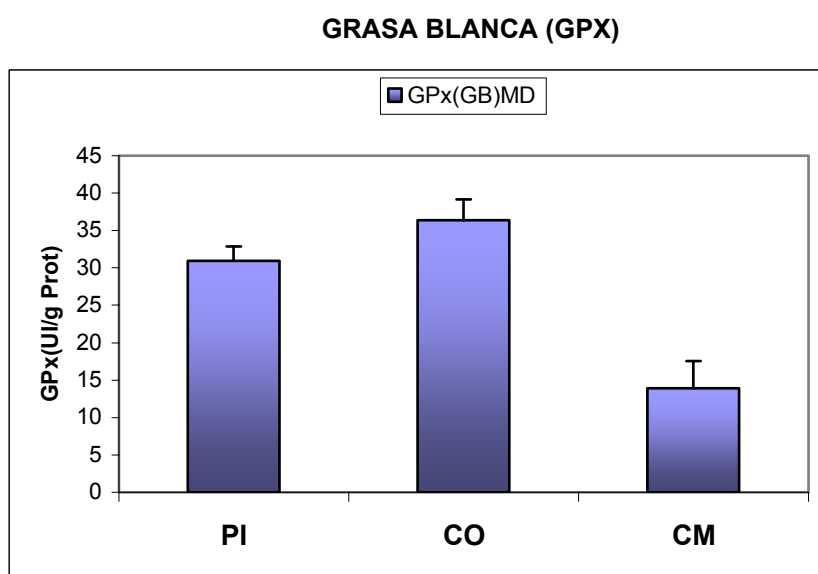


Figura 13: representación de los valores obtenidos de la actividad GPX en grasa blanca abdominal de rata.

4.4.1.3. GRASA PARDA

En la Tabla 16 y en las Figuras se reflejan los valores resultantes de las diferentes actividades enzimáticas en la grasa parda de rata y en los diferentes grupos de tratamiento utilizados.

TABLA 16: ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN GRASA PARDA DE RATAS ALIMENTADAS CON ACEITE DE OLIVA Y MAÍZ

	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAIZ
SOD (UI/mg Prot)	12,68±0,0 (4)	10,12±2,68 (4)	11,63±1,86 (4)
CAT (UI/g Prot)	36,6±1,96 (4)	23,34±1,50 (4) ***	22,81±4,82 (6) ***
GPx (UI/g Prot)	25,54±3,24 (4)	17,05±3,14 (6) ***	21,82±2,08 (5) §

La determinación se realizó según se especifica en el apartado de Material y Métodos. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM.

RESULTADOS

a.- Valoración de la actividad de la SOD

La actividad de la SOD en la grasa parda es más irregular que la que se aprecia en la grasa blanca. Los valores numéricos se presentan en la Tabla 16 y se representan gráficamente en la Figura 14.

Los grupos control tratados con aceite de oliva tienen una tendencia a disminuir esta actividad enzimática frente a los grupos tratados con aceite de maíz y pienso.

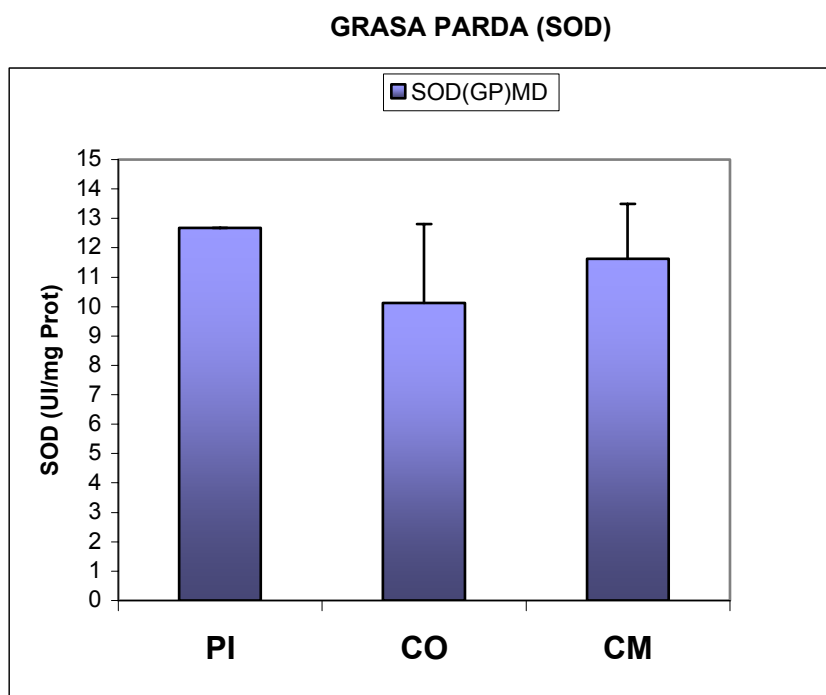


Figura 14: representación de los valores obtenidos de la actividad SOD en grasa parda de rata.

b.- Valoración de la actividad de la CATALASA

La Figura 15 presenta gráficamente la actividad de la CAT en los distintos grupos de tratamiento. Al relacionar los grupos controles entre sí, observamos una disminución significativa tanto en los grupos controles alimentados con aceite de oliva como de maíz (37%) en relación con el de pienso (PI).

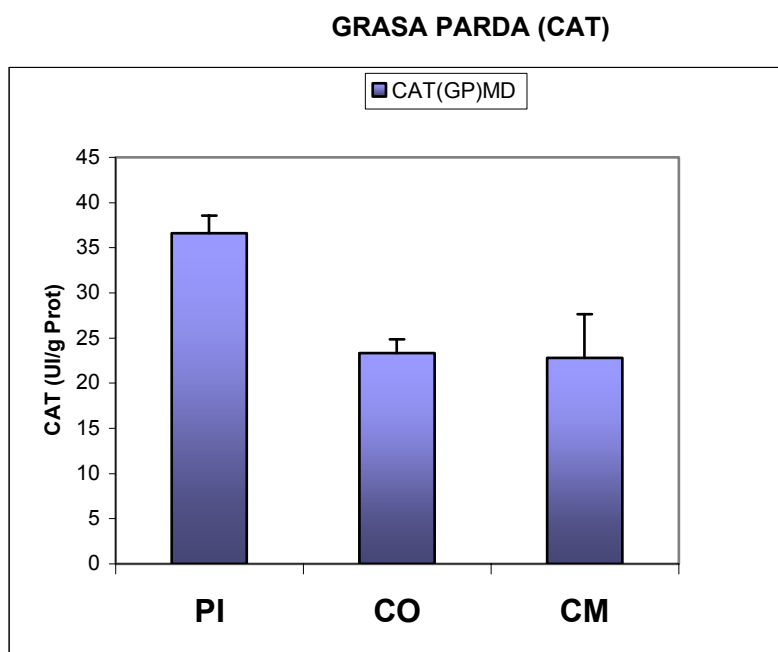


Figura 15: representación de los valores obtenidos de la actividad catalasica en grasa parda de rata.

RESULTADOS

c.- Valoración de la actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA

En la Tabla 16 se recoge la valoración numérica de éstos resultados y en la Figura 16 es la representación gráfica de los resultados.

Al relacionar los grupos controles tratados con aceite de oliva y con aceite de maíz, con los animales tratados con dieta sólida de laboratorio (PI), observamos una disminución significativa de la Gpx sobretodo en los grupos de aceite de oliva.

GRASA PARDA (GPX)

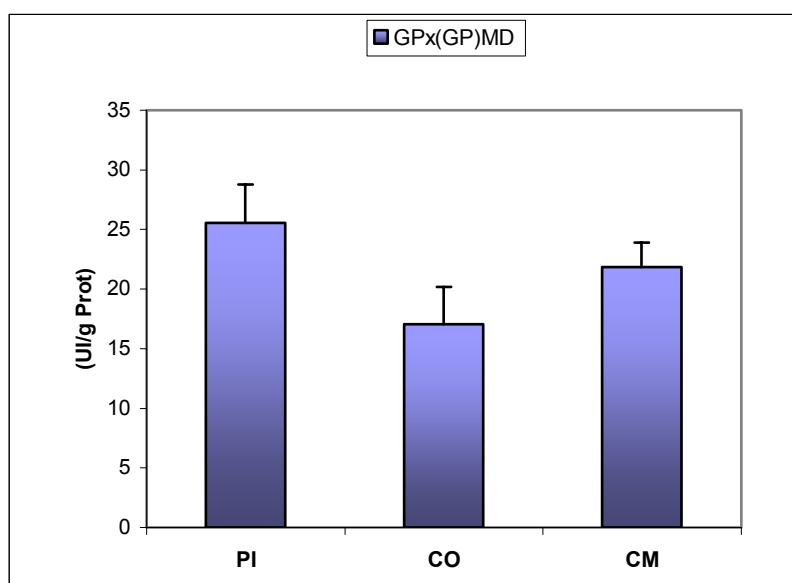


Figura 16: representación de los valores obtenidos de la actividad GPX en grasa parda de rata.

4.4.1.4. CÉLULAS SANGUÍNEAS

En la Tabla 17 y en las Figuras aparecen reflejados los valores resultantes de las diferentes actividades enzimáticas en la sangre de rata y en los diferentes grupos de tratamientos utilizados.

TABLA 17: ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS SANGUINEAS DE RATAS ALIMENTADAS CON ACEITE DE OLIVA Y MAÍZ

	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAIZ
SOD (U/mg Hb)	3,98±0,58(5)	4,19±1,10(7)	4,44±0,73(4)
CAT (U/g Hb)	13,07±2,83(5)	35,41±9,71(5) ***	57,21±10,1 (6) *** \$\$\$
GPx (U/g Hb)	47,85±9,12(5)	27,49±12,61(5) *	50,85±10,1(4) §
GSH (µmol/g Hb)	0,93±0,08(5)	1,80±0,47(5) ***	0,80±0,162(6) \$\$\$

La determinación se realizó según se especifica en el apartado de Material y Métodos. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 \$\$\$ P<0,005 CO respecto CM.

RESULTADOS

a.- Valoración de la actividad de la SOD

Al relacionar los grupos control de aceite de oliva y maíz con dieta sólida de laboratorio (**PI**), no observamos diferencias significativas de esta actividad enzimática, (**Figura 17**).

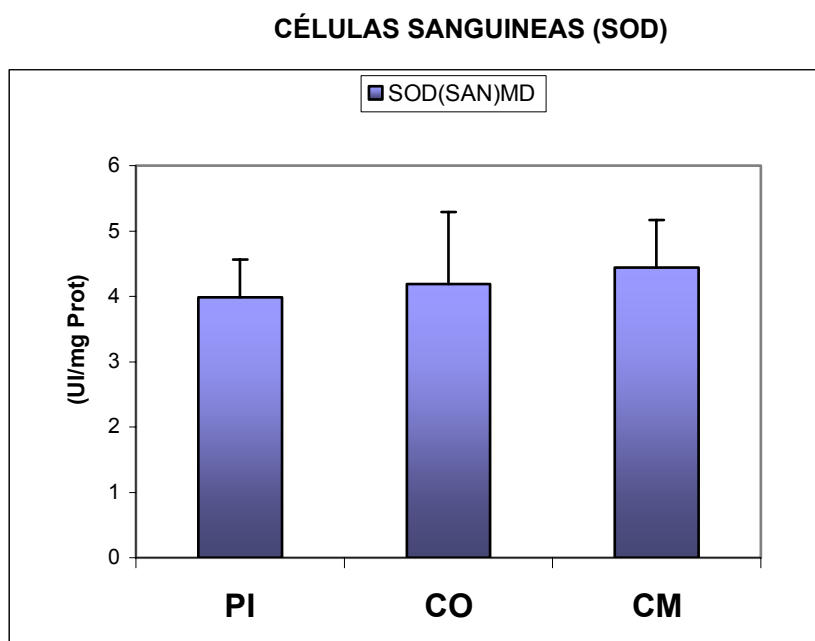


Figura 17: representación de los valores obtenidos de la actividad SOD en células sanguíneas de rata.

b.- Valoración de la actividad de la CATALASA

La Figura 18 presenta gráficamente la actividad de la catalasa en los distintos grupos de tratamiento. Al relacionar los grupos controles de aceite de oliva y maíz, se puede apreciar una disminución significativa del 38% de ésta enzima en los grupos control tratados con aceite de oliva.

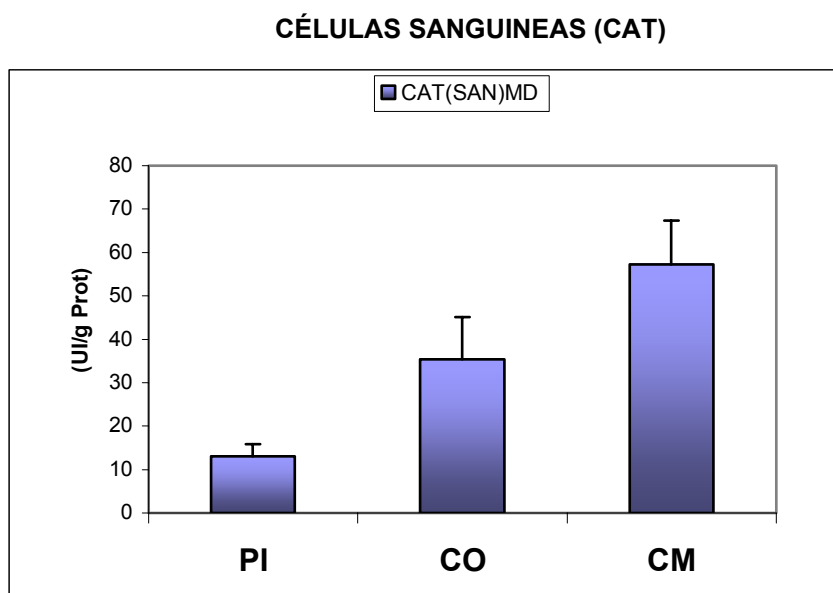


Figura 18: representación de los valores obtenidos de la actividad catalasica en células sanguíneas de rata.

c.- Valoración de la actividad de la GLUTATIÓN PEROXIDASA

Los valores numéricos correspondientes a la actividad de la GPx en sangre se recogen en la Tabla 17 y en la Figura 19 se representan gráficamente los valores obtenidos entre los distintos grupos de tratamientos estudiados.

De modo similar a que hemos observado en la actividad de la catalasa, observamos una disminución significativa de la actividad GPx en los grupos tratados con aceite de oliva al comparar con los grupos tratados con aceite de maíz (45,93%).

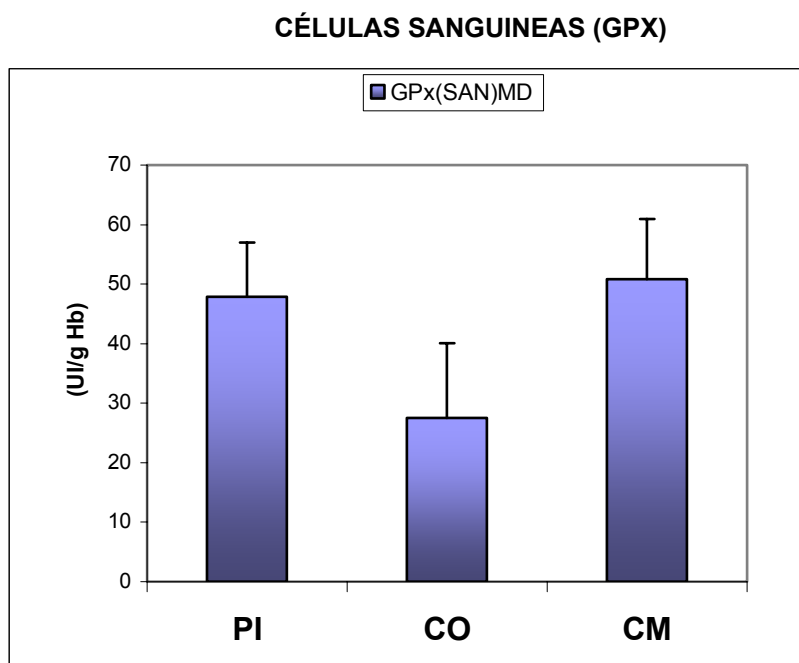


Figura 19: representación de los valores obtenidos de la actividad GPX en células sanguíneas de rata.

d.- Valoración de los niveles del GLUTATIÓN REDUCIDO

Al valorar los resultados de los distintos grupos de tratamiento con aceite de oliva y aceite de maíz, observamos que los grupos tratados con aceite de oliva los niveles de éste tripéptido en la sangre de rata están aumentados significativamente un 55% respecto a los grupos tratados con aceite de maíz, (Tabla 17) y (Figura 20), comportamiento similar observado al estudiar el GSH en hígado total de lo grupos con aceite de oliva (Tabla 13).

CÉLULAS SANGUINEAS (GSH)

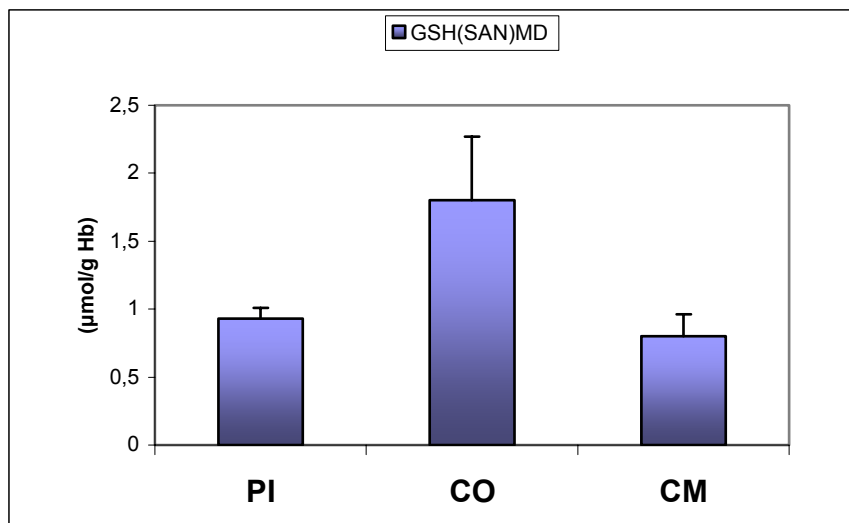


Figura 20: representación de los niveles de GSH en células sanguíneas de rata.

RESULTADOS

4.5. ESTUDIO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHIDO (MDA) EN PLASMA

Los valores correspondientes a la concentración de Malondialdehido (MDA) se recogen en la Tabla 18 y en la Figura 21 se representan gráficamente los resultados obtenidos.

Al valorar los resultados de los distintos grupos controles de tratamiento, no encontramos concentraciones significativas de peroxidación lipídica.

TABLA 18: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHIDO EN PLASMA DE RATAS ALIMENTADAS CON ACEITE DE OLIVA Y MAÍZ

DIETAS	MDA (nmol/ml)
PIENSO	532,8±130(6)
CONTROL OLIVA	596.5±155.8(7)
CONTROL MAIZ	608,43±113(5)

La determinación se realizó según se especifica en el apartado de Material y Métodos. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM.

MDA EN PLASMA

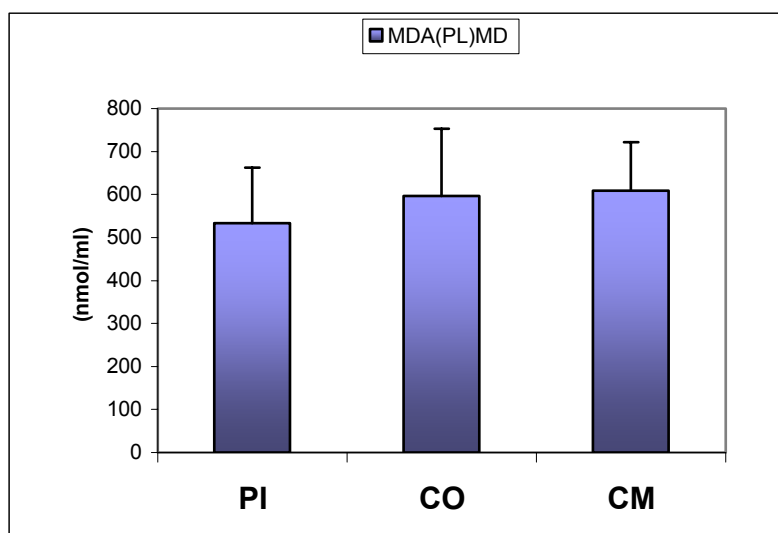


Figura 21: representación de los valores obtenidos de la concentración de MDA en plasma de rata.

4.6. INTERACCIONES METABOLICAS EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

Para este estudio metabólico hemos empleados hepatocitos aislados de ratas, sometidas a una dieta líquida a base de aceite de oliva y maíz. La incubación se realizó a 37°C durante 60 minutos con agitación suave y constante a una atmósfera de O₂-CO₂ 95/5%, detallado en el apartado de Material y Métodos.

4.6.1. Estudio de la liberación de LDH en hepatocitos aislados de ratas

En la Tabla 19 se presentan numéricamente los valores obtenidos de LDH liberada al medio de incubación por los hepatocitos aislados de rata de los distintos grupos de tratamiento.

Al relacionar los grupos control de aceite de oliva, encontramos una disminución significativa de las concentraciones de LDH (83%) a lo largo de la incubación al comparar con el control maíz.

Este efecto protector inducido por el *aceite de oliva* es más significativo que en los grupos de aceite de maíz.

TABLA 19: ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DEL LDH EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA ALIMENTADAS CON ACEITE DE OLIVA Y ACEITE DE MAÍZ.

LDH UI/g. cels.	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
Control T= Cero	67,33± 4,93(6)	92,19 ± 14,68(5) ***	101,90 ± 17,77(5) ***
Control 60 min.	69,55 ± 7,38(7)	100,93 ± 4,64(6) ***	184,77 ± 39,21(4) *** §§§

Aproximadamente 80 mg de hepatocitos aislados de rata alimentada, fueron incubados por duplicado en matraces de 25 ml. El volumen final de la incubación fue de 4 ml conteniendo suspensión de células y solución salina de Krebs-Henseleit pH 7,4. Las incubaciones se realizaron durante 60 min. a 37°C. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM.

LDH EN HEPATOCITOS

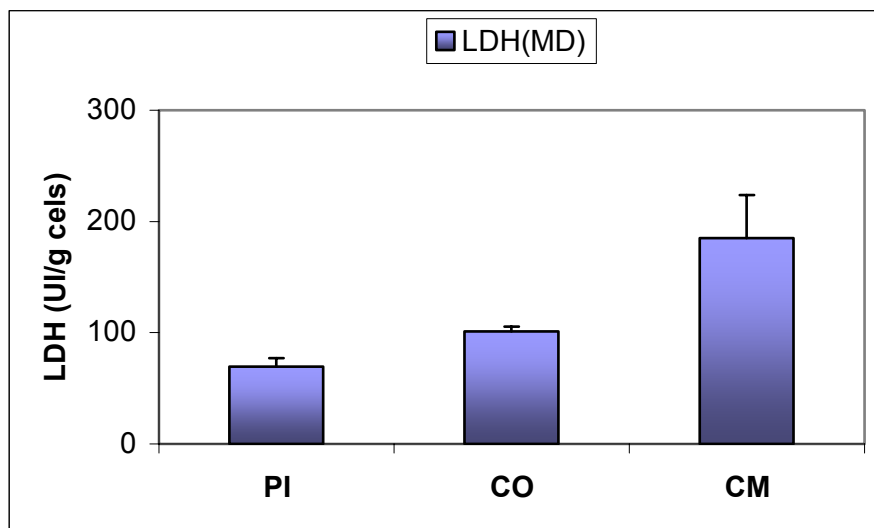


Figura 22: Estudio de la liberación del LDH en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

4.6.2. Estudio de los niveles del GSH en hepatocitos aislados de ratas

En la Tabla 20 se recogen los valores numéricos del Glutatión Reducido (GSH) en $\mu\text{moles/g.células}$.

Los grupos de animales tratados con aceite de oliva, los niveles de GSH a tiempo cero ($T=0$) se encuentran dentro de lo considerado como fisiológico, entre 4 y 5,5 $\mu\text{moles/g.células}$.

A los 60 minutos de incubación este valor disminuye y se sitúa alrededor de los 3 $\mu\text{moles/g.células}$ sin observarse cambios significativos inducidos por la dieta control de aceite de oliva.

Al comparar los niveles de GSH entre los distintos grupos controles, se observa un aumento significativamente ($p<0,005$) en los grupos control de aceite de maíz respecto al grupo control (CO) y (PI), demostrándose así el efecto protector en los grupos control tratados con aceite de maíz (Figura 23).

TABLA 20: ESTUDIO DE LOS NIVELES DE GSH EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA ALIMENTADAS CON ACEITE DE OLIVA Y ACEITE DE MAIZ

GSH µmoles/g.céls.	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
Control T= Cero	3,72 ± 0,835(5)	5,57 ± 0,71(11)***	6,94±1,8 (3) * §
Control 60 min.	3,33 ± 0,76(5)	3,69 ± 0,605(8)	7,07±0,89 (5) *** §§§

Aproximadamente 80 mg de hepatocitos aislados de rata alimentada, fueron incubados por duplicado en matraces de 25 ml. El volumen final de la incubación fue de 4 ml conteniendo suspensión de células y solución salina de Krebs-Henseleit pH 7,4. Las incubaciones se realizaron durante 60 min. a 37°C. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM,

GSH EN HEPATOCITOS

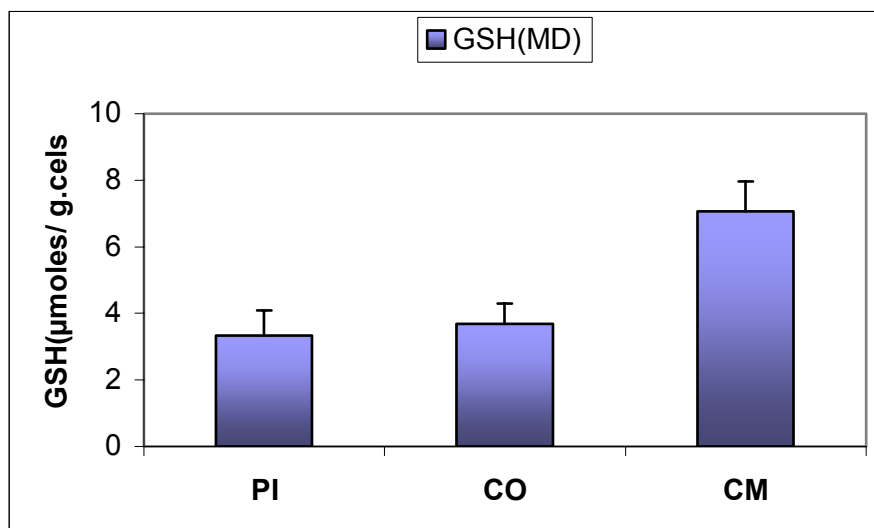


Figura 23: Estudio de los niveles de GSH en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

4.6.3. Estudio de la producción de MDA en los hepatocitos aislados de ratas

Se observa en la Tabla 21 los valores numéricos del MDA, índice de peroxidación lipídica, expresada en $\mu\text{moles/g.céls}$ en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz.

Al relacionar los distintos grupos controles entre ellos observamos un aumento significativo ($p < 0,005$) de la producción de MDA en el grupo alimentado con aceite de maíz (**Figura 24**).

TABLA 21: ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE MDA EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA ALIMENTADA CON ACEITE DE OLIVA Y MAIZ

MDA µmoles/g.céls.	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
Control T= Cero	16,59 ± 5,27(5)	18,51 ± 3,67(8)	14,20 ± 1,51(4) §
Control 60 min.	145,5 ± 31,22(7)	25,24 ± 3,94(8) ***	168,61 ± 57,42(4) §§§

Aproximadamente 80 mg de hepatocitos aislados de rata alimentada, fueron incubados por duplicado en matraces de 25 ml. El volumen final de la incubación fue de 4 ml conteniendo suspensión de células y solución salina de Krebs-Henseleit pH 7,4. Las incubaciones se realizaron durante 60 min. a 37°C. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz)..

Los valores están expresados en media ± SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.

§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM.

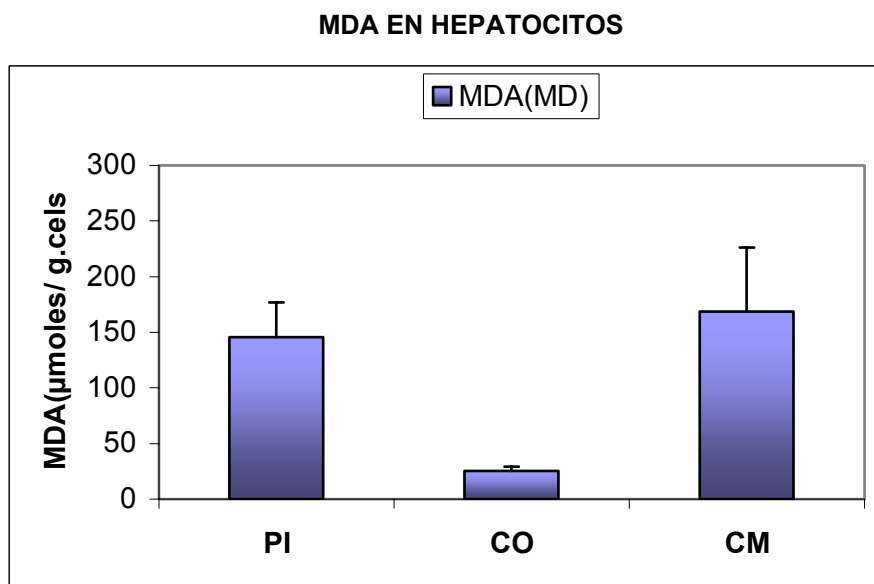


Figura 24: Estudio de la producción del MDA en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

4.6.4. Estudio del estado Redox Citosólico (NAD⁺/NADH) en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz.

En la Tabla 22 se relacionan los valores obtenidos del Piruvato (Tabla 22.A); L- Lactato (Tabla 22.B); y el estado Redox Citosólico (Tabla 22.C), en hepatocitos aislados de los distintos grupos de animales estudiados.

En condiciones básicas, no se observan diferencias en los niveles de Piruvato cuando se comparan los grupos control de aceite de oliva y maíz.

Tras 60 minutos de incubación se producen cambios dependiendo del grupo nutricional, estos valores se triplican en los grupos tratados con dieta sólida de laboratorio (PI).

Sin embargo, este efecto no se observa en los grupos tratados con aceite de oliva, demostrándose una tendencia a aumentar los niveles de Piruvato en el control de aceite de maíz (Tabla 22.A).

La concentración de Lactato (Tabla 22.B) experimenta cambio, al contrario de lo que se observa con el piruvato. El lactato es significativamente menor en los hepatocitos de rata alimentada con aceite de maíz, tanto antes como después de 60 minutos de incubación. Y en los grupos (PI) tratados con dieta sólida de laboratorio y tratados con aceite de oliva, observamos un aumento significativo de la concentración de lactato tras 60 minutos de incubación.

En la Tabla 22.C se recoge el Estado Redox Citosolico (NAD^+/NADH) en hepatocitos aislados de ratas incubadas. Tanto en los ratios de tiempo inicial como después de 60 minutos de incubación los resultados son muy diferentes dependiendo del tipo de aceite suministrado. En el grupo control oliva el estado redox al $T=0$ es mayor que a los 60 minutos de incubación. Sin embargo, en el control maíz esta relación aumenta a los 60 minutos pasando de 3726 a 5063.

Como consecuencia de la actividad metabólica de las células de incubación durante 60 minutos, se produce una disminución del estado redox citosólico en el grupo (CO) lo que indica una clara tendencia hacia la reducción de este compartimento. Por el contrario, en los grupos control de aceite de maíz (CM) en estas mismas condiciones experimentales el efecto es en sentido de aumentar el cociente NAD^+/NADH .

RESULTADOS

TABLA 22: Niveles de Piruvato, Lactato y el estado Redox Citosólico (NAD⁺/NADH) en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con aceite de oliva y aceite de maíz.

TABLA 22.A.- PIRUVATO μ moles/g. cels.

PIRUVATO	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAIZ
T=0	2,42 \pm 0,64 (6)	1,68 \pm 0,61 (14) *	1,73 \pm 0,74 (6)
T=60	7,57 \pm 1,86 (6)	1,51 \pm 0,50 (11) ***	2,20 \pm 0,70 (6) ***§

TABLA 22.B.- LACTATO μ moles/g. cels.

LACTATO	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAIZ
T=0	11,13 \pm 2,9 (6)	9,82 \pm 3,71 (10)	4,22 \pm 1,35 (5) *** §§§
T=60	32,44 \pm 5,9 (5)	14,22 \pm 3,77 (5) ***	3,95 \pm 0,78 (4) *** §§§

TABLA 22.C.- NAD⁺/NADH (Citosol)

NAD ⁺ /NADH (Citosol)	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAIZ
T=0	1976	1555	3726
T=60	2121	965	5063

Aproximadamente 80 mg de hepatocitos aislados de rata alimentada, fueron incubados por duplicado en matraces de 25 ml. El volumen final de la incubación fue de 4 ml conteniendo suspensión de células y solución salina de Krebs-Henseleit pH 7,4. Las incubaciones se realizaron durante 60 min. a 37°C. Los grupos estudiados fueron: PI (pienso), CO (control oliva), CM (control maíz).

Los valores están expresados en media \pm SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,005 PI respecto CO, PI respecto CM.
§ P<0,05 §§ P<0,01 §§§ P<0,005 CO respecto CM.

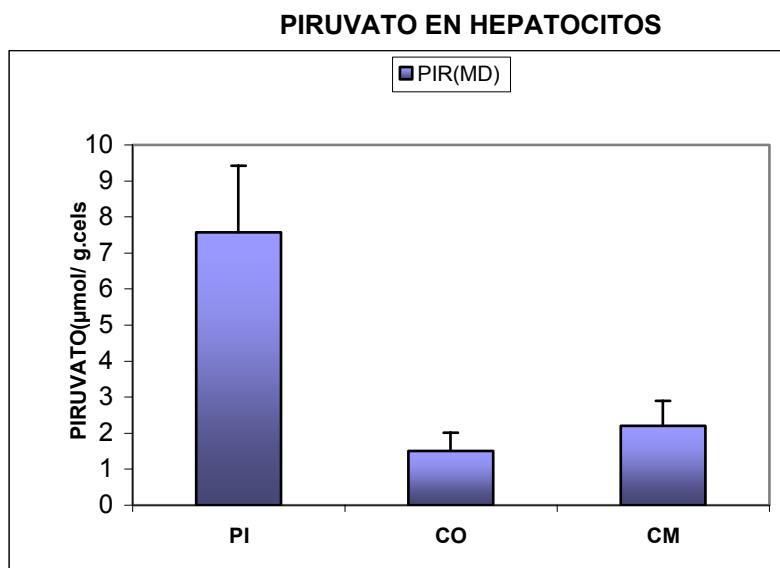


Figura 25: Estudio de los niveles del Piruvato en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

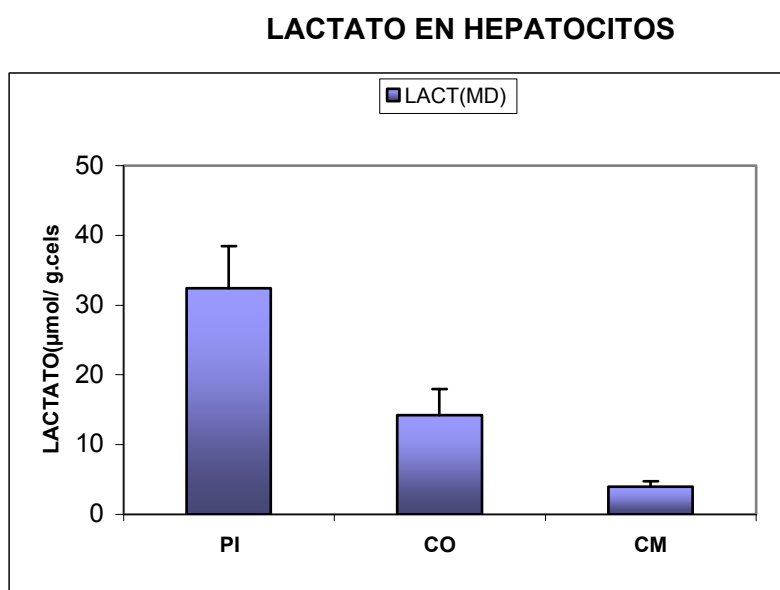


Figura 26: Estudio de los niveles del Lactato en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

4.6.5. Estudio del estado Redox Mitocondrial (NAD^+/NADH) en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con aceite de oliva y maíz.

En la Tabla 23 A, B, C, se representan los valores de Acetoacetato, β -OH-Butirato y estado Redox Mitocondrial respectivamente de las células hepáticas de rata.

Los hepatocitos de rata alimentadas con aceite de maíz control presentan niveles de acetoacetato significativamente superior al comparar los grupos controles (CO) y (PI). Esta diferencia se observa tanto en los hepatocitos recién aislados (T=0) como en aquellos incubados durante 60 minutos.

Respecto al β -hidroxibutirato la modulación de este metabolito coincide con lo observado con el acetoacetato. En los hepatocitos de ratas control alimentadas con aceite de maíz se observa una tendencia a aumentar estos valores tanto en los hepatocitos incubados a (T=0) como aquellos tras 60 minutos de incubación.

Respecto al estado Redox Mitocondrial (NAD^+/NADH) en los hepatocitos de los distintos grupos estudiados, se observa una evolución del metabolismo de estas células, con un incremento del estado oxidativo a los 60 minutos de incubación.

TABLA 23: Nivel de Acetoacetato y β -OH-Butirato y el estado mitocondrial (NAD^+/NADH) en hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y aceite de maíz.

TABLA 23.A.- ACETOACETATO $\mu\text{moles/g. céls.}$

ACETOACETATO	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
T=0	1,26 \pm 0,35 (6)	1,92 \pm 0,44 (15) ***	4,04 \pm 1,01 (5) *** §§§
T=60	9,08 \pm 2,07 (6)	10,86 \pm 2,6 (10)	22,7 \pm 3,74 (4) *** §§§

TABLA 23.B.- β -OH-BUTIRATO $\mu\text{moles/g. céls.}$

β -OH-BUTIRATO	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
T=0	1,21 \pm 0,30 (4)	1,66 \pm 0,37 (14) *	2,60 \pm 0,32 (4) *** §§§
T=60	2,60 \pm 0,68 (5)	4,46 \pm 1,34 (11) **	4,92 \pm 0,50 (5) ***

TABLA 23.C.- NAD^+/NADH (Mitocondrial)

NAD^+/NADH Mitocondrial	PIENSO	CONTROL OLIVA	CONTROL MAÍZ
T=0	21	23	31
T=60	70	49	93

Condiciones de incubación fueron iguales a las que se especifican en la Tabla 22. La determinación de acetoacetato, β -OH-butirato se realizaron siguiendo las condiciones descritas en el apartado de Material y Métodos.

Los valores están expresados en media \pm SD y el número de casos entre paréntesis. Para la significancia se utilizó la t-student comparando:

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,005$ PI respecto CO, PI respecto CM.

§ $P < 0,05$ §§ $P < 0,01$ §§§ $P < 0,005$ CO respecto CM.

ACETOACETATO EN HEPATOCITOS

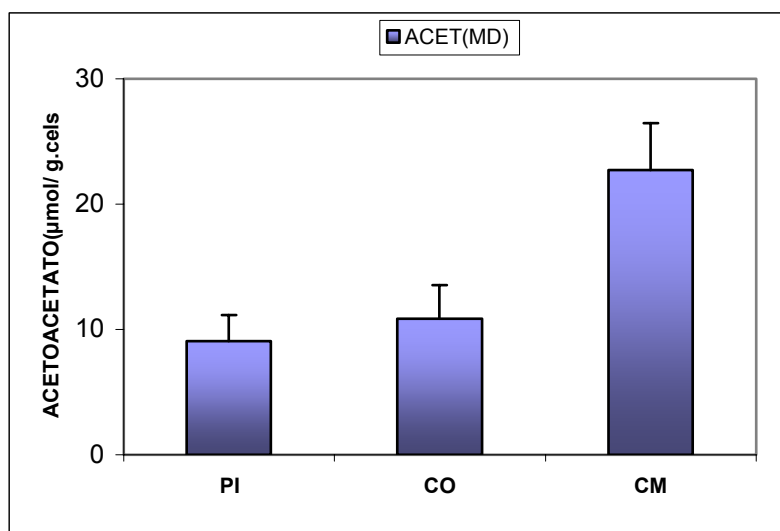


Figura 27: Estudio de los niveles de Acetoacetado en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

β-OH-BUTIRATO EN HEPATOCITOS

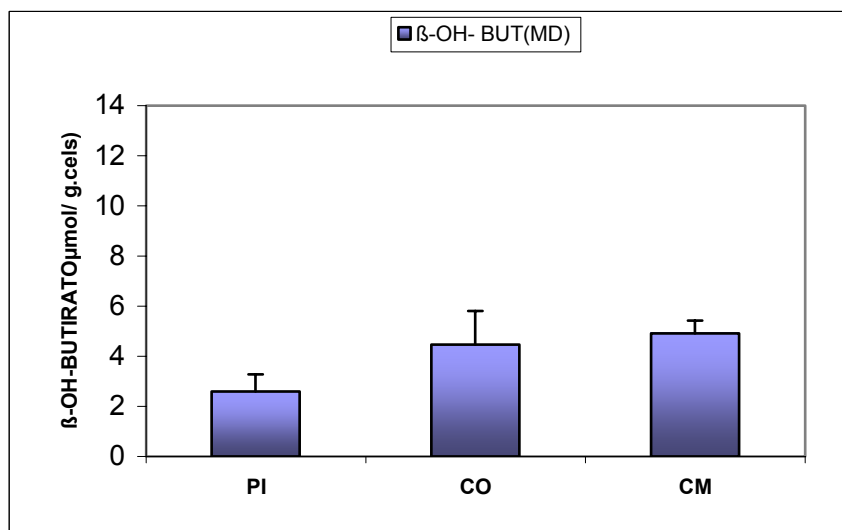


Figura 28: Estudio de los niveles de β-OH-Butirato en los hepatocitos aislados de rata alimentada con aceite de oliva y maíz.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSION

MODELO DE DIETA EXPERIMENTAL

Los estudios en el campo de las alteraciones bioquímicas que se asocian a diversas alteraciones nutricionales requieren un estricto control de todos los factores nutricionales que inciden sobre la alimentación de los animales de experimentación; pequeñas modificaciones en la composición de la dieta (que pueden afectar a la distinta naturaleza de los *macronutrientes* o a los niveles de *micronutrientes*) pueden inducir importantes cambios metabólicos y enmascarar las modificaciones inducidas propiamente por la alteración nutricional sometida a estudio (Moore, 1987; Llado *et al.* 1991; Dulloo, *et al.* 1992; Bech, *et al.* 1994; Harris *et al.* 1995). De este modo, debemos obtener un perfecto control de los componentes de la dieta suministrada a los animales que permitirá establecer una relación causa-efecto más certera y conducir a una interpretación más correcta de los resultados obtenidos.

En nuestro estudio nos hemos centrado inicialmente en conseguir un modelo de dieta experimental, en el cual los animales de experimentación recibieron una dieta líquida limitada isoenergéticamente respecto al grupo de animales alimentados con dieta sólida de laboratorio, variando únicamente el tipo de lípidos y manteniendo las mismas proporciones en macronutrientes, como las vitaminas, minerales y con la misma calidad nutricional.

Este modelo de dieta experimental fue planteado en base a la utilización de "Dietas Líquidas", puesto que esta forma de administración permite realizar las manipulaciones dietéticas de forma sencilla y conocer exactamente los componentes nutricionales de la dieta. Ha sido suficientemente demostrado que el aumento en el consumo de lípidos ha dado lugar a la realización de numerosos estudios acerca de la relación entre la cantidad y la calidad de la grasa dietética y ciertas patologías crónicas como el

DISCUSIÓN

cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Fitó M, 2000; Durá Travé T, 2001; Páramo JA, 2001; Stark AH, 2002; Belido C *et al.* 2005; Marín C., 2005).

Los hábitos dietéticos han sido siempre un referente sociocultural de los distintos pueblos, pero la evidencia científica generada en los últimos años relacionando la dieta y el estado de salud (Hushi LH *et al.* 1995; López J, 2000) ha sido determinante para que los hábitos alimentarios de una población se consideren en la actualidad un indicador tanto social como sanitario (Sabaté J, 1992; Durá Travé T, 2001).

De esta forma, las posibles modificaciones del metabolismo oxigénico que pretendíamos estudiar serían atribuibles exclusivamente en la modificación del tipo de lípidos y a la naturaleza de los *ácidos grasos* suministrados a los animales de experimentación, sin la introducción de otras variables nutricionales, como diferencias en el aporte de micronutrientes, calidad de proteínas, variación de las cantidades y naturaleza de los glúcidos, factores todos ellos que podrían afectar directa o indirectamente al metabolismo oxigénico.

Inicialmente nos basamos en las formulaciones de dietas líquidas puestas a punto en la Tesis Doctoral del Dr. Ernesto Estornell en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia (1991), estas dietas las estaban empleando para el estudio del "*Metabolismo Proteico*" y una de las conclusiones a la que se llegó fue que los animales sobrealimentados, los que ingieren más cantidad de lípidos en su dieta, mostraron un incremento generalizado de la "*síntesis de proteínas*" en todos los órganos y tejidos estudiados, pero acompañado de un aumento simultáneo de la degradación, aunque con un balance positivo a favor de la ganancia de proteínas.

A fin de evitar problemas en la ingesta de lípidos de las dietas formuladas se acoplo la cantidad de lípidos empleados en la composición de la dieta *Líquida Control*, al la que contiene la *Dieta Sólida* empleada en nuestro

laboratorio y conseguir con ello que la dieta Líquida tuviera una cantidad de lípidos lo más ajustado posible a la que se incluye en la fabricación del pienso destinado a la alimentación diaria en el animalario (*ver resultado*, Tabla 07) y de esta manera se utiliza un grupo de animales alimentados con *dieta sólida de laboratorio* como grupo de referencia de los posibles cambios que pudiéramos encontrar en nuestro estudio (Corbett, *et al.* 1986).

Por otro lado, observamos que, probablemente debido a la consistencia líquida de la dieta, los animales de los grupos *Control* ingerían una cantidad ligeramente superior de energía a la de los animales alimentados con la *Dieta sólida de laboratorio*, hecho también observado por otros investigadores (Ramírez, 1987 y 1988), por lo que optamos por ajustar la ingesta de alimento de estos animales a la que tomaban los animales de la misma edad y tamaño alimentados "*ad libitum*" con la dieta de laboratorio.

El modelo definitivo de dietas líquidas control quedó establecido, tras las experiencias previas realizadas, alimentando a los animales de los grupos Control de aceite de oliva y aceite de maíz con la dieta formulada de 960 Kcal/l y con un aporte de lípidos de 8,5 g/l, lo que supone una ingesta media de lípidos de 0,50 g/día en estos grupos ya que al mismo tiempo fue controlada isoenergéticamente respecto a la cantidad ingerida por los animales con *dieta sólida de laboratorio* que, según la documentación remitida por la compañía suministradora del pienso, contienen un porcentaje de un 3,6% de lípidos en forma de grasas brutas, lo que supone una ingesta de lípidos en este grupo de 0,52 g/día (Tabla 07).

Uno de nuestros objetivos ha sido estudiar el metabolismo oxidativo de los diferentes tipos de ácidos grasos en la dieta, por un lado el aceite de oliva como representante de los ácidos grasos monoinsaturados, y por otro lado el aceite de maíz como representante de los ácidos grasos poliinsaturados.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en relación a la cantidad de dieta ingerida por estos grupos durante el tratamiento no varía en relación con los anteriores, pero sí varía la cantidad de vitamina E que ingiere cada grupo diariamente durante el tratamiento dietético, no sólo, obviamente por la naturaleza de lípidos mencionada, sino por la cantidad de ésta que de forma natural, se encuentran en los aceites utilizados para este trabajo (Tabla 09).

DESARROLLO CORPORAL DE LOS ANIMALES

Los animales de los grupos control de aceite de maíz y de dieta sólida de laboratorio tienen un crecimiento relativamente mayor con respecto al grupo alimentado con dieta control de aceite de oliva. (apartado de *Resultados* Tabla 10). Estas pequeñas diferencias encontradas podrían explicarse si tenemos en cuenta que la cantidad de glúcidos que contienen la dieta control tratado con aceite de maíz (Smith JC, 2004) y dieta sólida es de un 7 a 10% más de calorías que las dietas control de aceite de oliva, lo que supone que estos animales ingieren diariamente 60,16 Kcal frente 55,58 Kcal que ingieren los grupos control oliva (ver *Resultados* Tabla 08).

Los animales de los grupos control de aceite de maíz y dieta sólida mostraron un crecimiento uniforme desde el principio del tratamiento dietético con una tasa de crecimiento a lo largo del período global de 2,85 g/ día y 2,53 g/día respectivamente, frente a 2,15 g/día en los animales control de aceite de oliva (Pan DA *et al.* 1993).

DESARROLLO DE TEJIDOS

El estudio realizado sobre el desarrollo del tejido adiposo retroperitoneal y adiposo marrón en los animales alimentados con dietas líquidas, mostró que los animales tratados con aceite de maíz incrementaron de peso de los cuales se acompañó con un considerable aumento del *tejido*

adiposo blanco (Faust *et al.* 1978; Mandenoff *et al.* 1982). Estudios realizados recientemente indican que no solamente la cantidad de la grasa dietética, pero también el tipo de grasa utilizado es el responsable en la producción de diferentes efectos en el peso corporal y en el metabolismo (Gorinstein S *et al.* 2002).

En relación al desarrollo de la *grasa parda* de estos animales no encontramos diferencias significativas de peso de este tejido a lo largo del tratamiento global (Tabla 11).

El desarrollo del hígado en los animales alimentados con aceite de maíz fue mayor que en los otros grupos control estudiados, desarrollo acorde con el mayor peso corporal de estos animales (Estornell, *et al.* 1994b), (ver *resultados*, Tabla 11).

METABOLISMO OXIGENICO

En el organismo existe un complejo sistema de defensa frente a la generación de *radicales libres* que se producen en respuesta a diferentes situaciones fisiológicas o patológicas; este sistema está constituido por un sistema antioxidante enzimático del que forma parte los enzimas que hemos estudiado (SOD, Catalasa y GPX) y un extenso sistema antioxidante no enzimático o químico del que nosotros hemos analizado el GSH y el efecto de la Vitamina E presente de forma natural en los diferentes grupos experimentales tratados con aceite de oliva y maíz. Cabe esperar, que estos sistemas sean capaces de actuar eficazmente contra la posible generación de especies oxigénicas reactivas (ROS) creadas o formadas en nuestro modelo experimental. Para conocer la situación y eficacia de los sistemas antioxidantes hemos determinado la producción de MDA como índice de peroxidación lipídica.

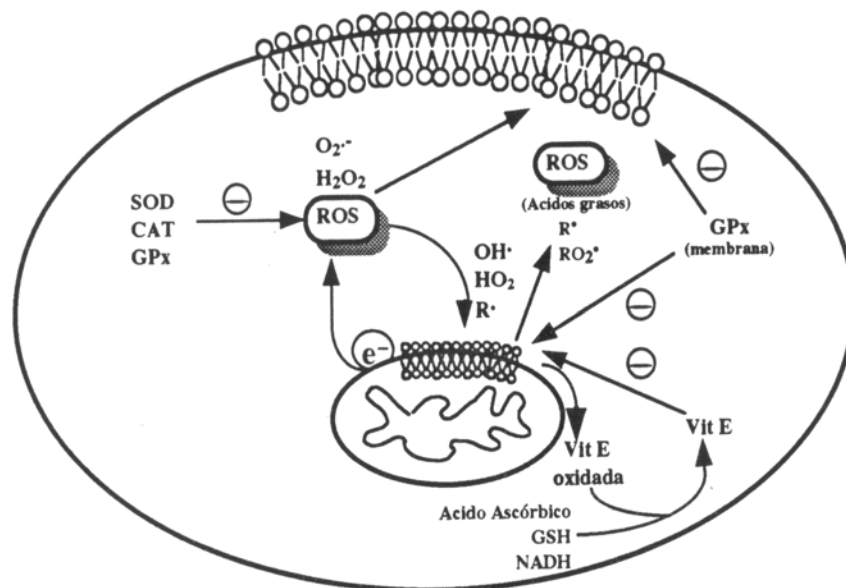
DISCUSIÓN

Los lípidos de la dieta son utilizados a) como sustrato energético, al entrar en las mitocondrias y utilizarse para la generación de ATP y b) para su incorporación a las membranas celulares; la incorporación a éstas, depende de la cantidad y del tipo de ácido graso ingerido, según la Figura 29.

A partir de sustratos autooxidables endógenos y/o exógenos, se formarían ROS primarios (O_2^- y H_2O_2 entre otros). Para metabolizar estos ROS existe fundamentalmente una tríada enzimática formada por la SOD, Catalasa y Glutatión Peroxidasa. Su eficacia reside en una triple acción defensiva al a) reducir a las especies oxigénicas, b) impedir la interacción de éstas entre sí para dar lugar a especies de mayor reactividad como el *radical libre hidroxilo* y c) reparar las macromoléculas peroxidadas. Esta tríada está ayudada por un extenso sistema antioxidante no enzimático o químico (ciertas vitaminas, GSH, ubiquinona, ácido úrico etc...). Si la defensa antioxidante es inferior a la producción de especies reactivas éstas podrían reaccionar entre sí o con otras moléculas dando lugar a otros radicales (OH^{\cdot} , HO_2 , R^{\cdot}), responsables del daño a nivel de las membranas celulares, además de otras alteraciones moleculares.

Por la autooxidación de los lípidos existentes en las membranas celulares, aparecerían otro tipo de ROS los R^{\cdot} , RO_2 entre otros. La acción defensiva del sistema antioxidante no enzimático es fundamental en estas circunstancias y dependerá de una interacción directa sobre la especie reactiva, para rendir complejos estables o de menor reactividad.

FIGURA 29: PRODUCCIÓN DE ROS



A continuación se revisan los resultados más representativos de este trabajo en relación a la defensa antioxidante enzimática formada por la SOD, Catalasa y Glutatión Peroxidasa, en los distintos compartimientos de la rata, como: hígado total (HT), grasa blanca (GB) y grasa parda (GP) y células Sanguíneas. Así se observaron los cambios asociados al tipo de aceite en la dieta de los animales estudiados, y su respuesta a los efectos de la manipulación experimental sobre los niveles de un antioxidante natural presente en los aceites, la vitamina E.

1. Evolución de la SOD

Nuestros resultados parecen indicar, que la situación producida en donde se varia el tipo de lípidos en la dieta, en este caso por un ácido poliinsaturado como el aceite de maíz se traduce en resultados teóricamente indicativos de un daño o agresión por especies oxigénicas al comparar con el aceite de oliva (monoinsaturado), puesto que se observa una disminución significativa de la actividad de la SOD en los siguientes compartimentos estudiados, hígado total (HT), grasa blanca (GB) y grasa parda (GP), si bien en este último la actividad de la SOD presenta una ligera tendencia a la inducción de está enzima (*ver en resultados*, Figura 14).

2. Evolución de la Catalasa

La catalasa es otra de las enzimas en la defensa de los organismos aerobios contra el estrés oxidativo. Su función catalítica consiste en degradar el H₂O₂. Esta función es doblemente importante ya que por un lado retira del medio celular el producto de la acción enzimática de la SOD disminuyendo así la concentración de un agente oxidante como es el peróxido de hidrógeno, y también evita la interacción de este con otras especies reactivas como con metales de transición y la posterior formación de radicales hidroxilo (OH[·]), a través de la reacción de Haber-Weiss y Fenton. Esta especie oxigénica es un candidato excelente para la inducción de la modificación oxidativa del DNA y como consecuencia de ello, para el potencial mutagénico de la misma (Sun, 1990; y Floyd, 1990).

Esta enzima se encuentra distribuida por una extensa y diversa familia de especies, mientras que en otras está ausente o con muy poca actividad. Se han encontrado cambios en las actividades de la enzima asociados con el desarrollo de diversos organismos. En mamíferos, estos cambios parecen no ser tan generalizados y depende más del tipo de tejido bajo estudio de comparación con lo que se observa con la SOD (Tsukada *et al.* 1985).

Con el sistema experimental utilizado se ha observado que en homogenados de hígado total y grasa blanca de ratas, la actividad catalásica es menor en los grupos control maíz al comparar los grupos control oliva (*ver en resultados* Figuras 07 y 12).

Sin embargo, la actividad en los tejidos de grasa parda no se observan diferencias en ambos grupos control del modelo experimental estudiados (Figura 15 y Tabla 16).

La disminución significativa de la Catalasa parece apoyar la idea de que un aumento de *Radicales Libres* producidos por estos ácidos grasos (poliinsaturados) en la cascada peroxidativa lipídica, provocaría un consumo de vitamina E lo que implicaría una disminución de la Catalasa, debido a que esta vitamina participa en la síntesis de las proteínas hémicas que forman parte del grupo prostético de dicha enzima (Romero D *et al.*, 1987).

3. Evolución de la GPx y GSH

Se trata de una enzima antioxidante (GPx) que desempeña una función muy importante como mecanismo eliminador de productos de oxidación de la célula. Utiliza al glutatión reducido como co-substrato suministrador de equivalentes reducidos y es la encargada de la degradación de peróxidos lipídicos y H₂O₂. Como en el caso de la catalasa, la GPx está ampliamente distribuida si bien en algunos tipos de células u orgánulos ésta se encuentra en muy baja concentración e incluso ausente, como en microsomas y peroxisomas, lugar dónde es más abundante la catalasa.

Los resultados obtenidos señalan que la actividad de ésta enzima en el HT y GB de ratas control maíz respecto a ratas control oliva hay una disminución significativa de la GPx, (*ver resultado* Figura 08 y 13). Una

DISCUSIÓN

situación similar hemos observado en los sistemas antioxidantes de la SOD y Catalasa.

Sin embargo, los resultados a nivel de grasa parda, revelan un incremento significativo del 21,8% de la actividad GPx en los animales control alimentados con aceite de maíz (Tabla 16), por otra parte esto estaría de acuerdo con el papel que juega la vitamina E y el GSH, en la neutralización de *Radicales Libres* generados a partir de ácidos grasos poliinsaturados (Figura 29). La vitamina E, en su actuación de inactivación de estos ROS, se oxida y pierde su actividad, pero, en parte puede ser generada mediante un ciclo “redox” con el ácido ascórbico, NADH, y GSH para poder seguir actuando como antioxidante (Serbinova E *et al.* 1991; Packer L, 1994). El efecto antioxidante de estas sustancias así como el de la Ubiquinona o coenzima Q (Kagan V *et al.* 1990) no es solo el de captar directamente estos radicales, sino también el de reciclar y aumentar el poder antioxidante de la vitamina E.

El glutatión reducido (GSH) es otro de los parámetros a tener en cuenta a la hora de estudiar los mecanismos bioquímicos y factores que desempeñan un papel en el modelo experimental con ratas control con aceite de oliva y aceite de maíz.

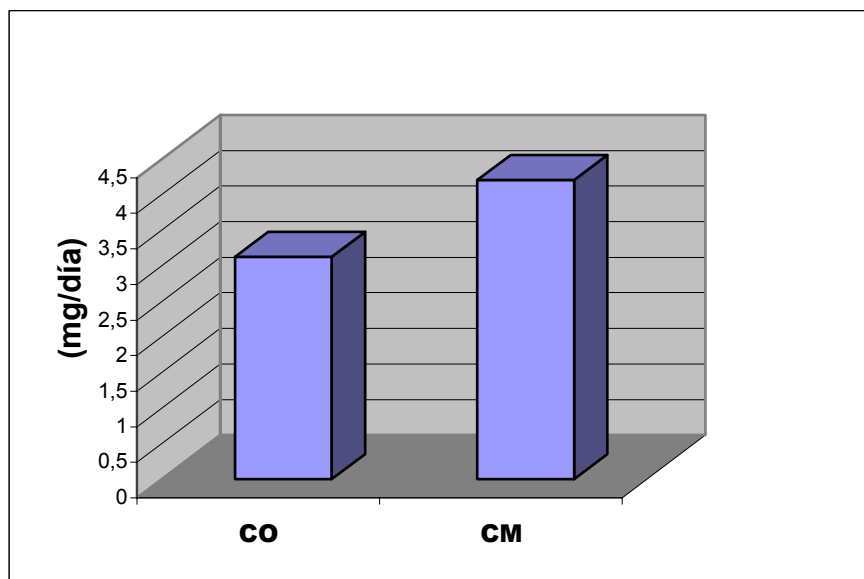
El GSH es un importante antioxidante porque ayuda a la destrucción del peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos, debido al hecho que es sustrato a la glutatión peroxidasa y promueve la formación de formas reducidas de otros antioxidantes, tal como el ascorbato y el α -tocoferol, (Meister, 1994).

Sin embargo, sería esperable que en este modelo experimental se reflejara una mayor necesidad de actuación del sistema defensivo antioxidante, ya que en la dieta control maíz hay un mayor aporte de lípidos insaturados que los alimentados con aceite de oliva y teóricamente estamos creando un estrés oxidativo. Es posible, que en esta situación, el sistema químico o antioxidante no enzimático como el GSH y la vitamina E que diariamente toman los

animales en la dieta sean los que protegen al animal, ya que se observa disminuida la concentración de este GSH (control maíz) y la cantidad de vitamina E que ingieren diariamente, es ligeramente superior a la ingerida por el grupo *Control Oliva*. (Figura 30).

En suma, se justificaría los niveles disminuidos de GSH en el control maíz, porque el glutatión funciona como parte del sistema de protección de membranas celulares, al mantener el α -tocoferol y el ácido ascórbico en estado reducido.

FIGURA 30: INGESTA DE VITAMINA E



4. Evolución de las actividades antioxidantes en células sanguíneas

La actividad de la SOD en células sanguíneas no presenta diferencias al compararse con los distintos grupos control estudiados (CO) y (CM). La excepción la presenta la Catalasa y la GPx en ratas control de aceite de maíz frente al grupo control oliva (*apartado resultados* Tabla: 17), donde su actividad está aumentada en este tejido. Sin embargo, a nivel de hígado total y grasa blanca nos encontramos con niveles de estas enzimas antioxidantes disminuidos en los grupos (CM), lo que indica una respuesta ante una mayor generación de especies oxigénicas en estos tejidos, (ver resultados en Tabla 13 y Tabla 15).

Los niveles de GSH en sangre se presentan con una disminución significativa de este tripéptido en ratas control maíz (Figura 20). Una situación similar, en cuanto al comportamiento del GSH se observa a nivel de hígado total (Figura 09).

PARÁMETROS DE MDA EN PLASMA DE RATA

Los resultados obtenidos en nuestro estudio con dietas líquidas control parecen indicar, que el incremento de ácido poliinsaturado en la dieta control a base de aceite de maíz (Mattson *et al.* 1985) no se traduce en resultados teóricamente indicativos de un daño o agresión por especies oxigénicas al compararse con el aceite de oliva (monoinsaturado), puesto que no se observa ningún incremento significativo en el MDA a nivel de plasma (ver resultados Tabla 18).

Es posible, que en esta situación, *el sistema químico o antioxidante no enzimático* como el GSH y vitamina E que diariamente toman los animales con la dieta sean los que protejan a los animales (Kim H *et al.*, 2003).

Según una revisión realizada por Ortiz de Murúa *et al.* 1997; Krauss RM *et al.* 2000), sugiere que una dieta con vitaminas antioxidantes, conduce a menores riesgos de productos oxidables y previene enfermedades cardiovasculares (Bautista MC *et al.* 2005; Frank Jan, 2005; Estruch R. *et al.* 2006).

El antioxidante exógeno más relacionado con la prevención de las enfermedades cardiovasculares es el α -tocoferol, forma activa de la vitamina E, que se ubica en la fase lipídica celular, en donde interrumpe la reacción de peroxidación en cadena y protege de la oxidación a las LDL y a las membranas plasmáticas (McCall MR *et al.* 1999; Stocker R. 1999 y Herrera E y Babas C., 2001 y Colomer R *et al.* 2006).

ESTUDIO METABÓLICO EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATAS

Para dar continuidad a este estudio hemos caracterizado las interacciones metabólicas en los hepatocitos aislados de ratas a lo largo del tiempo mediante, la liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH), índice de daño celular y niveles de Glutación Reducido (GSH), y el estudio del estado redox a nivel citosólico y mitocondrial.

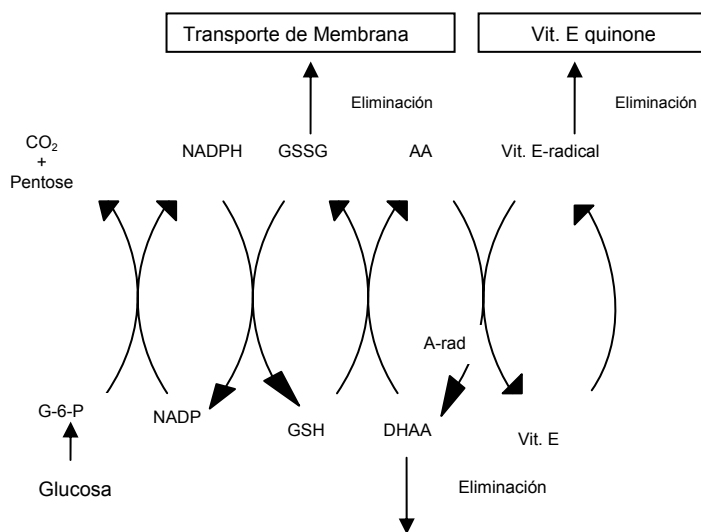
En lo que se refiere a la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), Tabla 19, debemos señalar que además de estar relacionado con los niveles del MDA, Tabla 21, también presenta una clara dependencia con el estado nutricional y la presencia de antioxidantes. Así, hemos podido observar que en términos de liberación de LDH (Ozaki, *et al.* 1995) y producción de MDA, estos mediadores son mayores en los hepatocitos de ratas control maíz a los 60 minutos de incubación.

DISCUSIÓN

Sin embargo, los niveles de GSH (Nakagawa *et al.* 1992); (Viña *et al.* 1992), en los hepatocitos aislados de los grupos control maíz no cambian (Figura 23). Aquí, se podría decir que el efecto antioxidante de la vitamina E, que contiene la dieta beneficia la mayor presencia de **GSH**, jugando un papel importante en mantener la célula en su estado reducido ahorrando glutatión, (Mårtensson, 1991 y May *et al.* 1996).

El la Figura 31 se indica la cascada celular antioxidante, con énfasis en las reacciones cíclicas redox (Winkler *et al.* 1994).

FIGURA 31: CICLO REDOX DE INTERRELACIÓN ENTRE GSH, EL ÁCIDO ÁSCORBICO Y LA VITAMINA E EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE CELULAR.



El ácido ascórbico y el GSH son consideradas las sustancias más reductoras y activas en tejidos vivos, son hidrosolubles y llevan a cabo sus

principales funciones en el *citoplasma* y *mitocondria*, mientras que la **Vitamina E** es un antioxidante liposoluble. Estas actividades resalta la importancia del GSH, ácido ascórbico y la Vitamina E en las reacciones de serie acopladas del sistema antioxidante (Winkler *et al.* 1994).

Al recoger los resultados del Estado Redox Citosolico (NAD^+/NADH) en los hepatocitos de los diferentes grupos de tratamiento, observamos un descenso en el *estado redox citosóloco* en el grupo de animales con control oliva. Este cambio se debe al aumento del lactato y no del piruvato (Tabla 22.A) en los hepatocitos a lo largo de la incubación, lo que indica la reducción del estado citosólico, lo que sugiere que estamos forzando la gluconeogenesis. Sin embargo, en el grupo control maíz el efecto es en sentido contrario, observándose un aumento significativo del cociente NAD^+/NADH , hacía una situación de oxidación celular a nivel del citosol (Tabla 22.C).

Respecto al estado Redox Mitocondrial (NAD^+/NADH), los resultados demuestran que independientemente del tipo de aceite estudiado, la situación hepatocelular está forzada hacía el estado oxidado, a los 60 minutos de incubación, con niveles de acetoacetato aumentados (*ver resultados*, Tabla 23. A).

PRODUCCIÓN DE 8-OXO-dG EN RATAS

En nuestros resultados también hemos considerado los posibles daños oxidativos que se podrían presentar a nivel de DNA de hígado de rata a través de la inducción de la 8-oxo-dG. Estudios recientes confirman que en los animales alimentados con ácidos grasos poliinsaturados se induce el daño del DNA (Park y Floyd, 1992; Kok *et al.* 1994) y este efecto depende de la cantidad de este aceite en la dieta.

Por lo tanto, en dietas control con aceite de maíz, la peroxidación intracelular de ácidos grasos poliinsaturados pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS), pero probablemente no aporten un riesgo genotóxico, debido a la defensa celular y a la conformación del DNA.

La ausencia de diferencia significativa en el daño al DNA entre los grupos controles a base de aceite de oliva y maíz, (*ver resultados*, Tabla 14), claramente confirman las observaciones previas donde tampoco observaron daño al DNA (Kok *et al.* 1994). Posiblemente, la presencia de antioxidantes en el aceite de maíz como el α -tocoferol y polifenoles puede ser particularmente el responsable de estos resultados (Carr y Frei, 1999; Quiles *et al.* 1999).

Sin embargo, estudios recientes realizados con dietas hiperlipídicas a base de aceite de maíz, puede dar lugar a especies reactivas deplecionando los sistemas de defensa celular y los sistemas reparadores del DNA, tal y como muestran los bajos niveles de la SOD, CAT, GPx y GSH, (Drehmer E *et al.* 2001).

Por eso, el efecto del estrés oxidativo y la susceptibilidad al daño del DNA inducido por especies reactivas del oxígeno, pueden aumentar sustancialmente la inducción a la oxidación de la deoxiguanosina.

Otros estudios realizados con diferentes tipos de aceites poliinsaturados como el aceite de pescado (rico en α -linolénico) y el aceite de maíz (rico en ácido linoleico), han demostrado que estos pueden proteger al intestino de la oxidación de la 8-oxo-dG, y por lo tanto de la aparición de tumores intestinales. Sin embargo, el aceite de maíz induce al daño oxidativo del DNA en células del colon con la formación de la 8-oxo-dG, confirmando otra de las aproximaciones experimentales en este aspecto (Bancroft LK *et al.* 2003).

Estudios realizados por Quiles y sus colaboradores en 2004, a fin de investigar el posible efecto de rotura de doble cadena en el DNA y la capacidad antioxidante y de lípidos en sangre de ratas en edad avanzada alimentadas con aceite de oliva virgen (rico en ácido oleico) y aceite de girasol (rico en ácido linoleico), demostraron que en los animales alimentados con aceite de girasol (poliinsaturado) los parámetros de daño genotóxico y alteraciones del sistema antioxidante estaban alterados al comparar con aceite de oliva, donde las alteraciones eran menos significativas a lo largo del tiempo.

Estudios más recientes llevados a cabo por Quiles y sus colaboradores en 2006, realizados con DNA mitocondrial de hígado de ratas maduras, alimentadas con aceite de oliva virgen y aceite de girasol, confirman que el grado de insaturación en las grasas dietéticas son las responsables de la alteración del sistema de defensa antioxidante y la formación de especies reactivas del oxígeno.

En resumen, el presente estudio sugiere que el aceite de maíz es un inductor del daño oxidativo al DNA y es dependiente de la dosis ingerida de ácidos grasos insaturados. Por otra parte se sabe que dietas con aceite de oliva producen menos alteraciones a nivel del metabolismo y daños genotóxicos a lo largo del tiempo. Sin embargo, es necesario realizar más estudios experimentales a fin de determinar la dosis adecuada de antioxidantes presentes en los aceites y las proporciones de los ácidos grasos en el conjunto

DISCUSIÓN

lipídico de la dieta (Mataix J. 2002) para conocer su implicación en el desarrollo de enfermedades degenerativas.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten proponer las siguientes conclusiones:

- 1) En **hígado** y **grasa blanca** de ratas control alimentadas con *aceite de maíz*, la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX) disminuye al comparar con los grupos de ratas control alimentadas con *aceite de oliva*.
- 2) En **grasa parda** de las ratas control alimentadas con *aceite de maíz*, la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y GPX) presenta una tendencia a aumentar. Mientras que la actividad de la catalasa (CAT) está disminuida en este compartimiento.
- 3) En las **células sanguíneas** de las ratas alimentadas con *aceite de maíz* los niveles de las actividades enzimáticas (SOD, CAT, GPX) están aumentadas.
- 4) Tanto en **hígado total** como en **células sanguíneas**, los niveles de GSH, disminuyen significativamente en ratas *control maíz*.
- 5) No se observa un incremento significativo de los niveles de MDA en plasma de ratas control de aceite de oliva y maíz.
- 6) En **hepatocitos aislados** de rata control alimentado con *aceite de maíz* se produce un aumento de la liberación de LDH y MDA.

CONCLUSIONES

- 7) En **hepatocitos** de rata *control oliva*, observamos un descenso del estado redox citosolico (NAD^+/NADH), debido a un aumento del lactato, lo que indica la reducción del estado citosolico. En los grupos *control maíz* en las mismas condiciones experimentales el efecto es en sentido de aumentar el cociente citosolico, hacia una situación de oxidación celular a nivel del citosol.
- 8) En **mitocondria** la relación (NAD^+/NADH) deriva hacia el estado oxidado en ambos grupos control estudiados.
- 9) A nivel de **DNA** de hígado de ratas control alimentadas con aceite de oliva respecto a las ratas control de aceite de maíz, no se observaron diferencias significativas en la inducción de la 8-oxo-dG.

7. NOMENCLATURA

7. NOMENCLATURA

8-oxo-dG:	8-oxo-2'deoxiguanosine
ADP:	adenosin difosfato
ALO:	aldehido oxidasa
AGE:	ácidos grasos esenciales
ATP:	adenosin trifosfato
BSO:	butionina sulfoximia
CDNB:	clorodinitrobenceno
CAT:	catalasa (EC. 1.11.1.6)
CINa:	cloruro sodico
CIK:	cloruro potásico
Cl₂Ca⁺⁺:	cloruro cálcico
CSF:	flujo sanguineo cerebral
CO₃HNa:	carbonato monosódico
CoQ:	ubiquinol
DHA:	ácido graso docosahexaenoico
DHAA:	radical deshidroascorbato
DMSO:	dimetil sulfóxido
DNA:	ácido desoxirribonucleico
ECV:	enfermedades cardiovasculares
EDTA:	ácido etilen diamino tetraacético
EGTA:	ácido etilenglicol-bis(β-amino-etil-éter) N-N'- tetra acético
EPA:	ácido graso eicosapentaenoico
GPX:	glutation peroxidasa (EC.1.11.1.9)
GR:	glutación reductasa
GSH:	glutamil-cisteinil-glicina (glutación)
GSSG:	glutation oxidado
GST:	glutación-s-transferasa
GSH-Px:	glutation oxidorreductasa
G6P-DH:	glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (EC.1.1.1.49)

NOMENCLATURA

G6P:	glucosa 6 fosfato
GLo:	gulono-gamma-lactone oxidase
H⁻:	ión hioduro
HL⁻:	radical ac. linoleico
HLO⁻:	radical alcoxi del ac. linoleico
HLOO⁻:	radical peroxi del ac. linoleico
HOO⁻:	radical hidroperóxido
3-HBDH:	3-β-hidroxi-butirato deshidrogenasa
Hb:	hemoglobina
HK:	hexoquinasa
HDL:	lipoproteínas de alta densidad
H₂O₂:	peróxido de hidrogeno
HPLC:	cromatógrafo líquido de alta eficacia
Kcal:	kilocaloria
K-H:	krebs Henseleit
K-H-Ca⁺⁺:	krebs Henseleit suplementado con calcio
LDH:	lactato deshidrogenasa (EC.11.1.27)
LDL:	lipoproteinas de baja densidad
LH:	ácido graso insaturado
L⁻:	radical alil
LO⁻:	radical alcoxil
LOO⁻:	radical peroxil
LOOH:	hidroperóxido
LTB₄:	leucotrieno B ₄
MDA:	malondialdehído
NAD⁺:	β-nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)
NADH:	β-nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
NADP⁺:	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH:	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NaOH:	hidróxido sódico
O₂:	oxígeno

O₂^{·-}:	radical superóxido
OH[·]:	radical hidroxilo
OH₂[·]:	radical hidroperoxi
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PCA:	ácido perclórico
PI:	yoduro de propidio
PMM:	potencial de membrana mitocondrial
PPM:	partes por millón
PGE₃:	prostaglandina E ₃
PGI₃:	prostaciclina I ₃
PO₄H₂⁻:	fosfato monopotásico
PUFA:	ácidos grasos poliinsaturados
RPM:	revoluciones por minuto
ROS:	especies oxigénicas reactivas
R[·]:	radical libre
RO[·]:	radical alcoxilo
ROO[·]:	radical peróxilo
ROOH:	hidroperóxido lipídico
ROOR:	peróxido
ROS:	especies reactivas del oxígeno
RPE:	resonancia paramagnética de electrones
RPM:	revoluciones por minuto
-SH:	grupo sulfidrilo
SOD:	superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1)
SO₄Mg:	sulfato de magnesio
SO₄Cu:	sulfato de cobre
TBA:	ácido 2-tiobarbitúrico
TBARs:	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEE:	efecto térmico de los alimentos
TCA:	ácido tricloroacético
TBOOH:	tert-butyl-hidroperóxido
TG:	triglicéridos

NOMENCLATURA

TXA₃:	tromboxano A ₃
Tris:	tris(hidroximetil) aminometano
UQ:	radical semiquinónico
VLDL:	lipoproteinas de muy baja densidad
XO:	xantina oxidasa (1.2.3.2)

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

-American Institute of Nutrition (1977). Report of the American Institute of Nutrition. Ad. Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.* 107, 1340-1348.

-Ames BN (1989). Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environmental and molecular mutagenesis*. Vol.14, 66-67.

-Aust SD., Morehouse, LA, and Thomas CE. (1985): "Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. Med.* 1, 3.

-Aust SD. (1986). Lipid Peroxidation. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press. 203-207.

-Ballon P, Palmer G and Massey V. (1969). Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte cytochrome b₅. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36: 898-904.

-Bancroft LK, Lupton JR, Davidson LA, Tadeo SS, Murphy ME, Carroll RJ, Chapkin RS. (2003). Dietary fish oil reduces oxidative DNA damage in rat cononocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 35(2):149-159.

-Bannister W H, Bannister J V, Barra D, Bonde J. and Bossa F. (1991): Evolutionary aspects of superoxide dismutase: The copper/zinc enzyme. *Free Rad. Res. Commun.* 12-13 (1):349-362.

-Bannister JV, Bannister W H, and Rotillio G. (1987). Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Review in Biochemistry*. Vol.22. Issue 2, 111-179.

-Bannister W H, Bannister J V, Barra D, Bonde J., Bossa F. (1991). The copper/zinc enzyme. *Free Rad. Res. Commun.* Vol. 12-13 Part I, 349-362.

-Bannister J V, Bannister W H, Hill H, Thornally PJ. (1982). Enhanced production of hydroxyl radicals by the xanthine-xanthine oxidase reaction in the presence of lactoferrin. *Biochem Biophys Acta* . 715:116-120.

-Bannister J V, Anastasi A. and Bannister W. (1978). Active subunits from superoxide dismutase *Biochem Biophys Res. Commun.* 469-472.

BIBLIOGRAFÍA

- Barquinero J, Ed. (1992). Radicales libres: los enemigos más diminutos. GSH system. Glutación: Eje de la defensa antioxidante. *Excerpta Médica*. Ámsterdam.
- Barrionuevo M, Fornos JA. (1993). Vitaminas. En: Nutrición y dietética: Aspectos sanitarios. (Coordinador, J. Mataix. Editado por el consejo general de colegios oficiales de farmaceuticos). Madrid. Pp.113-175.
- Basu TK, Dickerson JWT. (1996). Vitamins in human health and disease. *CABI Publs. London*.
- Battino M, Ferreiro MS. (2004). Ageing and the Mediterranean diet: a review of the role of dietary fats. *Public Health Nutrition*. 7(7):953-8.
- Bautista MC. Engler MM. (2005). The Mediterranean diet: is it cardioprotective? *Progress in Cardiovascular Nursing*.20(2):70-6.
- Beaton GH.(1999). Recommended dietary intakes : Individuals and populations. En: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Modern nutrition in health and disease*. 9th ed Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 1705-1725.
- Beck B., Stricker, K.A., Burlet, A., Max, J.P., Musse, N., Nicolas, J.P., Burlet, C. (1994): "Macronutrient type independently of energy intake modulates hypothalamic neuropeptide in Long-Evans rats". *Brain Res. Bull*. 34(2):85-91.
- Belido C., Pérez-Martínez P., Marín C., Gómez P., Moreno R., Moreno JA., Delgado-Lista J., López-Miranda J y Pérez-Jiménez F. (2004). Efecto protector de la alimentación mediterránea sobre la citotoxicidad inducida por la grasa saturada en células endoteliales humanas. *Clin Invest Arterioscl*. 17(2):70-3
- Belitz HD, Grosch W. (1999). Edible Fats and oils. En: Food Chemistry. 2nd ed. New York. 14:602-630.
- Bergmeyer U, Bernt E, Schmidt F, Stork H. (1974). D-Glucose determination with hexokinase and glucose-6-phosphatase dehydrogenase. Methods of enzymatic analysys. *Bergmeyer ed*. 1196 - 1201.

-
- Bergmeyer U, Bernt E. (1974). Lactate dehydrogenase, assay pyruvate and NADH. *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer ed. pp: 574-579.
- Bernt E and Bergmeyer HU. (1986). Glutathione. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press. 1642-1647.
- Bertsche V. (1984). Induction and repair of x-ray damage in mammalian cell cultures treated with membrane-active drugs. *Br. J. Cancer*. 49:121-130.
- Berry M N, Friend D S. (1969). High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biology*. 43:506-20.
- Bjorneboe A, Bjorneboe GE, Drevon CA. (1990). Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr*. 120:233-242.
- Blake DR, RE Lunec. (1987). Free radical in biological system-a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull*. 45:371-385.
- Borg DC, Schaich KM. (1984). Cytotoxicity from coupled redox cycling of antioxidant xenobiotics and metals. *Jsr. J. Chem*. 24:38-53.
- Borok Z, Buhk R and Grimes G J . (1991). Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 338:215-216.
- Boveris A, Oshino N and Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 128:617-630.
- Boveris A, Chance B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*. 134:707-716.
- Bray R C, Cockle S A, Fielden E M, Roberts P B, Rotilio G. and Calbrese L. (1974). Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J*. 139, 43.
- Brigelius R, Muckel C, Akerboom M, Stes H. (1983). Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem.Pharm*. 32:2529-2534.

BIBLIOGRAFÍA

- Buxton G V, Greenstock C L, Helman W P, and Ross A B. (1988). Critical review of rate constants for reaction of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals. *Phys. Chem. Ref.* 17:513-886.
- Burton W W; Wronska; Stone L; Foster D O; Ingold K U. (1990). Biokinetics of dietary RRR-alpha-tocopherol in the male guinea pig at the dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo. *Lipids.* 25(4):199-210.
- Brzosko S, De Curtis A, Murzilli S, De Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L. (2002). Effect of extra virgin olive oil on experimental thrombosis and primary hemostasis in rats. *Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases.* 12(6):337-42.
- Burton G, Traber MG. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Ann Rev Nutr.* 10:357-82.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan C I, Stoppani H O. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-Ubiquinone reductase from buey-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180:248-257.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan C I, Stoppani H O. (1988). Production of superoxide radical and hydrogen peroxide by NADH-Ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180:248-257.
- Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58:79-110.
- Carr A and Frei B. (1999). Does vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions. *FASEB J.* 13:1007-1022.
- Cervera P, Clapes J, Rigolfas R. (1993). Alimentación y Dietoterapia. En: Lípidos o Grasas. 2ª edición. *Interamericana McGraw-Hill.* Madrid. Pp: 24-29.
- Chance B, Sies H, and Boveris D. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews.* 59(3):527-605.

-
- Claiborne A J. (1986). Catalase activity" En: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Edited by R.A. Greenwald. Boca Raton Florida. USA. pp. 283-284.
- Cochrane C. (1991). Cellular injury by oxidants, *AM J Med*.
- Cohen G, and Heikilla R. (1974). The generation of hydrogen peroxide radical by 6-hydroxyl dopamine acid and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.* 249:2447-2452.
- Cohen G. (1986). The fenton reaction. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press. 55-63:213-215.
- Colomer R, Menendez JA. (2006). Mediterranean diet, olive oil and cancer. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies & of the National Cancer Institute of Mexico*. 8(1):15-21.
- Connor WE. (1999). α - Linolenic acid in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 69:827-8.
- Corbett SW, Stern JS, Keeseey RE. (1986). Energy expenditure in rats with diet induced obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 44(2):173-80.
- Colomer R. Menendez JA. (2006). Mediterranean diet, olive oil and cancer. *Clinical & Translation Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societes & of the National Cancer Institute of Mexico*. 8(1):15-21.
- Crapo J, McCord J. and Fridowich (1978). Preparation and assay of superoxide dismutases. *Meth. Enzymol.* 53:382.
- Crapo J, McCord J. and Fridowich (1978). Preparation and assay of superoxide dismutase. *Meth. Enzymol.* 53, 382.
- Cross CE., Halliwell B., Borish ET., Pryor WA., Ames BN., Saul PL., Mc Cord JM., and Harman D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann. Int. Med.* 107:526-545.
- Curber M. (1997). Olive oil, monounsaturated fatty acids and cancer. *Cancer Letters*.114:91-92.

BIBLIOGRAFÍA

- Czok R. and Lamprecht W. (1974). Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glucerate-2-phosphate. *En: Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer ed.)*. 3pp: 1446-1451.
- Datta AK, Misra M, North SL, and Kasprzak KS. (1991). Enhancement by nickel (II) and L-histidine of 2'-deoxyguanosine oxidation with hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*.
- Denis MC Garry J D. (1999). Metabolismo lipídico I: Utilización y almacenamiento de energía en forma de lípidos. En: Devlin TM, ed. *Bioquímica Barcelona. Reverté*. 362-393.
- De Duve Ch. (1969). The peroxysome: a new cytoplasmic organelle. *Proc. R. Soc. London Ser. B*. 173, 710.
- Di Monte D, Bellomo G, Thor H., Nicotera P, Orrenius S. (1984). Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca_2^+ homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* 235(2): 343-50.
- Drehmer E, Muñoz P, Valls V, Saez G and Cabo J. (1997). Oxygenated metabolism in isolated rat hepatocytes in obesity. Influence of vitamin C. *Nutr Hosp.* 12:250-256.
- Drehmer E, Valls V, Muñoz P, Cabo Soler J, Saez Tormo G. (2001). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and antioxidant status in rat liver fed with olive oil and corn oil diets: effect of ascorbic acid supplementation.
- Dulloo, A.G., Girardier, L. (1992). Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism*. 41(12):1336-42.
- D'Aquino M, Benedetti PC, Di-Felice M, Gentili V, Tomassi G; Maiorino M and Ursini F. (1991). Effect of fish oil and coconut oil on antioxidant defence system and lipid peroxidation in rat liver. *Free Radic Res Commun*. 12-13:147-152.
- Durá Travé T. (2001). Ingesta de energía y nutrientes en los alumnos de educación obligatoria. *An Esp Pediatr*. Vol. 54(6): 547-554.
- Estruch Ramon y col. (2006). Effects of a Mediterranean-Style diet on cardiovascular risk factors. *Annals of Internal Medicine*. Vol 145(1): 1-11.

- Estornell E, Barber T. and Cabo J. (1994 a): Improved nitrogen metabolism in rats fed on lipid-rich liquid diets. *British J. Nutr.* 71, 361-373.
- Estornell E, Barber T. and Cabo J. (1994 b): Protein synthesis in vivo in rats fed hyperlipidic liquid diet. *British J. Nutr.* 72, 509-517.
- Evans MD, M Cooke, MS. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res Rev.* 567:1-61.
- Farhataziz L. and Ross, A.B. (1977). Selected specific rates of reaction of transients from water in aqueous solution III. Hydroxyl radical and perhydroxyl radical and their radical ions. NSRDS-NBS. 59, 1.
- Faust IM, Jhonson P R, Stern J S, and Hirsch J. (1978): Diet-induced adipocyte number increase in adults rats: A new model of obesity. *Am. J. Physiol.* 235:E276-E286.
- Floid R. (1995). Measurement of oxidative stress in vivo. *Cleup, Cleup University Press.*
- Floyd AR, (1990).The role of 8-hydroxydeoxiguanine in carcinogenesis . *Carcinogenesis.* Vol. 11, Nº 9. 1447-1450.
- Fielden, E.M., Roberts, P.B., Bray, R.C., Lowe, D.J., Mautner, G.N., Rotilio, G., and Calabrese, L. (1974). The mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. *Biochem. J.* 139, 499.
- Finley, J. M., Wheeler, E.L., and Witt, S.C. (1981). Oxidation of glutathione by hydrogen peroxide and other oxidizing agents. *J. Agric. Food. Chem.* 29, 404-407.
- Fito M, Covas MJ, Lamuela-Raventós RM, Vila J, Torre C, Marrugat J. (2000). Aceite de oliva e inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Importancia de los compuestos fenólicos. *Medicina Clínica.* 115 (5):166-169.
- Flohé JM, Wheeler EL and Witt SC. (1981). Glutathione peroxidase a seleno enzyme. *FEBS lett.* 32, 132.

BIBLIOGRAFÍA

- Food and Nutrition Board. NCR (National Research Council). (1989). Recommended Dietary Allowences. 10th ed. Washington DC: *National Academy Press*.
- Food and Nutrition Board.IOM (Institute of Medicine). (2000). Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington DC: *National Academy Press*.
- Forman HJ, and Boveris A. (1982). Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In: *Pryor WA, ed. Free radicals in biology*. Vol. 5. New York. Academic Press, 65-90.
- Fran Jan. (2005). Beyond vitamin E supplementation. An alternative strategy to improve vitamin E. *Journal of Plant Physiology*. 162(7):834-43.
- Freeman ML, Malcom A, and Meredith MJ (1985). Decreased intracellular glutathione concentration and increases hyperthermic cytotoxicity in an acid environment. *Cancer Res*. 45, 504-508.
- Frank Jan. (2005). Beyond vitamin E supplementation: an alternative strategy to improve vitamin E. *Journal of Plant Physiology*.162(7):834-43.
- Frenkel K, Zhong Z, Wei H, Karkoszko J, Patel V, Rashid K, Geogerscu M and Solomon JJ. (1991). Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in Vitro and in vivo. *Anal Biochem*. 196:126-136.
- Frenkel K, and Tofigh S. (1989). Decomposition of nucleoside hydroperoxide by metal and metalloproteins. *Biol. Trace. Elemt Rs*. 21, 351-257.
- Fridowich I, and Handler P. (1961). Detection of free radicals generated during enzymic oxidation by the initiation of sulfite oxidation. *J. Biol. Chem.*, 236:1836-1840.
- Fridowich I. (1974). Superoxide and evolution. In *Horz. Biochem. Biophys*. 2nd ed. Edited by Chapman and Hall, London. 1971. 1:1-37.
- Fridowich I. (1974). Superoxide and evolution. *J. Biochem. Biophys*.1:1-37. Capman and Hall London.
- Fridowich I. (1974). Superoxide dismutase. *Adv. Enzymo*. 41:35-97.
- Fridowich I. (1975). *Adv. Enzimol*. 41, 35-97.

-
- Fridowich I. (1976). Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. *Free. Radicals. Biol.* 6 (1), 239-277.
- Fridowich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880.
- Fridowich I. (1986). Cytochrome C. En: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Edited by R.A. Greenwald. Boca Raton Florida USA. pp. 213-215.
- Gabig TG, Knipes RS, Babior BM. (1978). Solubilization of the O_2^- forming activity responsible burst in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 253:6663-65.
- García, F Rivas, Martínez, R Giméz. (2004). Importancia biológica de las grasas en la alimentación humana. *Nutrición Clínica*. Nº 5 Vol. XXIV/150.
- Garret RH, Grishan CM. 1999). Biochemistry. 2nd ed. *Fort Worth: Saunders Collige Publishers*.
- Gassman B. (1995). Naturally occurring vitamin E compounds. History and present evaluation. 1. Bioavailability biopotency. *Ernahrungs Umschau.* 42 (11):394.
- Gey KF, Puska P, Jordan P and Moser UK. (1991). Inverse correlation between plasma vitam E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr.* 53:S326-S334.
- Gerber M. (1997). Olive oil, monounsaturated fatty acids and cancer. *Cancer Letters.* 114:92-92.
- Ghosh M, Chattopadhyay and Chatterjeei B. (1996). Vitamin C prevents oxidative damage. *Free Rad Res.* 25:173-179.
- Gil A, Ramirez –Tortosa MC, Aguilera C, Mataix J. (2001). Aceite de oliva y sistema cardiovasculares I: Aterosclerosis. En: Mataix J, ed. *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. Granada. Universidad de Granda. 79-107.
- Glew RH. (1999). Metabolismo lipídico II: rutas metabólicas de lípidos especiales. En: Devlin TM. *Ed. Bioquímica Barcelona Reverté*. Pp. 396-443.

BIBLIOGRAFÍA

- Gorinstein S, Leontowicz H, Lojek A, Leontowicz M, Ciz M, Krzeminski R, Gralak M, Czerwinski J, Jastrzebski Z, Trakhtenberg S, Grigelmo-Miguel N, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso Olga. (2002). Olive oil improves lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 50(21):6102-8.
- Grundy SM. (1996). Dietary fat. En: Ziegles EE, Filer LJ, eds. Present Knowledge in Nutrition. 7th ed. Washington: ILSI Press. 44-57.
- Gurr MI. (2000). Fats. En: Garrow JS, James WPT, Ralph A, eds. Human Nutrition and Dietetics. 10th ed. London: Churchill Livingstone. 97-120.
- Godin D, N. and Wohaieb SA. (1988). Nutritional deficiency, starvation and tissue antioxidants status. *Free. Rad. Biol. Med.* 5: 165-176.
- Gotto AM. (2003). Antioxidants, statins, and atherosclerosis. *J Am Col Cardiol.* 41:1205-10.
- Graham J. (1978). Isolation of subcellular organules and membranes. In: *Centrifugación a practical approach* 2nd Edition. Edited by Drickwood Department of Biology; University of Essex, Colchester, Essex, England ISBN 0-904147-55x. IRL press. Oxford, Washington PC. Cap. 5.
- Greenwald RA, Bannister WH, Bannister JV. (1984). Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase. *Elsevier, Amsterdam*. 1980, 160.
- Greenwald, RA. (1991). Oxygen radicals, inflammation and arthritis. Pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin. Arthritis Rheum.* 20:219-240.
- Gupta RC. (1984). Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 81:6943-6947.
- Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C. (1986). Research in isolated and cultured hepatocytes. *John Libbey Eurotext Ltd. INSERM*. pp 1-12.
- Halliwell B and Gutteridge JM. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.

- Halliwell B. and Gutteridge JM. (1986). Oxygen free radicals in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Halliwell B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1, 358-364.
- Halliwell B. and Gutteridge JM. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in Human disease an overview. *Methods in Enzymol.* 186:1-85.
- Halliwell B. and Aruoma O. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS.* 281 (1-2):9-19.
- Halliwell B, Ed. (1991). Reactive oxygen species in living system: Source, biochemistry and role in human disease. Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants; Pathophysiologic determinants and therapeutic agents.
- Halliwell B. (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?. *Free. Radic. Res.* 25(5):439-54.
- Halliwell B. (1996). Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in human. *Free. Radic. Res.* 25(1):57-74.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.(1999). Free radicals in biology and medicine. 2^a ed. *Oxford University Press*, Oxford-New York.
- Halliwell B and Chirico S. (1993). Lipid peroxidation its mechanisms measurement and significance. *Am J Clin Nutr.* 57:7155-7255.
- Halliwell B. (2000). The antioxidant paradox. *Lancet.* 355:1179-1180.
- Harris, R.B., Martin, R.J., Bruch, R.C. (1995): "Dissociation between food intake, diet composition, and metabolism in parabiotic partners of obese rats". *Am. J. Physiol.* 268 (4Pt2): R874-83.
- Herrera E and Barbas C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem.* 57(1):43-56.
- Hinder RA, Stein HJ. (1991). Oxygen-derived free radicals. *Arch. Surg.* 126, 104-105.

BIBLIOGRAFÍA

- Hu FB. (2003). The Mediterranean diet and mortality –olive oil and beyond. *New Engl. & Med.* 348:2595-96.
- Huschi LH., Lenart EB., Willet WC. (1993). Health implications of Mediterranean diets in light contemporary knowledge meat, wine, fats and oils. *Am J Clin Nutr.* 61 (Suppl):1416-1427.
- Innis SM,(1996). Essential dietary lipids. En: Ziegler EE, Filer LJ. Eds. Present Knowledge in Nutrition. 7th ed. Washington: ILSI Press. 58-66.
- Inoue S, Kawanishi S, Yamamoto K. (1989). Site-specific DNA damage induced by sulfite in the presence of cobal (II) ion. Role of sulfate radical. *Biochem. Pharmacol.* 38(20), 3491-6.
- Jackson AL, LA. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research.* 47 7:7-21.
- Javouhey-Donzel A, Guenot L, Maupoli V, Rochette L and Rocquelin G. (1993). Rat vitamin E status and heart lipid peroxidation: effect of dietary alpha-linolenic acid and marine n-3 fatty acids. *Lips.* 28:651-655.
- Jequier E. (1999). Response to and range of acceptable fat intake in adults. *Eur J Clin Nutr.* 53:84S-93S.
- Kagan V, Serbinova E, Koynova G, Kitanova S, Tyuring V, Stoytchev T, Quinn P and Parquer L. (1990). Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Radic Biol Med.* 9(2):117-26.
- Kagan V, Serbinova E and Pacher L (1990). Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun.* 169 (3):851-7.
- Kanarek RB., and Hirsch E. (1977): Dietary-induced overeating in experimental animals. *Fed Proc* 36: 154-158.
- Kasprzak KS. (1991). The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.* 4:604-615.

- Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran Celentano J, Shwaery GT *et al.*(1994). Low-dose alpha-tocopherol improves and high-dose alfa-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest.* 93:844-851.
- Kellog EW, Fridowich I. (1975). Superoxide, Hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250:8812-17.
- Kim H, Choi S, Lee HJ, Lee JH, Choi H. (2003). Supression of fatty acid sybthase by dietary polyunsaturated fatty acids is mediated by fat itself, not by peroxidative mechanism. *Journal of Biochemistry & Molecular Biology.* 36(3):258-64.
- Kimie S, Atsuya T, Umemura T, Hasegawa R. and Kurokawa Y. (1991). Relation of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after a single administration of potassium bromate. *Jpn.J. Cancer Res.* 82:165-169.
- Kiyose C, Muramatsu R, Kameyana Y, Ueda T; igarashi O. (1997). Biodiscrimination of alfa-tocpferol in humans alter oral adminstration. *Am J Clin Nutr.* 65:785-789.
- Kok TMCM, Vaawerk F, Zwingman J, Van Maanen JMS and Leinjans JCS. (1994). Peroxidation of linoleic arachidonic and oleic acid in relation to the induction f oxidative DNA damage and cytogenic effect. *Carcinogensis.* 15:1399-1404.
- Krebs HA, Cornell NW, Lund P. and Hems R. (1974). *Regulation of hepatic metabolism.* (Lundguist, F. Tygsuup N. Eds). Munksgaard, Copenhagen. pp: 220.
- Krebs HA, Lund P, and Edwards H. (1979). Cell populations. Methodological surveys (B). *Chichester, West Sussex, England Publisher,* 9:1-6.
- Kris-Etherton PM. (1999). Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 100:1253-1258.

BIBLIOGRAFÍA

- Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ *et al.* (2000). AHA Dietary Guidelines. Revision 2000: a statement for health professionals from Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*. 102:2284-2299.
- Krummel D. (1998). Nutrición en enfermedades cardiovasculares. p. 1144.
- Kurokawa Y, Maekawa A, Takahashi M, and Hayashi Y. (1990). Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate a new renal carcinogen. *Environ Health Perspect*. 87: 309-315.
- Lahoz Rallo C, Peña Valverde R, Mostaza Prieto JM. (2000). ¿Se deben recomendar antioxidantes para la prevención cardiovascular? *Rev Clin Esp*. 200:212-217.
- Land EJ, Simic MG and Swallow AJ. (1971). Optical absorption spectra of half-reduced ubiquinone. *Biochem. Biophys. Acta*, 226: 239-240.
- Li CJ.; RM. (2002). Reactive species mechanism of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol*. 282:C227-C241.
- Lieber CS and De Carli LM. (1986). The feeding of ethanol in liquid diets. 1986 update. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 10: 550-553.
- Lieber CS and De Carli LM. (1982). The feeding of alcohol in liquid diets. Two decades of applications and 1982 update. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 6, 523-531.
- Llado, I., Proenza, A.M., Serra, F., Palau, A., Pons, A. (1991): "Dietary induced permanent changes in brown and white adipose tissue composition in rats". *Int. J. Obes*. 15(6):415-99
- Leger CL. (2000). Vitamin E: current state of knowledge, role in the prevention of cardiovascular disease, bioavailability. *Ocl Oleagineux Corps Gras Lipides*. 7(3):258-65.
- Linder M. (1991). Nutritional Biochemistry and Metabolism with clinical application. 2nd. New York. *Elsevier*.
- López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C. (2003). The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 43:233-44.

-
- López J., Gómez P, Castro P, Marín C, Paz E, Bravo MD et al. (2000). La dieta mediterránea mejora la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). *Med Cli (Barc)*. 115:361-365.
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 24:68-72.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Malmstrom BG. (1982). Enzymology of oxygen. *Ann Rev Biochem.* 51:21-59.
- Lunec J. (1990). Free radicals: Their involvement in disease processes". *Ann. Clin. Biochem.* 27:173-182
- Mandenoff A, Leonir T, and Apfelbaum M. (1982). Pardy occurrence of adipocyte hyperplasia in cafeteria-diet rats. *Am. J Physiol.* 242:R349-R351.
- Maral J, Puget K, Nechelson M. (1977). Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. and Biophysic. Res. Comm.* Vol. 77, N° 4, 1525-1535.
- Marklund S. (2002). Extracelular superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* 349:74-80.
- Marnett L. (1987). Peroxyl free radicals: Potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis.* 8: 1365-73.
- Marquina E. (2000). Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno biatómicas. Valencia, Ed. *Fundación Valencia de Estudios avanzados*.
- Mårtensson, J., Meister, A. (1991). Glutathione deficiency decrease tissue ascorbate levels in newborn rats" ascorbate spares glutathione and protects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:4656-4660.
- Martínez CSdMF. (2001). Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante. Madrid.
- Marate G, Harrisson KA, Murphy RC, Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. (2000). Bioactive phospholipids oxidation products. *Free Rad Biol Med.* 12:1762-1770.

BIBLIOGRAFÍA

- Marín C., López-Miranda J., Delgado-Lista J., Gómez P., Moreno J., Fuentes F., Bellido C y Pérez-Jiménez F. (2004). Efecto de la alimentación mediterránea en la respuesta lipémica posprandial. *Clin Invest Arteriscl.* 17(4):159-64.
- Martínez-González MA, Alonso A; Fernández-Jarne E, De Iarla J. (2003). What is protective in the Mediterranean diet? *Atherosclerosis.* 166:405-7.
- Martin-Moreno JM. (2000). The role of olive oil in lowering cancer risk: is this real gold or simple pinchbeck? *Journal of Epidemiology & Community Health.* 54(10):726-7.
- Mataix J. (2002).I. Nutrientes y Ingredientes. En: Mataix J, Medina FS. En: Cap. IV Lipidos.ed. Ergon Madrid.
- Mataix J. (2002).I. Nutrientes.y Ingredientes. En: Mataix J, Ochoa J. En: Cap. VIII. III-*Vitaminas antioxidantes.* ed. Ergon Madrid. Pp 184-190.
- Mataix J. y Martínez de Victoria, E. (1993): Lipidos. En: Nutrición y dietética: Aspectos sanitarios. (Coordinador: J. Mataix., Editado por el consejo general de colegios oficiales de farmaceuticos). Madrid. p. 71-109.
- Mataix J, Quiles JL, Rodríguez-Huertas J. (2001). Aporte de grasa. En: Guías Alimentarias para población Española. Madrid: *Sociedad Española Nutrición Comunitaria (SENC).* 231-237.
- Mataix J. (2001). Aceite de oliva virgen: Nuestro patrimonio alimentario. Granada. Universidad de Granada.
- Mataix J, Quiles JL, Rodríguez-Huertas J. (2001). Aceites y grasas. En: Guías Alimentarias para la Población Española. Madrid: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). 121-132.
- Matheus CK, Van Holde KE. (1998). Bioquímica (version española de la 2ª edición original) .Nueva York: *McGraw-Hill Interamericana.*
- Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Manas M. (1998). Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine.* 24(4):511-21.

-
- Mataix J. y Martínez de Victoria, E. (1993): "Lípidos". En: *Nutrición y dietética: Aspectos sanitarios*. (Coordinador: J. Mataix., Editado por el consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos). Madrid. p. 71-109.
- Mataix J. (1993). Recent finding in olive oil research. *Eur J Clin Nutr.* 47 supl.1: S82-4.
- Mataix J. (2003). Tablas de composición de alimentos. 4th ed. Granada. Spain: Univ of Granada.
- Mattson, F.H., and Grundy, S.M. (1985): Comparison of effects of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid. Res.* 26:194-202.
- May, J.M.; Quo, Zhi-Chao.; Whitesell, R.R.;and Cobb,C.E. (1996). Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radical Biology & Medicine.* 20(4): 543-551.
- Mellanby J. and Williamson DM (1974). Determination of acetoacetate Methods of enzymatic analysis. *Bergmeyer ed.* pp. 1840-1843.
- McCord JM and Fridowich I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte. *J Biol Chem.* 244:604.
- McCord, J.M. (1974). Free radicals and inflammation protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science.* 529-531.
- Meister A. (1983). Selective modification of glutathione. *Science.* 220-272.
- Meister A. (1985). Glutathione synthesis. In: *CRC Handbooks of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, Florida, USA. 309-316.
- Meister A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem .* 263(33):17205-17208.
- Meister, A. (1991): "Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal, applications in research and therapy". *Pharmacology and therapeutics.* 52, 155-194.
- Meister A. (1992). On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem. Pharm.* 44, 1905-1915.
- Meister A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* 296, 9397-9400.

BIBLIOGRAFÍA

- McCall MR, Frei B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med.* 26:1034-53.
- Meister, A. (1994): Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* 296, 9397-9400.
- Mesa MD, Buckley R, Minihane AM, Yagoob P. (2004). Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 175(2):333-43.
- Misra HP and Fridovich I. (1972). The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinines. *J Biol Chem.* 2247, 188-192.
- Misra HP and Fridowich I. (1971). The generation of superoxide radicals during the autoxidation of ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 246: 6686-6890.
- Montserrat Fito, María Isabel Covas, Rosa M. Lamuela-Raventós, Joan Vila, Carmen de la Torre y Jaime Masrugat. (2000). Aceite de oliva e inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Importancia de los compuestos fenólicos. *Med Clin (Barc).* 115:166-169.
- Morel I, Lescoat G, Cillard P, Cillar J. (1994). The role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Meth Enzymol.* 234:437-43.
- Moore, B.J. (1987): "The cafeteria diet-an inappropriate tool for studies of thermogenesis". *J. Nutr.* 117. 227-231.
- Moreno JJ, Carbonell T, Sanchez T, Miret S, Mitjavila MT. (2001). Olive oil decreases both oxidative stress and the productions of arachidonic acid metabolites by the prostaglandin G/H synthase pathway in rat macrophages. *Journal of Nutrition.* 131(8):2145-9.
- Muñiz P., Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR, and Sáez G. (1994). The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free.Radic. Biol. Med.* Vol. 18, nº4. pp:747-755.
- Muñiz P, Valls V, Perez C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR and Saez GT. (1995). *The role of 8-hydroxy-2' desoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. Free Rad Biol Med.* 18: 74-755.

-
- Muñiz P. Garcia, MJ, Iradi, A, Mahiques E, Marco V, Oliva MR, and Saez GT, (2000). Age-related changes of liver antioxidant enzymes and 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine during fetal-neonate transition and early rat development. *IUBMB Life*. 49: 487-500.
- National Research Council. Recommended Dietary Allowances (RDA). 1989. 10th edition. Washington: National Academy of Sciences, 99-105.
- Nakagawa, Yoshio; Ian, A.; Gutgreave and Peter Moldeus (1991). Relationships between ascorbic-acid and alpha tocopherol during diquat-induced redox cycling in isolated hepatocytes. *Bioch. Pharm.* 42(4): 883-888.
- Neuzil J. Thomas SR. Stocker R. (1997). Requirement for promotion on inhibition by α -tocoferol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 22:57-71.
- Nohl H, Jordan W, Youngman RJ. (1986). Quinones in Biology. Functions in electron transfer and oxygen activation. *Adv. in Free Rad. Biol. Med.* 2: 211-279.
- Nosedá G. (2005). Fats and oils (including omega 3, omega 6). *Therapeutische Umschau*. 62(9):625-8.
- Oae S, Kawatata T and Kim YH. (1981). Reaction of organic sulfur compounds with superoxide anion III. Oxidation of organic sulfur compounds to sulfinic and sulfonic acids. *Tetrahedron*. 37:37-41.
- Ochoa JJ, Quiles JL, Ibanez S, Martinez E, Lopez-Frias M, Huertas JR, Mataix J. (2003). Dietary fish oil reduces oxidative DNA damage in rat colonocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 35(2):149-59.
- Ortiz de Murúa JA, del Campo F, Moreno de Vega JC, Avila MC, Villafranca JL. (1997). Papel de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. *Clínica Cardiovascular*. 15(4): 165-169.
- Orrenius S and Moldeus P. (1984). The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 5, 432.

BIBLIOGRAFÍA

- Ozaki, M.; Fuchinoue, S.; Teraoka, S.; Ota, K. (1995). The in vivo cytoprotection of ascorbic acid against ischemia/reoxygenation injury of rat liver. *Arch.Biochem.Biophys.* 318(2):439-45.
- Pacheco YM. Bermudez B. Lopez S. Abia R. Villar J. Muriana FJ. (2006). Ratio of oleic to palmitic acid is a dietary determinant of fibrinolytic factors during the postprandial state in men. *American Journal of Clinical Nutrition.* 84(2):342-9.
- Packer L. (1988). Carotenoid and tocopherol composition of human adipose tissue. *Am J Nutr.* 47:33-36.
- Packer L. (1994). Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci Med March/April.* 54-63.
- Pan DA., Storlien LH. (1993). Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipids fatty acid composition and rate of weight gain rats. *Journal of Nutrition.* 123(3):512-9.
- Papadopoulos G. and Boskou D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 68: 669-671.
- Park J and Floyd RA., (1992). Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Radic Biol Med.* 12:245-250.
- Páramo JA., Orbe MJ, Rodríguez JA. (2001). Papel de los antioxidantes en la prevención de la enfermedad cardiovascular. *Med Clin.* 116:629-635.
- Pérez –Jiménez F, López-Segura F, Mataix J. (2001). Aceite de oliva y sistemas cardiovascular II: Trombosis. En: Mataix J,ed. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Granada. Universidad de Granada. 109-153.
- Porta P, Aebi S, Summer K, Lautenburg BH. (1991). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, a cysteine prodrug-pharmacokinetics and effects on thiols in plasma and lymphocytes in human. *J Pharmacol Exp Ther.* 257:331-334.
- Pryor WA. (1976). Free radicals in Biology. Edited by WA Pryor. Academic Press. New. York. 1, 1-277.

- Pryor AW. (1976). The role of free radical reactions in Biological systems. *Free Rad in Biol Med*. Vol. 1:1-43.
- Pryor AW. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann Rev Physiol*. 48: 657-667.
- Pryor WA. (2000). Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med*. 28:141-64.
- Quiles JL, Ramírez-Tortosa C, Ibañez S, Gonzalez JA, Duthie GC, Huertas JR and Mataix J. (1999). Vitamin E supplementation increases the stability and the in vitro antioxidant capacity of refined olive oil. *Free Rad Res*. 31:129-135.
- Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Huertas JR, Mataix J. (2006). Age-related mitochondrial DNA deletion in rat liver depends on dietary fat unsaturation. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences & Medical Sciences*. 61(2):107-14.
- Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa C, Battino M, Huertas JR, Martin Y, Mataix J. (2004). Dietary fat type (virgin olive vs. Sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology*. 39(8):1189-98.
- Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa C, Battino M, Huertas JR, Martin Y, Mataix J. (2004). Dietary fat type (virgin olive vs. Sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology*. 39(8):1189-98.
- Ramirez, I. (1987): "Feeding and liquid diet increases energy intake, weight gain and body fat in rats". *J. Nutr*. 117:2127-2134.
- Richter C, Park JW and Ames BN. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:6465-6467.
- Rimm EB, Stampfer MJ. ((2000). Antioxidants for vascular disease. *Med Clin North Am*. 84:239-249.

BIBLIOGRAFÍA

- Romero D, Calvo M, Villalba MP, Amiguet JA. and Bueno J. (1987): "Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica. Sistemas defensivos ante los radicales libres. Sistemas antioxidantes enzimáticos. *Ann. Med. Inter.* 4(13):672-679.
- Rotilio G, Bray RC and Fielden .(1972). *Biochim. Acta* 271: 1-5.
- Rowet HER. (1975). Guías de dirección (III). La rata, con notas sobre el ratón. *Eds Ucrania Barcelona.*
- Sabaté J. (1992). La encuesta dietética: su valor en la clínica, epidemiología y política de nutrición. *Med Clin (Barc).* 98:738-740.
- Sáez G, Blay P, Viña JR and Viña J. (1987). Metabolic effects of glutathione depletion. *Biochem Soc Trans.* 15(2):227-228.
- Sáez G, Bannister W and Bannister JV. (1989). Free radicals and thiol compounds. The role of glutathione against free radical toxicity. En: *Handbook of glutathione.* CRC Press. Boca Raton, Florida. USA.
- Sáez G, Valls V, Cabedo H, Iradi A, Bannister W and Bannister JV. (1992). Effect of metal ion catalyzed oxidation of rifamycin SV on cell viability and metabolic performance of isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys Acta.* 15:326-335.
- Sáez G., Valls V, Muñoz P, Perez-Broseta C, Iradi A, Oliva MR, Bannister JV and Bannister W. (1993). The role of glutathione in protection against DNA induced by rifamycin SV and copper (II) ions. *Free. Rad. Res. Commus.* 19(2):81-92.
- Santos M, Valles J y Aznar T. (1980). Valoración espectrofotométrica del MDA plasmático basal. *Rev Diag Biol.* 29(1):57-59.
- Stark AH, Madar Z. (2002). Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition Reviews.* 60(6):170-6.
- Sastre A. (1990): La dieta mediterránea. *Vox.* 10, 45-52.
- Seglen PO. (1972). Preparation of rat liver cells. Effect of calcium on enzymatic dispersion of isolated perfused liver. *Experimental Cell Research.* 74, 450-454.

- Seglen PO. (1974). Autoregulation of glycolysis, respiration, gluconeogenesis and glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver cells under aerobic and anaerobic conditions. *Biochim Biophys Acta*. 338:317-336.
- Seglen PO. (1973a). Preparation of rat liver cells II: *Experimental Cell Research*. 76, 25.
- Seglen PO. (1973b). Preparation of rat liver cells III. *Experimental Cell Research*. 82, 391.
- Serbinova E, Kagan V, Han D and Packer L. (1991). Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic Biol Med*. 10(5):263-75.
- Serra L, Aranceta J. SENC (2001). Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española en Nutrición Comunitaria. En: Guías Alimentarias para la Población Española. Madrid: Sociedad en Nutrición Comunitaria (SENC). 345-351.
- Shigenaga M, Park JW, Cundy K, Gimeno C, Ames B. (1990). *In vivo* oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods in Enzymol*. Vol. 186:521-529.
- Shigenaga MK and Ames BN. (1991). Assays for 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Radical Biol Med*. 10: 211-216.
- Sies H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Engl* 25:1058-1071.
- Sies H. (1985). Biochemistry of oxidative stress. *Academic Press London*. 1058-1071
- Sies H and Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Phil Trans R Soc Lond (Biol.)*, 311: 617-631.
- Simic MG and Jovanovic SV. (1986). Free radical mechanisms of DNA base damage. *Mechanisms of DNA Damage and Repair*. Plenum Press. 39-49.
- Simic MG and Taylor KA. (1987). Free radical mechanisms of oxidation reactions. *Flavor Quality of Fresh Meat*. Academic Press. 69-117.

BIBLIOGRAFÍA

- Slater TF, Cheeseman KH, Benedetto C, Collins M, Emery S, Maddix S, Nodes J, Proudfoot K, Burton G and Ingold K. (1990). Study on the hyperplasia "regeneration" of the rat liver following partial hepatectomy. Changes in lipid peroxidation and general biochemical aspects. *Biochem.J.* 265(1):51-9.
- Smith, James C. (2004). Gustation as a factor in the ingestion of sweet and fat emulsions by the rat. *Physiology & Behavior.* 82(1):181-5.
- Simopoulos A. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr.* 70:5605-9S.
- Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J and Bailey M. (1992). Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology.* 103:1625-1629.
- Sirtori CR *et al.* Etherton TD. (1992). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr.* 56:113-22.
- Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menendez JA, Colomer R, Escrich E. (2002). Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *International Journal of Oncology.* 21(4):745-53.
- Stark AH, Madar Z. (2002). Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition Reviews.* 60(6):170-6.
- Steinberg JC, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JC. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 3:915-924.
- Stone TW, Burton NR. (1988). MDA receptors and ligands in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol.* 30(4): 333-68.
- Sokol RJ, (1988). Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Annu Rev Nutr.* 8:351-373.
- Sun Y. (1990). Free radicals antioxidants enzymes and carcinogenesis. *Free Rad Bio Med.* 8(6):583-599.
- Stocker R. (1999). The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem Sci.* 24:219-23.

-
- Tauler P, Aguiló A, Gimeno I, Noguera A, Agusti A, Tur JA, Pons A. (2003). Differential response of lymphocytes and neutrophils to high intensity physical activity and to vitamin C diet supplementation. *Free Rad Res.* 37(9):931-8.
- Teebor G W, Boorstein, RJ and Cadet J. (1988). The repairability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 54:131-150.
- Terao J, Matsushita S. (1988). The mechanism of quinona formation from carcinogenic benzo (a) pyrene mediated by lipid peroxidation in liposomal suspension. *Basic. Life.Sci.* 49:769-72.
- The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. (2000). Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med.* 342:154-160.
- Thor H, Smith MT, Hartxell P, Bellomo G, Jewell SA and Orrenius S (1982). The metabolism of menadione (2-metil-1,4 naphtoquinone) by isolated hepatocytes. *J Biol Chem.* 257:12419-1245.
- Trichopoulou A. (2001). Mediterranean diet: the past and the present. *Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases.* 11(4 Suppl):1-4.
- Trichopoulou A, Costacou T, Cristina B, Trichopoulou D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in Greek population. *New Engl J Med* .384:2599-608.
- Trush MA and Kensler TW. (1991). An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Rad Biol Med.* 10:201-209.
- Tsukada, H., Mochizuki, Y., Konishi, T. (1985):Morphogenesis and development of microbodies of hepatocytes of rats during pre and pos natal growth. *J. Biol. Cell.* Vol. 37:231-243.
- Turrens J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552:335-344.
- Valenzuela A. (1991b). Minireview: The biological significance of malondialdehyde determination. Its assessment in the evaluation of oxidative stress. *Life Sci.* 48:301-309.

BIBLIOGRAFÍA

- Vericel E, Rey C, Calzada C, Haond P, Chapuy PH and Lagarde M. (1992). Age-related changes in arachidonic acid peroxidation and glutathione-peroxidase activity in human platelets. *Prostaglandins*. 43:75-85.
- Viña JR, Devesa A, García C Puertes. (1992). Maintenance of GSH in primary astrocyte cultures under oxidative stress conditions *Biochem Soc Trans* . 21, 74S.
- Viña J, Viña JR and Sáez G. (1986). Glutathione: Metabolism and physiological functions. *Life Chem*. 4, 1-35.
- Viña J. (1990). Glutathione. Metabolism and Physiological Functions. Ed Viña J. *CRC Press Boca Raton, Florida*.
- Visioli F, Galli C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new finding. *Nutr Rev*.56:142-147.
- Visioli F, Galli C. (2001). The role of antioxidants in the Mediterranean diet. *Lipids*.36:S49-S52.
- Wahrburg, Ursel. (2004). What are the health effects of fat? *European Journal of Nutrition*. 43 Suppl 1:1/6-11.
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. 123: 309-314.
- Wefers H and Sies H. (1983). Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulphide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem*. 137: 29-36.
- Weichselbaum TE. (1946). Test combination of protein total. *Amer J Clin Path*. 16, 40.
- Williamson DH, Lund P and Krebs, HA. (1967). The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J*. 103: 514-527.
- Williamson D and Mellanby J. (1974). Determination, d-(-)-3-Hydroxybutyrate. *Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer ed)*. pp: 1836-1839.
- Willet WAC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luz A, Helsin GE and Trichopoulos D. (1995).Mediterranean diet pyramid a cultural model for healthy eating. *Am J Nutr* .61:13215-13235.

-
- Wilson RL. (1979). Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: What relevance in vivo? *Oxygen free radicals and tissue damage*. Ciba Found Symp. 65, 19-35.
- Willson RL. (1977). Iron, zinc, free radicals and oxygen in tissue disorders and cancer control. In iron metabolism. In: *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*. Ciba Found. Symp Elsevier Excerpta Medica. North Holland. (Amsterdam). 51, 331-354.
- Willson RL. (1979). Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: What relevance in vivo?. In: *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*. Ciba Found. Symp Elsevier Excerpta Medica. North Holland. (Amsterdam). 65, 19-35.
- Wilson JX. (1989). Ascorbic acid uptake by a high-affinity sodium-dependent mechanism in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*. 53, 1064-1071.
- Wilson JD. (1994). Harrison's Principles of Internal Medicine (Eds: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL). McGraw-Hill Inc New York .pp. 472-480.
- Winkler, B.S.; Orselli, S.M.; and Rex, T.S.; (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radical Biology & Medicine*. 17(4): 333-349.
- Wisseman SA, Mathot JN, Fouw NJ and Tijburg LBM. (1996) Dietary tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*. 120:13-15.
- Wolf SD, RT. (1987). Glucose oxidation and protein modification. The potential role of autooxidative glycosilation in diabetes. *Biochem J*. 245:243-250.
- Wolfgang A. Gunzler and Leopold Flohe (1986). Glutathione Peroxidase. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radicals Research*, CRC Press.
- Yoshioka K, Yoshida T, Kondo M. (1992). Brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate contribute to the variation in obesity among rats fed a high fat diet. *Jpn J Physiol*. 42(4):673-80.
- Yost, F. J. and Fridovich, I. (1973): "An iron containing superoxide dismutase from E. Coli". *J. Biol. Chem*. 248, 4905-4908.

BIBLIOGRAFÍA

-Yu PB. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74:134-162.