

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 6 5 5 9 6 8 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**"EFECTO DE LAS VITAMINAS C Y E SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO A
LÍPIDOS, PROTEÍNAS Y ADN, LA RAZÓN GSH/GSSG Y LA COMPOSICIÓN EN
ÁCIDOS GRASOS EN EL COBAYA, LA RATA ODS Y LA ORINA HUMANA"**

V°B°

El director

Gustavo Barja de Quiroga

Susana Cadenas Álvarez

Memoria presentada por Susana Cadenas
Álvarez para obtener el Grado de Doctor
en Ciencias Biológicas.

Madrid, Junio 1996



La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal-II (Fisiología Animal) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Gustavo Barja de Quiroga.

La realización de este trabajo se ha llevado a cabo, en parte, gracias al apoyo económico prestado por una ayuda enmarcada dentro del Proyecto 93/0145E del Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social del Ministerio de Sanidad y Consumo y dos becas predoctorales de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia y de la Universidad Complutense de Madrid.

A mi Familia

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de alguna manera, han contribuido a la realización de este trabajo.

Al Dr. Gustavo Barja de Quiroga le agradezco la confianza que me ha ofrecido desde el principio y su constante dirección y ayuda. Trabajar a su lado durante estos años ha supuesto para mí un verdadero estímulo por su calidad científica y sus cualidades humanas.

El grupo de investigación del Dr. Reinaldo Pamplona ha determinado una parte de los datos presentados en este trabajo. Quiero agradecerles su amable colaboración.

Gracias también a la Dra. Paloma Bosch y a Enrique por su colaboración en el experimento de endotoxina y por conseguir que algunos momentos difíciles resultaran mucho más agradables.

A las profesoras Dra. Mercedes Alonso Bedate, Dra. Mónica de la Fuente y Dra. Rosa M^a Arahetes, directoras del Departamento desde mi incorporación, por su amabilidad durante la realización de este trabajo.

A Rosa y Cari, con quienes he compartido el trabajo de laboratorio de todos estos años, les agradezco sinceramente todos los buenos momentos que hemos pasado juntas, su ayuda y su amistad.

A Mónica, Asun y Julia les agradezco su participación en algunos experimentos de esta tesis. *Gracias por vuestra ayuda.*

A Miyazawa *sensei* le agradezco que me acogiera en su laboratorio y me integrara en su grupo de trabajo. A Otsuka *san* y a Sittiwat no tengo palabras para agradecerles todo lo que hicieron por mí para que me sintiera como en casa dentro y fuera del laboratorio. Gracias a ellos, las incontables horas de trabajo se transformaron en una experiencia inolvidable. Gracias también a Funayama *san* y Nagashima *san*, y a los demás compañeros del laboratorio, por todas las atenciones que tuvieron conmigo.

Al Prof. Steffen Loft y al Prof. Henrik E. Poulsen les agradezco las facilidades que me ofrecieron en su laboratorio. A Jens por su simpatía y por estar siempre dispuesto a ayudarme en todo. A los demás compañeros del laboratorio, especialmente a Kirsten, Christopher y Mary, gracias por su amabilidad.

Gracias a todos los que han participado desinteresadamente en el experimento de suplementación con vitaminas en humanos y por supuesto a los cobayitas y las ratas ODS.

Agradezco a Roche el facilitarnos amablemente las vitaminas C y E para el estudio en humanos.

A mis compañeros de laboratorio M^a Jesús, Angel Luis, Ana, Begoña, Nuria, Álvaro y Marisa, y al resto de mis compañeros del Departamento, especialmente a Dolores, Manuel, Rosi y Sonia, por estar dispuestos a colaborar en cualquier momento y por lo agradable que ha sido trabajar junto a ellos durante estos años.

M^a Paz siempre ha estado dispuesta a compartir conmigo su tiempo y su alegría. Gracias por tu generosidad.

A mis amigas del cole Mónica, Nela, Elena, Beatriz, Macarena, Carmen y Arancha les agradezco sus constantes muestras de interés y apoyo, y también su visita a Copenhague. Al resto de mis amigos, especialmente a Isabel y Carlos, gracias por animarme a llegar hasta el final.

Gracias a Jorge, de una manera especial, por compartir conmigo la etapa final de redacción de este trabajo.

A mis padres les agradezco su generoso apoyo y su colaboración constante en todas las etapas de esta tesis. Gracias a mi hermana, por estar siempre a mi lado compartiendo con cariño e ilusión todos mis proyectos, y ofreciéndome su valiosa ayuda durante la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
AT	3-Amino-1,2,4-triazol
BHT	Butilhidroxitolueno
CG	Cromatografía de gases
dG	2'-Desoxiguanosina
DHA	Dehidroascorbato
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidracina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-CL	HPLC con detección de quimioluminiscencia
HPLC-EC	HPLC con detección electroquímica
HPLC-FL	HPLC con detección de fluorescencia
HPLC-UV	HPLC con detección ultravioleta
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido de <i>E. coli</i>
MDA	Malondialdehído
N.D.	No detectable
NEM	n-Etilmaleimida
ODS	Osteogenic Disorder Shionogi
8-OHdG	8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina
PC	Fosfatidilcolina
PCOOH	Hidroperóxido de fosfatidilcolina
PEOOH	Hidroperóxido de fosfatidiletanolamina

POV	Valor de peroxidación
PMC	2,2,5,7,8-Pentametil-6-hidroxicromano
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. RADICALES LIBRES	2
1. Producción de radicales libres	3
A. Radical superóxido	3
B. Peróxido de hidrógeno	5
C. Radical hidroxilo	7
D. Oxígeno singlete	8
2. Vida media de los radicales libres	10
3. Propósitos útiles de los radicales libres	11
II. EQUILIBRIO ANTIOXIDANTE PROOXIDANTE	12
1. Antioxidantes enzimáticos	12
A. Catalasa y glutatión peroxidasa	12
B. Superóxido dismutasa	14
2. Antioxidantes no enzimáticos	16
A. Hidrosolubles	16
A.1 Glutatión	16
A.2 Ácido ascórbico (vitamina C)	19
B. Liposolubles	22
B.1 α -Tocoferol (vitamina E)	22
B.2 Carotenoides	25
3. Estrés oxidativo	26

III. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	28
1. Proceso de peroxidación	29
A. Iniciación.....	30
B. Propagación.....	31
C. Terminación.....	32
2. Papel de los iones metálicos en el proceso de peroxidación lipídica	32
3. Protección frente a la peroxidación lipídica	34
4. Medida de la peroxidación lipídica	36
IV. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS	37
V. DAÑO OXIDATIVO AL ADN	42
VI. SHOCK ENDOTÓXICO Y RADICALES LIBRES	47
1. Endotoxinas bacterianas.....	47
2. Shock endotóxico.....	48
3. Implicación de los radicales libres en el shock endotóxico	51
VII. VITAMINAS ANTIOXIDANTES Y ENFERMEDADES DEGENERATIVAS EN HUMANOS	52
OBJETIVOS.....	59
MATERIAL Y MÉTODOS.....	62
I. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	63
1. Estudio del efecto de la suplementación con ácido ascórbico y α -tocoferol en la dieta sobre el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, la razón GSH/GSSG y la composición en ácidos grasos en el hígado y el corazón de cobaya	63
1.1 Estudio del efecto de la suplementación con ácido ascórbico y del 3-amino-1,2,4-triazol (AT) en el hígado y el corazón de cobaya	63
1.2 Estudio del efecto de la suplementación con α -tocoferol en la dieta en el hígado y el corazón de cobaya	65

1.3 Estudio del efecto de la suplementación con ácido ascórbico y α -tocoferol en la dieta en el hígado y el corazón de cobayas sometidos a shock endotóxico inducido por lipopolisacárido de <i>E. coli</i>	67
2. Estudio del efecto de la suplementación con ácido ascórbico y α -tocoferol en la dieta sobre los hidroperóxidos lipídicos y la peroxidación lipídica en el hígado y el plasma de ratas ODS	69
3. Estudio del efecto de la suplementación con ácido ascórbico y α -tocoferol en la dieta sobre los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la orina humana	72
 II. MATERIAL.....	75
1. Productos químicos	75
2. Equipo instrumental.....	78
3. Animales de experimentación	80
 III. MÉTODOS ANALÍTICOS	81
1. Determinación de ácido ascórbico por HPLC	81
A. Preparación de muestras	81
B. Solución estándar	81
C. Condiciones cromatográficas	81
2. Determinación de ácido ascórbico por espectrofotometría	83
3. Determinación de α -tocoferol por HPLC con detección UV	85
A. Preparación de muestras	85
B. Solución estándar	87
C. Condiciones cromatográficas	87
4. Determinación de α -tocoferol por HPLC con detección fluorimétrica	88
A. Preparación de muestras	88
B. Solución estándar	88
C. Condiciones cromatográficas	88
5. Estudio del balance entre los niveles de glutatión reducido y oxidado	90
A. Preparación de muestras	90
B. Medida del glutatión	91
6. Actividad catalasa	93
A. Preparación de muestras	93

B. Medida de la actividad catalasa	93
7. Análisis de la peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas)	
<i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	94
A. Preparación de muestras	94
B. Peroxidación lipídica <i>in vivo</i> .	
Método del ácido tiobarbitúrico	95
C. Peroxidación lipídica inducida (<i>in vitro</i>)	98
8. Determinación del malondialdehído por HPLC	98
A. Preparación de muestras	98
B. Solución estándar	100
C. Condiciones cromatográficas	100
9. Determinación de hidroperóxidos lipídicos	101
A. Extracción de los lípidos	101
B. Solución estándar	103
C. Determinación del valor de peroxidación	104
D. Condiciones cromatográficas	105
10. Estudio de la composición en ácidos grasos	109
A. Extracción de los lípidos	109
B. Separación de las fracciones lipídicas	110
C. Obtención de los ésteres metílicos de los	
ácidos grasos (transesterificación)	111
D. Análisis en el cromatógrafo de gases	111
11. Determinación de carbonilos protéicos	112
A. Preparación de muestras	112
B. Medida de los carbonilos protéicos	113
12. Determinación de 8-OHdG	113
A. Aislamiento del ADN	114
B. Precipitación del ADN	116
C. Digestión del ADN	116
D. Solución estándar	117
E. Condiciones cromatográficas	117
13. Determinación de creatinina en orina	120
14. Valoración de proteínas	121
15. Determinación de la concentración de fósforo	123

IV. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	125
1. Características muestrales.....	125
2. Análisis estadístico de los datos	125
A. Test t de Student	125
B. Análisis de la varianza	125
C. Test de Fisher de mínima diferencia significativa	126
D. Test de Bartlett	126
RESULTADOS	107
I. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA DIETA EN EL HÍGADO Y EL CORAZÓN DE COBAYA	128
1. Peso corporal e ingesta de alimento	128
2. Hígado	128
A. Ácido ascórbico y α -tocoferol	128
B. Razón GSH/GSSG	133
C. MDA libre	133
D. Daño oxidativo a proteínas.....	133
E. Daño oxidativo al ADN.....	133
F. Peroxidación lipídica (TBARS)	133
G. Composición en ácidos grasos	139
3. Corazón	151
A. Ácido ascórbico y α -tocoferol	151
B. Razón GSH/GSSG	151
C. MDA libre	151
D. Peroxidación lipídica (TBARS)	151
II. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA DIETA Y DEL 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOL (AT) EN EL HÍGADO DE COBAYA	158
A. Actividad catalasa	158
B. Ácido ascórbico y α -tocoferol	158
C. Razón GSH/GSSG	158
D. MDA libre	158

E. Daño oxidativo a proteínas	164
F. Peroxidación lipídica (TBARS)	164

III. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON α -TOCOFEROL EN LA DIETA EN EL HÍGADO

Y EL CORAZÓN DE COBAYA	168
1. Peso corporal e ingesta de alimento	168
2. Hígado	168
A. Ácido ascórbico y α -tocoferol	168
B. Razón GSH/GSSG	173
C. MDA libre	173
D. Daño oxidativo a proteínas	173
E. Daño oxidativo al ADN	173
F. Peroxidación lipídica (TBARS)	173
G. Composición en ácidos grasos	177
3. Corazón	191
A. Ácido ascórbico y α -tocoferol	191
B. Razón GSH/GSSG	191
C. MDA libre	191
D. Peroxidación lipídica (TBARS)	191

IV. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA EN EL HÍGADO Y EL CORAZÓN DE COBAYAS SOMETIDOS A SHOCK ENDOTÓXICO INDUCIDO POR

LIPOPOLISACÁRIDO DE <i>E. coli</i>	200
1. Peso corporal e ingesta de alimento	200
2. Hígado	203
A. Ácido ascórbico y α -tocoferol	203
B. Razón GSH/GSSG	203
C. MDA libre	203
D. Daño oxidativo a proteínas	203
E. Daño oxidativo al ADN	209
F. Peroxidación lipídica (TBARS)	209

3. Corazón	212
A. Ácido ascórbico y α -tocoferol	212
B. Razón GSH/GSSG	212
C. MDA libre	212
D. Peroxidación lipídica (TBARS)	212
V. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA SOBRE LOS HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL HÍGADO Y EL PLASMA DE RATAS ODS	219
1. Peso corporal e ingesta de alimento	219
2. Hígado	219
A. α -Tocoferol y ácido ascórbico	219
B. Peroxidación lipídica (TBARS)	223
C. Hidroperóxidos de lípidos de membrana	223
4. Plasma	230
A. α -Tocoferol y ácido ascórbico	230
B. Peroxidación lipídica (TBARS)	230
C. Hidroperóxidos de lípidos de membrana	230
VI. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA SOBRE LOS PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA ORINA HUMANA	235
DISCUSIÓN	242
CONCLUSIONES	274
BIBLIOGRAFÍA	277

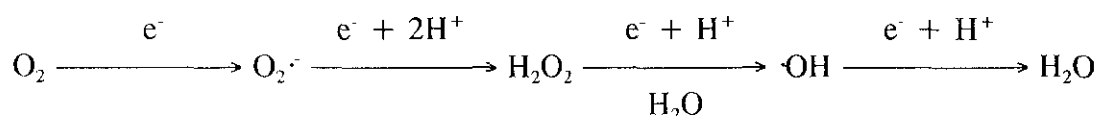
INTRODUCCIÓN

I. RADICALES LIBRES

Un **radical libre** es una especie química independiente que posee uno o más electrones desapareados. Aunque el oxígeno molecular contiene un número par de electrones, presenta dos electrones desapareados en sus orbitales moleculares más externos. Este es el estado más estable, denominado **estado basal**, del oxígeno.

Los dos electrones desapareados del O₂ poseen el mismo número cuántico de spin, por lo que si el O₂ oxida a otro átomo o molécula aceptando un par de electrones de ellos, ambos electrones deben poseer spines paralelos, de manera que encajen en los espacios vacantes de los orbitales. Generalmente, un par de electrones de un orbital atómico o molecular tiene spines antiparalelos. Esto impone una importante restricción al O₂ en sus reacciones de oxidación. El O₂ molecular está generalmente limitado a aceptar electrones de uno en uno. Esto da lugar a la formación del radical superóxido y otras especies relacionadas (Cadenas, 1989).

La formación de estos radicales libres derivados del oxígeno se realiza por la vía univalesnte siguiendo el esquema que a continuación se detalla:



La adición de un electrón al O₂ molecular en estado basal da lugar al **radical superóxido** O₂^{·-}. La adición de un segundo electrón origina el **ión peróxido** O₂²⁻, que no es un radical. En los sistemas biológicos, el producto de la reducción del O₂ por dos electrones es generalmente la forma protonada del O₂²⁻, el **peróxido de hidrógeno** H₂O₂. El peróxido de hidrógeno se puede descomponer por fisión homolítica dando lugar al **radical hidroxilo** ·OH. La adición de un cuarto electrón y un protón da lugar a la formación de agua.

1. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres pueden producirse a través de procesos fisiológicos normales o a causa de la influencia de factores exógenos.

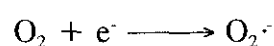
La citocromo oxidasa mitocondrial es capaz de reducir tetravalentemente el O₂ a agua en un proceso fundamental para la extracción aerobia de energía en las células eucariotas. Durante este proceso se forman radicales libres transitoriamente, pero ninguno de ellos es liberado por la enzima (Chance, 1981).

Sin embargo, en lugares anteriores de la cadena de transporte mitocondrial tales como la NADH deshidrogenasa (Nohl, 1993; Turrens *et al.*, 1982), la ubiquinona (Boveris *et al.*, 1976; Chance *et al.*, 1979), o el citocromo *b* del complejo III (Nohl, 1993), una pequeña cantidad de O₂, aunque fisiológicamente significativa, es reducida univalentemente, dando lugar a la formación de radicales libres de oxígeno.

Aunque en la mayoría de las células en estado basal la mitocondria es la principal fuente de radicales libres, estos también pueden formarse en otros orgánulos o situaciones, incluyendo el metabolismo de microsomas y peroxisomas, la autooxidación de diversas moléculas como catecolaminas o mioglobina, el ciclo redox de ciertos xenobióticos (principalmente quinonas), la membrana plasmática de fagocitos durante las infecciones o procesos de autoinmunidad y el metabolismo de las purinas.

A. Radical superóxido

El radical superóxido carece de reactividad suficiente como para atacar directamente a las macromoléculas, aunque es una especie potencialmente tóxica. Se forma por la adición de un electrón a la molécula de oxígeno. Diversas enzimas celulares catalizan reacciones de oxidación en las que un sólo electrón es transferido desde un sustrato a una molécula de O₂ generando el radical superóxido:



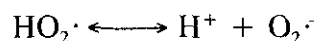
Algunos ejemplos de estas enzimas son la triptófano dioxigenasa, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, flavin deshidrogenasas y peroxidasas (McCord y Fridovich, 1968).

El radical $O_2^{\cdot-}$ también se produce durante la autooxidación de las formas reducidas de algunos compuestos presentes *in vivo* como la ferredoxina, la adrenalina, flavinas y componentes de la cadena de transporte de electrones de bacterias (Shvinka *et al.*, 1979), cloroplastos (Asada *et al.*, 1974) y mitocondrias (Nohl y Hegner, 1978).

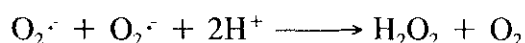
Los macrófagos y otras células fagocíticas producen superóxido durante el estallido respiratorio que sigue a su activación (Baehner *et al.*, 1982; Tate y Repine, 1984). Esta producción forma parte del mecanismo mediante el cual destruyen organismos extraños. Durante inflamaciones crónicas, este mecanismo normal de protección puede llegar a ser perjudicial (Halliwell, 1994).

En solución acuosa, el radical superóxido puede actuar como un fuerte agente reductor o como un débil oxidante, reduciéndose a H_2O_2 . Por ejemplo, reduce al citocromo *c* pero oxida a moléculas como el ácido ascórbico, la adrenalina y compuestos tiólicos como el glutatión (Halliwell, 1981).

La forma protonada del $O_2^{\cdot-}$, el **radical hidroperoxilo** HO_2^{\cdot} , es un oxidante más poderoso que el $O_2^{\cdot-}$, aunque la cantidad de HO_2^{\cdot} a pH fisiológico es baja:



Dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar en una reacción de dismutación. El proceso general puede ser representado mediante la ecuación:



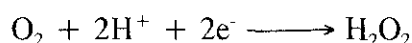
La reacción directa de dos radicales $O_2^{\cdot-}$ es muy lenta, probablemente debido a la repulsión electrostática. A valores de pH ácidos, necesarios para protonar al $O_2^{\cdot-}$, la dismutación ocurre más rápidamente que a pH fisiológico.

El radical O_2^{\cdot} es bastante poco reactivo en comparación con el radical hidroxilo o el oxígeno singlete. Sin embargo, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación del radical O_2^{\cdot} y del H_2O_2 en la **reacción de Haber-Weiss** da lugar a la formación del radical hidroxilo $\cdot OH$, el cual es altamente reactivo.

Se ha observado que sistemas generadores de O_2^{\cdot} pueden ser letales para bacterias, dañar enzimas y membranas, e inducir la peroxidación lipídica (Fridovich, 1979), probablemente debido a su capacidad para generar el radical $\cdot OH$.

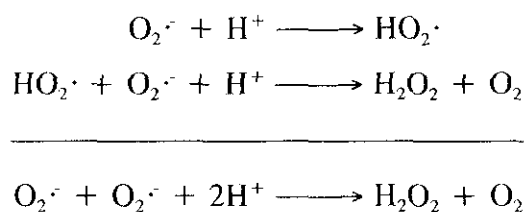
B. Peróxido de hidrógeno

La mayor parte del oxígeno consumido por los organismos aerobios es reducido a agua por la adición de 4 electrones, mediante la acción de la citocromo oxidasa de la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, diversas enzimas celulares transfieren 2 electrones a cada molécula de oxígeno utilizada, generando peróxido de hidrógeno:



Entre las enzimas que llevan a cabo esta reducción divalente están la urato oxidasa, la D-aminoácido oxidasa y la glicolato oxidasa.

Otra vía de formación del H_2O_2 es la reacción de dismutación del O_2^{\cdot} (Halliwell, 1981). Esta reacción ocurre en dos etapas: en la primera el radical superóxido se combina con un protón para formar el radical hidroperoxilo y en la segunda, éste reacciona con otro radical superóxido y un protón generando peróxido de hidrógeno:



Esta reacción es catalizada intracelularmente por la enzima **superóxido dismutasa**.

La autooxidación de algunos de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y del cloroplasto genera H_2O_2 *in vitro* y, en el caso de la mitocondria, esto también podría ocurrir *in vivo* (Chance *et al.*, 1989). Se ha observado producción de H_2O_2 durante los procesos de fagocitosis. Los microsomas aislados incubados con NADPH generan grandes cantidades de H_2O_2 (Hildebrandt y Roots, 1975). Sin embargo, en el retículo endoplásmico, la tasa de producción de H_2O_2 *in vivo* parece ser mucho menor (Sies *et al.*, 1978).

Los cloroplastos de las plantas superiores también generan H_2O_2 a pesar de que concentraciones de H_2O_2 tan bajas como 10^{-5} M inhiben en un 50% la fijación de CO_2 en el ciclo de Calvin.

No existe un patrón uniforme de la toxicidad del H_2O_2 en los diferentes organismos y esto se puede relacionar con las propiedades químicas de esta molécula. El H_2O_2 puro es una molécula estable, poco reactiva, que puede atravesar membranas celulares y es capaz de inactivar enzimas directamente, oxidando grupos tiólicos (-SH) esenciales, como ocurre con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

A pesar de que el H_2O_2 no es un radical libre, en presencia de iones de metales de transición como el hierro, el H_2O_2 se descompone para dar lugar al radical hidroxilo ($\cdot OH$):



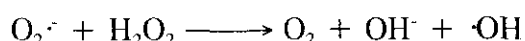
Esta reacción fue observada por primera vez por Fenton en 1894, por lo que se conoce con el nombre de **reacción de Fenton**. La disponibilidad de iones de metales de transición puede influir en la mayor o menor toxicidad del H_2O_2 , al igual que la radiación ultravioleta, que provoca la fisión homolítica del H_2O_2 :



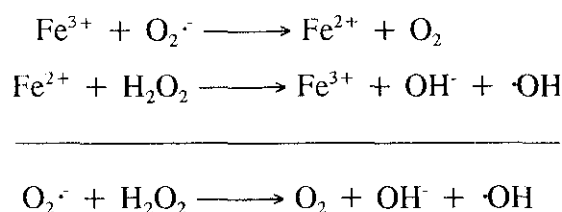
La vida media del H_2O_2 le permite difundir en la célula distancias apreciables antes de reaccionar (Pryor, 1986), por lo que se considera al H_2O_2 responsable de la propagación del daño oxidativo entre las distintas fracciones celulares.

C. Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es una especie química de gran reactividad. Puede generarse a partir del peróxido de hidrógeno, por rotura homolítica de esta molécula. Además existe otra vía de producción, la **reacción de Haber-Weiss**:



Esta reacción, que fue postulada por primera vez por F. Haber y J. Weiss en 1934, es demasiado lenta para ser relevante biológicamente (Sutton y Winterbourn, 1989). Sin embargo, la formación de $\cdot\text{OH}$ puede tener lugar si la reacción de Haber-Weiss es catalizada por trazas de iones de metales de transición:



La segunda reacción es una reacción tipo Fenton. En esta reacción, el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ actúa como reductor del hierro. Los metales de transición están ampliamente distribuidos en los seres vivos. La extensión en la que este proceso puede ocurrir depende de la accesibilidad del $\text{O}_2^{\cdot-}$ a los iones metálicos, y de la posible presencia de otros agentes reductores que también pueden reducir al hierro. La reacción puede ser inhibida por agentes quelantes de iones metálicos (Halliwell, 1981).

El radical hidroxilo también es un producto de la radiación ionizante. Actualmente es considerado el principal iniciador del ataque a todo tipo de macromoléculas. Su electrón desapareado reacciona inespecíficamente con cualquier molécula próxima a su lugar de formación.

El radical hidroxilo ataca casi a cualquier molécula existente en las células. Puede hidroxilar las bases púricas y pirimidínicas del ADN favoreciendo la aparición de mutaciones. Asimismo, puede provocar daño en las membranas celulares e inactivar ciertas

enzimas (Del Maestro, 1980). También es responsable de la degradación del ácido hialurónico *in vitro* y posiblemente intervenga *in vivo* en los cambios patológicos que se producen durante las enfermedades inflamatorias.

La alta reactividad del radical hidroxilo impide su difusión a largas distancias a través de la célula (Pryor, 1986). Pero la presencia simultánea de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , o sólo de H_2O_2 , asegura la generación significativa de $\cdot OH$ en la mayor parte de la célula.

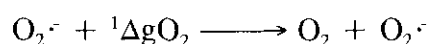
D. Oxígeno singlete

Existen dos estados de oxígeno singlete, los cuales presentan mayor reactividad que el oxígeno en estado basal. En el oxígeno singlete la restricción de spin es eliminada, lo que incrementa su capacidad oxidativa (figura I.1).

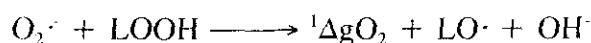
	<u>Estado</u>	<u>Reactividad</u>
Oxígeno (estado basal)	$\uparrow \uparrow$	Baja
Oxígeno singlete $^1\Delta g O_2$	$\uparrow \downarrow$ \circ	Alta
Oxígeno singlete $^1\Sigma g^+ O_2$	$\uparrow \downarrow$	Muy alta

Figura I.1. Estados y reactividad del oxígeno molecular.

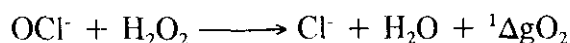
El estado $^1\Sigma g^+ O_2$ es extremadamente reactivo y se transforma rápidamente en el estado $^1\Delta g O_2$, por lo que sólo este último suele ser considerado en los sistemas biológicos. Aunque $^1\Delta g O_2$ no es un radical libre, puede formarse en algunas reacciones de radicales y dar lugar a otras. El oxígeno singlete podría producirse en pequeñas cantidades durante la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ y durante la reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro. Además, el propio $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el oxígeno singlete reduciendo aún más sus niveles:



Se ha sugerido que, en presencia de trazas de iones metálicos, el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con peróxidos lipídicos preformados para originar $^1\Delta g O_2$:



También se produce oxígeno singlete a partir de moléculas de H_2O_2 e iones hipoclorito (OCl^-), que pueden ser formados por la enzima mieloperoxidasa durante la fagocitosis:



El mecanismo más frecuente de producción de ${}^1\Delta\text{gO}_2$ es a través de **reacciones de fotosensibilización** tras la iluminación de compuestos como la riboflavina y sus derivados FMN y FAD, las clorofilas a y b, el pigmento biliar bilirrubina, el pigmento retinal, etc., con luz de una determinada longitud de onda. Una vez formado, el ${}^1\Delta\text{gO}_2$ es capaz reaccionar con otras moléculas presentes o puede atacar a la propia molécula sensibilizada.

El oxígeno singlete puede interaccionar con otras moléculas de dos maneras: combinándose químicamente con ellas, o bien transfiriendo su energía de excitación a estas moléculas, volviendo a su estado basal, mientras que las moléculas entran en un estado *excitado*.

El ${}^1\Delta\text{gO}_2$ tiene una vida media relativamente corta en solución acuosa, pues rápidamente pierde su exceso de energía, pero este tiempo se prolonga cuando se encuentra en medios hidrofóbicos, como es el caso del interior de las membranas. Esto le permitiría reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas contribuyendo a la formación de peróxidos lipídicos. El daño a proteínas es provocado, frecuentemente, por la oxidación de metionina, triptófano, histidina o cisteína esenciales.

Los radicales libres también pueden ser producidos por **fuentes exógenas** como la radiación ionizante, la luz ultravioleta y especies químicas como el ozono, el etanol, por sustancias de síntesis química como el tetracloruro de carbono y por una gran variedad de drogas y xenobióticos.

2. VIDA MEDIA DE LOS RADICALES LIBRES

Los electrones desapareados de los radicales libres alteran la reactividad química del átomo o molécula haciéndolos generalmente más reactivos y por lo tanto disminuyendo su vida media. Sin embargo, la reactividad química de los diferentes radicales varía considerablemente.

Algunos radicales son suficientemente estables como para difundir determinadas distancias en las células, mientras que otros como el $\cdot\text{OH}$ son tan reactivos que reaccionan dentro de 1-5 diámetros moleculares de su lugar de formación (Pryor, 1986).

El peróxido de hidrógeno es una molécula estable. Sin embargo, como la mayoría de los peróxidos, es muy sensible a la descomposición causada por especies químicas que reaccionan con él. El H_2O_2 es descompuesto enzimáticamente por la catalasa y la glutatión peroxidasa, y por concentraciones extremadamente bajas de metales de transición como el hierro.

Así, la vida media del H_2O_2 en las células sólo puede ser calculada si se conocen las concentraciones de todas las especies reactivas y las enzimas antioxidantes en el medio que le rodea. Sin embargo, se considera que, en la mayoría de los ambientes celulares, el H_2O_2 tendría una vida media que le permitiría difundir distancias apreciables antes de reaccionar.

De la misma manera que ocurre con el H_2O_2 , la vida media del superóxido no puede ser calculada a menos que se conozca la concentración de SOD y de todos los sustratos reactivos. En un medio celular acuoso, se estima que la vida media del $\text{O}_2^{\cdot-}$ sería demasiado corta como para permitir su difusión en grandes distancias. Sin embargo, la vida media del radical peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) en medios orgánicos o lipofílicos podría ser mayor (Bielski *et al.*, 1983).

3. PROPÓSITOS ÚTILES DE LOS RADICALES LIBRES

Con cierta frecuencia aparecen datos en la literatura que sugieren propósitos útiles de los radicales libres derivados del oxígeno. La posibilidad de que la liberación de estos radicales en la cadena de transporte mitocondrial sea un **proceso controlado** no puede ser descartada en la actualidad (Barja, 1993).

La modulación de importantes segundos mensajeros celulares como el GMP cíclico puede ocurrir debido al efecto de los radicales de oxígeno sobre la actividad guanilato ciclasa (Haddox *et al.*, 1978).

La producción de $O_2^{\cdot-}$ por la NADPH oxidasa presente en la membrana celular y en las vesículas fagocíticas de neutrófilos, macrófagos, monocitos y eosinófilos forma parte de los sistemas defensivos del organismo (Ward *et al.*, 1988).

Algunos mensajeros químicos cuya síntesis se ha relacionado con hidroperóxidos orgánicos o H_2O_2 son la tiroxina (Dix *et al.*, 1987), prostaglandinas (Egan *et al.*, 1979) y leucotrienos (Samuelsson, 1987).

Se ha sugerido que los radicales de oxígeno están implicados en procesos fundamentales como la diferenciación y el desarrollo (Allen y Balin, 1989).

Otros procesos fisiológicos importantes que han sido relacionados con el radical $O_2^{\cdot-}$ son el potencial de membrana (Scott *et al.*, 1988), la agregación plaquetaria (Handin *et al.*, 1977) y el metabolismo de xenobióticos (Sevanian *et al.*, 1990).

Además, se han descrito otros papeles específicos de los radicales libres en ciertos tejidos o especies como el desarrollo de bioluminiscencia en invertebrados (Henry *et al.*, 1975) o la síntesis de lignina en las plantas (Halliwell, 1978).

Considerando todos estos datos, se puede pensar en la posibilidad que la producción de radicales libres evolucionara con el fin de desarrollar propósitos útiles relacionados con el metabolismo celular.

II. EQUILIBRIO ANTIOXIDANTE-PROOXIDANTE

El mantenimiento de la **homeostasis redox** en los organismos es posible gracias a la existencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Una amplia definición de **antioxidante** es la que los describe como sustancias que, cuando están presentes a bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, inhiben o retrasan significativamente la oxidación del sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1989b).

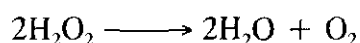
Las interacciones y sinergismos encontrados entre los diferentes antioxidantes sugieren que el sistema de defensa antioxidante puede ser más versátil y eficiente que lo que indican los estudios sobre los efectos de un sólo nutriente (Jacob, 1995).

1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

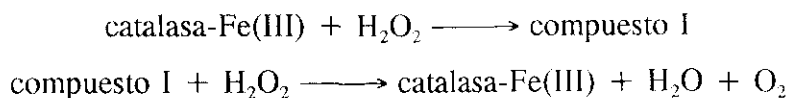
A. Catalasa y glutatión peroxidasa

La concentración de peróxido de hidrógeno en las células debe ser controlada ya que frecuentemente da lugar a la formación del radical $\cdot\text{OH}$. Existen dos tipos de enzimas que eliminan el H_2O_2 dentro de las células: la catalasa y las peroxidasa.

La **catalasa** (EC.1.11.1.6) descompone dos moléculas de H_2O_2 mediante una reacción de dismutación en la que una molécula de H_2O_2 es oxidada y otra reducida, dando lugar a O_2 en estado basal y agua:

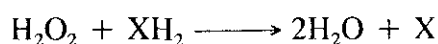


La enzima está constituida por 4 subunidades proteicas cada una de las cuales contiene un grupo hemo (Fe(III)-protoporfirina) unido a su centro activo. El mecanismo de la reacción de la catalasa se puede describir de la manera siguiente:



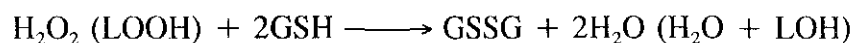
La estructura exacta del compuesto I es desconocida. La catalasa puede ser inhibida por azida o cianuro, aunque estos también inhiben otras enzimas. Otro inhibidor es el **aminotriazol** (AT), que ejerce su acción inhibidora irreversible sobre el compuesto I, por lo que sólo inhibe a la catalasa si está presente el H_2O_2 para permitir la formación de este intermediario (Geerts y Roels, 1982).

La catalasa también puede llevar a cabo reacciones de tipo peroxidasa en presencia de un agente reductor (XH_2):



La catalasa está presente dentro de los peroxisomas en la rata, pero se ha encontrado en el citosol del cobaya (Geerts y Roels, 1982; Yamamoto *et al.*, 1988; Maier *et al.*, 1992) y algunos autores describen su presencia en preparaciones de la membrana externa mitocondrial en cerebro de rata (Vitorica *et al.*, 1984).

La **glutación peroxidasa** se ha descrito tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial. Esta enzima descompone H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos (LOOH) utilizando glutatión (GSH), compuesto tiólico de bajo peso molecular, como agente reductor:



En esta reacción, los equivalentes de reducción proceden, en último término, del NADPH. La enzima, que es específica para GSH como donador de hidrógeno, está constituida por 4 subunidades proteicas, cada una de las cuales contiene un átomo de selenio en su centro activo.

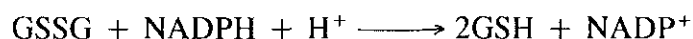
Existe otra forma enzimática en ciertos tejidos animales que no contiene selenio, es dimérica y sólo es capaz de eliminar LOOH. Esta actividad parece ser debida a algunas enzimas glutatión transferasas implicadas en la detoxificación de sustancias extrañas.

Por último, ha sido purificada una enzima dependiente de selenio, diferente de la citosólica, que actúa sobre los hidroperóxidos de los fosfolípidos de membrana (Ursini *et al.*, 1982).

La catalasa y la GSH peroxidasa desempeñan papeles complementarios, ya que la catalasa presenta valores de K_m y V_{max} casi tres órdenes de magnitud mayores que los de la GSH peroxidasa. Esta última enzima elimina cantidades de hidroperóxidos bajas pero producidas constantemente, mientras que la catalasa es de gran importancia en situaciones de estrés oxidativo.

Otras enzimas relevantes en el mantenimiento del balance redox son la glutatión reductasa (GR) y las transhidrogenasas (que transfieren electrones entre NADPH y NADH).

La **glutatión reductasa** (EC.1.6.4.2) cataliza reducción del glutatión oxidado (GSSG):



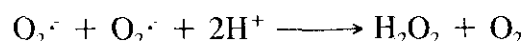
También puede catalizar la reducción de ciertos disulfuros mixtos como el que se forma entre GSH y coenzima A. El NADPH es suministrado principalmente en los tejidos animales por la ruta metabólica conocida como vía oxidativa de las pentosas fosfato.

La glutatión reductasa contiene dos subunidades proteicas, cada una con la flavina FAD en su centro activo. Parece que el NADPH reduce al FAD, que pasa sus electrones a un puente disulfuro (-S-S-) entre dos cisteínas de la proteína. Los dos grupos -SH así formados, interaccionan con el GSSG y lo reducen a dos moléculas de GSH, volviendo a formar el disulfuro proteico.

B. Superóxido dismutasa

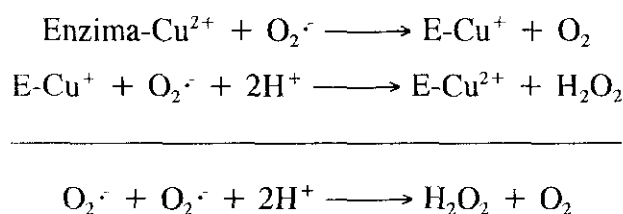
En 1969 McCord y Fridovich identificaron la acción de la enzima superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1), al observar que era capaz de eliminar catalíticamente al radical superóxido (McCord y Fridovich, 1969).

La superóxido dismutasa (SOD) está constituida por dos subunidades proteicas, cada una de las cuales presenta un centro activo que contiene un ión cobre y un ión zinc (**CuZnSOD**), y cataliza la dismutación del superóxido dando lugar a la formación de H_2O_2 :



La superóxido dismutasa es la única enzima antioxidante que produce una de las especies de oxígeno activo más peligrosas, el H_2O_2 . Elimina los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ a pH fisiológico impidiendo así su participación en reacciones como la de Haber-Weiss.

Los iones cobre actúan en la reacción de dismutación oxidándose y reduciéndose alternativamente:



En otro mecanismo propuesto, el radical superóxido no reduciría al ión cobre sino que formaría un complejo con él.

El Zn^{2+} no actúa en el ciclo catalítico, sino que su función consiste en estabilizar la enzima.

La mayor parte de la CuZnSOD se encuentra en el citosol de la célula, en los peroxisomas, algo de actividad está presente en los lisosomas y posiblemente entre la membranas mitocondriales interna y externa, y en el núcleo.

La CuZnSOD es inhibida por cianuro y por dietilditiocarbamato (DDC) que elimina el ión cobre del centro activo de la enzima.

Existe otro tipo de superóxido dismutasa constituida por 4 subunidades proteicas que contienen manganeso en su centro activo (**MnSOD**). El Mn se encuentra en estado Mn^{3+}

cuando la enzima está en reposo y cataliza exactamente la misma reacción que la CuZnSOD.

La MnSOD se localiza en la matriz mitocondrial. Es mucho más lábil a la desnaturalización por calor o por reactivos químicos que la CuZnSOD y no es inhibida por cianuro o DDC.

2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

A. Hidrosolubles

A.1 Glutati3n

El glutati3n (GSH), es un tripéptido de 3cido glut3mico, ciste3na y glicina, que constituye el principal tiol no proteico celular. Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo ti3lico de su ciste3na. En su forma oxidada (GSSG) dos mol3culas de GSH se unen mediante los grupos -SH de la ciste3na, formando un puente disulfuro. Su estructura se muestra en la figura I.2.

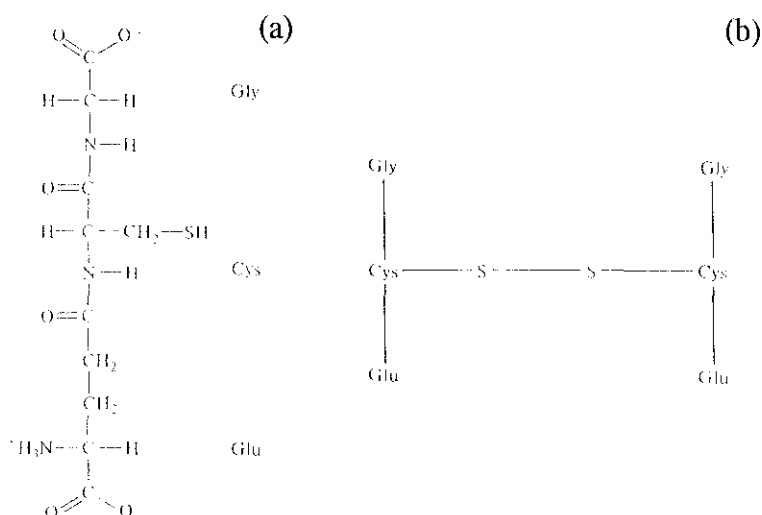
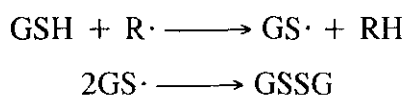


Figura I.2. Estructura del glutati3n en formas reducida (a) y oxidada (b).

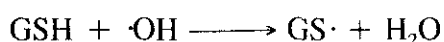
El glutatión constituye, junto con el ácido ascórbico, el principal antioxidante natural en la fracción soluble. Se encuentra en animales, plantas y algunas bacterias, frecuentemente en concentraciones del orden milimolar. Sin embargo, no es esencial para la vida aerobia, ya que no está presente en algunas cepas de bacterias aerobias, aunque en estos casos, contienen otros compuestos tiólicos de bajo peso molecular con una función similar.

La mayoría del glutatión libre *in vivo* está presente en forma GSH, aunque hasta un tercio del glutatión celular total puede encontrarse formando parte de disulfuros mixtos con otros compuestos que contengan grupos -SH, como cisteína, coenzima A y el grupo -SH de residuos cisteína de varias proteínas.

El GSH actúa como sustrato de las enzimas glutatión peroxidasa y dehidroascorbato reductasa. Además, elimina diversos radicales libres, convirtiendo especies reactivas de oxígeno como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ y radicales orgánicos alcoxilo ($LO\cdot$) y peroxilo ($LOO\cdot$) en formas más estables, mediante la reacción:



Estos procesos dan lugar a la formación de radicales tiólicos ($GS\cdot$):



Los radicales $GS\cdot$ también pueden formarse cuando el GSH es oxidado por peroxidadas, o por O_2 en presencia de iones de metales de transición. Los radicales $GS\cdot$, aunque son menos reactivos que el $\cdot OH$, pueden causar algunos problemas biológicos (Halliwell y Gutteridge, 1989a).

También se ha descrito la capacidad del GSH para realizar reacciones de extinción de O_2 singlete, devolviéndolo a su estado basal no reactivo.

El GSH puede reactivar enzimas que hayan sido inhibidas por exposición a altas concentraciones de oxígeno. El O_2 oxida grupos -SH esenciales de las enzimas, los cuales

son regenerados por el glutatión.

En diferentes rutas metabólicas, el GSH actúa como cofactor de numerosas enzimas. Puede estar implicado en la síntesis de hormonas tiroideas y en el transporte de aminoácidos a través de la membrana, y participa en la degradación de insulina en los animales, y también en el metabolismo de herbicidas, pesticidas y compuestos extraños en tejidos animales y vegetales. En los animales, estos compuestos extraños son conjugados con GSH, mediante enzimas glutatión-S-transferasas presentes en el hígado y en otros tejidos. Los conjugados del GSH son generalmente excretados en la bilis, utilizando el mismo mecanismo de transporte que expulsa al GSSG cuando el hígado es sometido a estrés oxidativo.

Los tejidos expuestos a altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, alcanzan un punto en el cual la relación GSH/GSSG no puede ser mantenida a sus elevados valores normales, y el GSSG, que muestra una gran toxicidad, se acumula. El GSSG inhibe la síntesis proteica en células animales, y puede inactivar numerosas enzimas, formando disulfuros mixtos con ellas. Los disulfuros mixtos formados con proteínas y con otras moléculas como la coenzima A, se acumulan en los tejidos sometidos a estrés oxidativo:



En condiciones normales, las células mantienen una relación GSH/GSSG elevada, mediante la reducción del GSSG por la glutatión reductasa (GR) y el NADPH, o la exportación activa del mismo a través de la membrana. Algunos órganos como el hígado y, en menor extensión, el corazón, liberan GSSG cuando se encuentran bajo estrés oxidativo. La medida de la razón GSH/GSSG es un estimador del estrés oxidativo tisular.

Meister y colaboradores demostraron en una serie de estudios en animales que el glutatión y el ácido ascórbico pueden regenerarse mutuamente hasta el punto de mejorar los síntomas carenciales, y que el GSH mantiene fisiológicamente a la vitamina C en su forma reducida (Meister, 1994a; Mårtensson y Meister, 1992).

A.2 Ácido ascórbico (vitamina C)

El ácido ascórbico es una sustancia de bajo peso molecular presente en todos los compartimentos acuosos (citósol, plasma, líquido extracelular) de plantas y animales (Sies *et al.*, 1992).

Las plantas y la mayoría de los animales son capaces de sintetizar el ácido ascórbico a partir de la glucosa. Sin embargo, el hombre y otros primates, el cobaya y los murciélagos frugívoros perdieron durante su evolución una de las enzimas necesarias para su síntesis y por lo tanto requieren la presencia del ácido ascórbico en la dieta. Estas especies carecen de la enzima que cataliza el último paso en la síntesis de ácido ascórbico en el hígado a partir de glucosa por la vía del ácido D-glucurónico, la **L-gulonolactona oxidasa** (E.C. 1.1.3.2.4.8).

Tanto el hombre como el cobaya carecen del ARN mensajero específico de esta enzima pero sus genomas contienen una secuencia nucleotídica relacionada con la proteína (Nishikimi *et al.*, 1988). Sin embargo, las ratas ODS (Osteogenic Disorder Shionogi) poseen el ARN mensajero de la enzima (Nishikimi *et al.*, 1989). El defecto genético en la secuencia nucleotídica consiste en una mutación puntual de G a A que da lugar a un cambio de cisteína a tirosina en la proteína (Kawai *et al.*, 1992) lo que podría conferir una gran inestabilidad a la proteína mutada (Nishikimi y Yagi, 1996).

El ácido ascórbico se requiere *in vivo* como cofactor de diversas enzimas de las cuales las mejor conocidas son la prolina hidroxilasa y la lisina hidroxilasa, implicadas en la biosíntesis del colágeno. El colágeno sintetizado en ausencia de ácido ascórbico no está suficientemente hidroxilado y no forma fibras adecuadamente, dando lugar a una cicatrización de las heridas deficiente y fragilidad de los vasos sanguíneos.

El ascorbato también se requiere para la acción de la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que convierte la dopamina en noradrenalina. Se ha descrito su actuación en hasta ocho reacciones metabólicas (Labadie, 1991), pero en ninguna de ellas parece ser indispensable. La deficiencia de ascorbato en la dieta causa **escorbuto**.

La propiedad química más notable del ascorbato es su capacidad de actuar como agente reductor. La donación de un electrón por el ascorbato (ASC) produce el radical **semidehidroascorbato** (AFR·), que puede ser oxidado posteriormente generando **dehidroascorbato** (DHA). La estructura de estos compuestos se muestra en la figura 1.3.

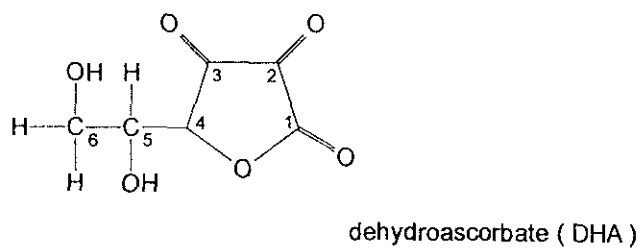
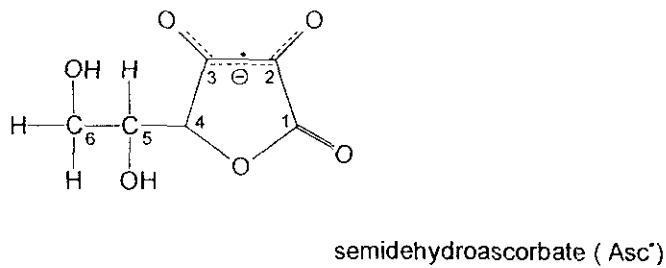
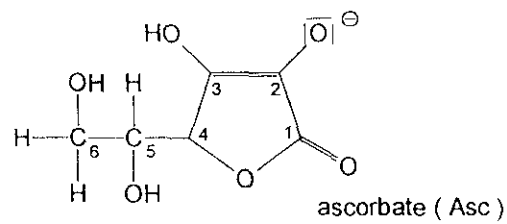
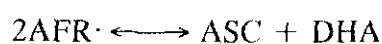


Figura 1.3. Estructura del ácido ascórbico y sus formas oxidadas.

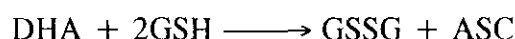
El radical AFR· no es particularmente reactivo, y generalmente sufre la siguiente reacción reversible:



El DHA es inestable (Bode *et al.*, 1990) y se degrada rápidamente de una manera compleja. Las soluciones acuosas de ácido ascórbico son estables, a menos que estén presentes iones de metales de transición, que catalizan su rápida oxidación a expensas de oxígeno molecular (Halliwell y Gutteridge, 1989a). El ácido úrico puede unir iones hierro y cobre, por lo que estabiliza al ascorbato en los fluidos biológicos inhibiendo su oxidación catalizada por hierro (Sevanian *et al.*, 1991).

El ascorbato reacciona rápidamente con $O_2\cdot^-$ y HO_2 e incluso más rápidamente con $\cdot OH$ generando $AFR\cdot$ (Sies *et al.*, 1992). También elimina O_2 singlete, reduce radicales $GS\cdot$, y se combina con ácido hipocloroso, un poderoso oxidante generado en los sitios de inflamación. La enzima ascorbato peroxidasa elimina H_2O_2 utilizando ascorbato como sustrato.

Se han descrito sistemas enzimáticos capaces de reducir las formas oxidadas del ácido ascórbico. La actividad **DHA reductasa** se ha observado en muchos tejidos como hígado, riñón, intestino y placenta (Rose y Bode, 1993). Esta enzima puede utilizar NADPH como donador de electrones. En algunos tejidos, el GSH también es necesario para la reducción del DHA. En este caso, la enzima cataliza la siguiente reacción:



El GSSG formado sería reducido por NADPH y la glutatión reductasa. La reducción enzimática dependiente de GSH podría ser debida a tioltransferasas y disulfuro isomerasas (Wells y Xu, 1994). Recientemente se ha caracterizado en hígado de rata una enzima que cataliza la reducción del DHA dependiente de GSH que es diferente a las tioltransferasas (Maellaro *et al.*, 1994).

En la membrana plasmática de diferentes tipos celulares se ha descrito una actividad **AFR \cdot reductasa** (Villalba *et al.*, 1996), que reduce el radical $AFR\cdot$ a ascorbato utilizando NADH como donador de electrones. La reducción **no enzimática** del $AFR\cdot$ y DHA es una alternativa al funcionamiento de las $AFR\cdot$ y DHA reductasas.

El ascorbato y el glutatión actúan de una manera cooperativa (Meister, 1994b). El

ascorbato protege a cobayas y ratas recién nacidas de la mortalidad inducida por butionina sulfoximina (inhibidor de la síntesis de glutatión) (Mårtensson y Meister, 1991; Mårtenson *et al.*, 1991; Meister, 1994). Recíprocamente, el glutatión evita el desarrollo de escorbuto en cobayas mantenidos con dietas deficientes en ascorbato (Mårtenson *et al.*, 1993).

De la misma manera que el $O_2^{\cdot-}$, el ascorbato puede reducir los iones Fe^{3+} a Fe^{2+} y, en presencia de H_2O_2 , puede estimular la formación de $\cdot OH$ por la reacción de Fenton. Este efecto **prooxidante** ha sido descrito en relación con la peroxidación de lípidos (Dasgupta y Zdunek, 1992), proteínas (Stadtman, 1991) y ADN (Toyokuni y Sagripanti, 1992) *in vitro*. El efecto global dependerá de la concentración de ascorbato presente y de la disponibilidad de metales libres en el medio. Concentraciones micromolares de ascorbato, junto con la presencia de iones hierro o cobre, presentan un efecto prooxidante, mientras que concentraciones milimolares, similares a las fisiológicas, muestran un efecto sobre la peroxidación de lípidos y proteínas fundamentalmente inhibitorio (Hunt *et al.*, 1992).

Por último, se ha sugerido un papel del ascorbato en la regeneración del α -tocoferol (Niki, 1991) y como estimulador de la función inmune (Bendich, 1990).

B. Liposolubles

B.1 α -Tocoferol (vitamina E)

La vitamina E fue descubierta en 1922 por Evans y Bishop. El término vitamina E se refiere a una familia de compuestos fenólicos estructuralmente relacionados, los tocoferoles y tocotrienoles. Los tocoferoles se diferencian únicamente en el número y posición de los grupos metilo del anillo aromático. El α -tocoferol es el más abundante y el más activo biológicamente de estos compuestos.

La vitamina E es el principal antioxidante en las membranas biológicas. Se trata de una molécula hidrofóbica, liposoluble, cuya estructura se muestra en la figura 1.4.

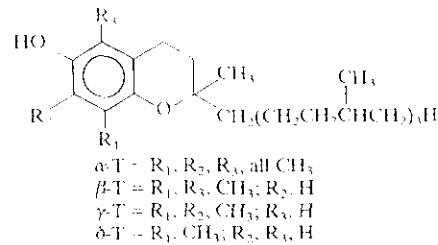


Figura I.4. Estructura de la vitamina E.

Es un componente esencial en la dieta de numerosos animales: su carencia da lugar a una amplia variedad de síntomas incluyendo esterilidad en los machos, hemolisis y degeneración muscular (Halliwell y Gutteridge, 1989b).

Por su carácter hidrofóbico tiende a concentrarse en el interior de las membranas, y su concentración es relativamente elevada en aquellas membranas que deben estar especialmente protegidas contra la peroxidación *in vivo* (membranas mitocondriales, membranas de los tilacoides de los cloroplastos y membranas del segmento externo de los bastones de la retina). El α -tocoferol también se encuentra en altas concentraciones en las lipoproteínas sanguíneas y en las glándulas adrenales, donde tanto corteza como médula son susceptibles al daño oxidativo por su alto contenido en enzimas oxidasas y catecolaminas.

La actividad del α -tocoferol suele atribuirse al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol. Reacciona con el radical $\cdot\text{OH}$ y lleva a cabo reacciones de extinción de O_2 singlete protegiendo a las membranas contra estas especies.

Sin embargo, su principal acción antioxidante en las membranas biológicas consiste en reaccionar con radicales peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) y alcóxido ($\text{LO}\cdot$), impidiendo la propagación de la cadena de reacciones de la **peroxidación lipídica**:



Durante su acción, el α -tocoferol es consumido y convertido en el **radical tocoferilo** (VitE-O \cdot), el cual no es lo suficientemente reactivo como para extraer H de los lípidos de membrana, porque el electrón desapareado del átomo de oxígeno, puede deslocalizarse dentro del anillo aromático de su estructura, incrementando su estabilidad (Burton e Ingold, 1986).

Sin embargo, existen mecanismos *in vivo* para reducir el radical tocoferilo a α -tocoferol. Se ha comprobado *in vitro* la existencia de un **sinergismo** funcional entre el ascorbato y el α -tocoferol (Niki *et al.*, 1985; Packer y Slater, 1979; Scarpa *et al.*, 1984). El ascorbato (AH \cdot) puede reducir al radical tocoferilo, lo que plantea la posibilidad de que ambas sustancias trabajen en tandem desde el punto de vista redox:



La interacción ocurriría en la interfase citosol-membrana (figura I.5), ya que el carácter polar de la molécula de ascorbato dificulta su entrada al interior hidrofóbico de las membranas.

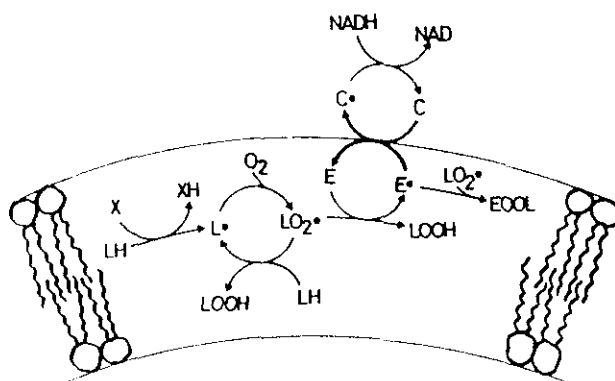


Figura I.5. Regeneración de la vitamina E por la vitamina C durante la oxidación de membranas (Niki, 1987).

Las interacciones entre el glutatión y las vitaminas C y E se ilustran en la figura I.6.

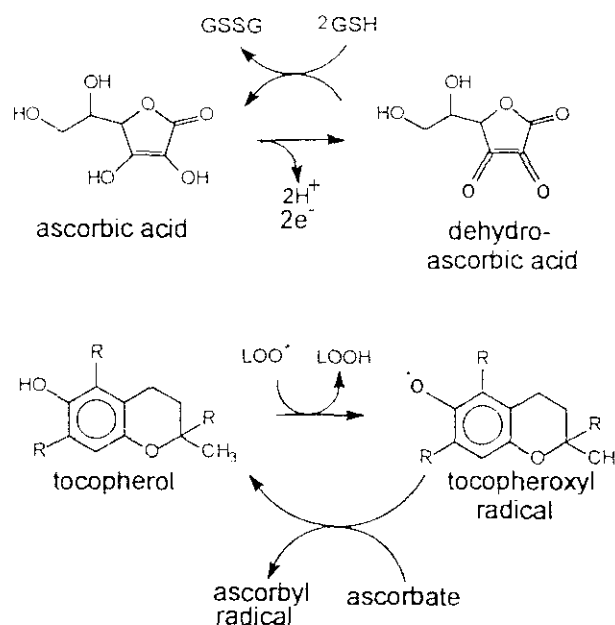


Figura I.6. Reciclado de las vitaminas antioxidantes C y E.

B.2 Carotenoides

Los carotenoides, que son constituyentes importantes de las membranas de los cloroplastos, tienen una gran capacidad para dar lugar a reacciones de extinción de O_2 singlete y, por consiguiente, protegen a la clorofila y a las membranas contra el daño oxidativo.

La iluminación de cepas mutantes de maíz, que no sintetizan carotenoides, bajo condiciones aerobias, da lugar rápidamente al blanqueamiento de clorofilas y a la destrucción de las membranas de los cloroplastos. La iluminación bajo condiciones anaerobias causa mucho menos daño, porque no se puede generar O_2 singlete.

Además, los carotenoides pueden absorber directamente la energía de las clorofilas excitadas impidiendo la formación de O_2 singlete. También pueden reaccionar directamente con radicales peroxilo y alcoxilo, interfiriendo con la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica.

Los carotenoides que contienen los cloroplastos son de dos tipos principales: **carotenos** (la estructura del β -caroteno se muestra en la figura I.7) y **xantofilas**, que son derivados de carotenos que contienen oxígeno.

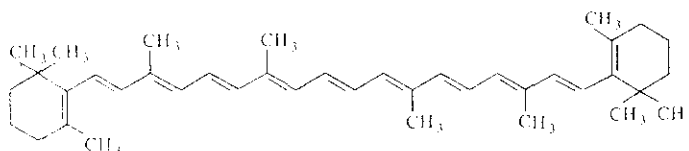


Figura I.7. Estructura del β -caroteno.

En los animales su concentración es mucho menor y su función antioxidante natural es menos clara. Dosis elevadas de β -caroteno disminuyen la fotosensibilidad de algunos pacientes con acumulación anormal de porfirinas. El β -caroteno puede actuar sinérgicamente con el α -tocoferol inhibiendo la peroxidación lipídica (Palozza y Krinsky, 1992). Se ha propuesto que una alta ingesta de β -caroteno puede proteger contra el desarrollo de cáncer (Byers y Perry, 1992).

3. ESTRÉS OXIDATIVO

Debido a que las defensas antioxidantes no son completamente eficientes, al aumentar la formación de radicales libres en el organismo se produce un aumento del daño oxidativo. El término **estrés oxidativo** (Sies, 1985) se refiere a este efecto (figura I.8). Si el estrés oxidativo es suave, los tejidos responden con un incremento de las defensas antioxidantes (Allen *et al.*, 1983; López-Torres *et al.*, 1993b). Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar daño celular y muerte.

Una manera de generar estrés oxidativo en los tejidos es mediante la acción de ciertas toxinas, algunas producen radicales libres y otras eliminan las defensas antioxidantes (Halliwell, 1994).

Algunas toxinas son radicales libres, por ejemplo el dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), un gas tóxico presente en el aire contaminado. Este compuesto puede iniciar el proceso de peroxidación lipídica. Otras toxinas se convierten en radicales libres al ser metabolizadas.

Este es el caso del tetracloruro de carbono (CCl_4) que se transforma en el radical $\text{CCl}_3\cdot$ en el hígado por la acción del citocromo P-450. El radical $\text{CCl}_3\cdot$ reacciona con O_2 y produce un radical peroxilo ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) el cual puede iniciar la peroxidación lipídica (Aust *et al.*, 1993).

Existen toxinas que eliminan las defensas antioxidantes. El paracetamol es metabolizado por el citocromo P-450 en el hígado, generando un producto que reacciona con el glutatión y lo elimina. La pérdida del glutatión produce estrés oxidativo, lo que contribuye al fallo hepático en caso de sobredosis de paracetamol. El 3-amino-1,2,4-triazol (AT) inhibe a la enzima catalasa uniéndose al complejo catalasa-peróxido (compuesto I) de forma irreversible (Geerts y Roels, 1982).

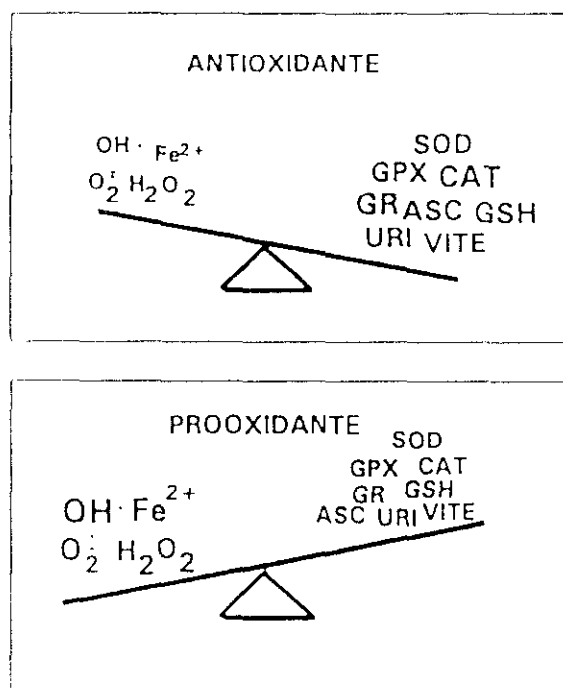


Figura I.8. Balance antioxidante-prooxidante. Un exceso de especies activas de oxígeno y metales de transición en relación con los antioxidantes produce estrés oxidativo. La situación contraria se observa en presencia de niveles relativamente altos de antioxidantes. SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GPX: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión; URI: ácido úrico; ASC: ascorbato; VITE: vitamina E (Barja, 1996).

La disminución del estrés oxidativo es teóricamente posible mediante el incremento de la capacidad antioxidante de los tejidos. En el hombre, el aumento de las enzimas antioxidantes endógenas o del glutatión (que se encuentra bajo control "feed-back" celular), no es una aproximación posible. El equilibrio antioxidante-prooxidante sólo es modulable en el hombre mediante antioxidantes exógenos vitamínicos, cuya ingestión en la dieta puede ser controlada de una manera sencilla y segura.

III. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los constituyentes esenciales de las membranas biológicas son los lípidos y las proteínas, estas últimas en una cantidad que aumenta a medida que lo hace el número de funciones que la membrana realiza.

Los lípidos de membrana son generalmente moléculas anfipáticas, que contienen regiones hidrocarbonadas con poca afinidad por el agua y regiones polares hidrofílicas. En las membranas de células animales los lípidos más abundantes son los fosfolípidos, siendo el más común la fosfatidilcolina. A diferencia de lo que ocurre en las membranas de los orgánulos subcelulares como la mitocondria, algunas membranas contienen cantidades significativas de esfingolípidos y de colesterol.

En las células animales, las cadenas laterales de los ácidos grasos de lípidos de membrana son cadenas hidrocarbonadas lineales que contienen un número par de átomos de carbono, generalmente entre 14 y 24, y los dobles enlaces poseen configuración *cis*.

A medida que el número de dobles enlaces en un ácido graso aumenta, su punto de fusión disminuye. Por ejemplo, el ácido esteárico (18:0) es sólido a temperatura ambiente, mientras que el ácido linoléico (18:2) es líquido. Los ácidos grasos con ninguno, uno o dos dobles enlaces son más resistentes al ataque oxidativo que los ácidos grasos poliinsaturados; sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados están presentes en muchas moléculas de fosfolípidos de membrana.

La **fluidéz** de las membranas es debida, en parte, a la presencia de cadenas laterales de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados en muchos lípidos de membrana, que reducen el punto de fusión del interior de la membrana. El daño a los ácidos grasos poliinsaturados tiende a reducir la fluidez de la membrana, característica esencial para el funcionamiento adecuado de las membranas biológicas.

1. PROCESO DE PEROXIDACIÓN

La peroxidación lipídica es un proceso autocatalítico mediado por radicales libres por el cual los ácidos grasos poliinsaturados forman hidroperóxidos lipídicos (Sevanian y Hochstein, 1985). Este proceso consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (figura I.9).

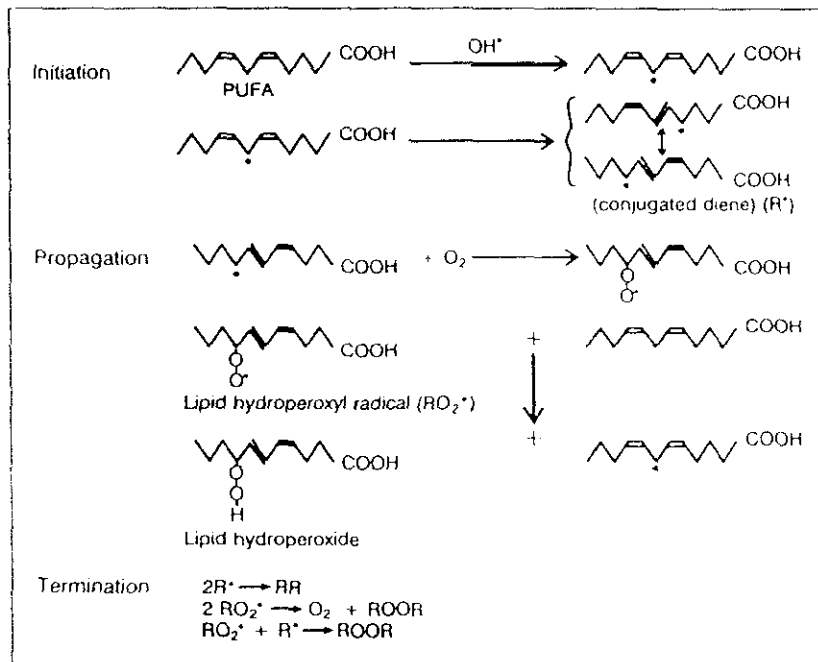
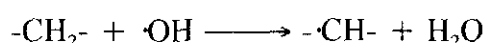


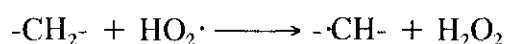
Figura I.9. Diferentes etapas en el proceso de peroxidación (Southorn, 1988).

A. Iniciación

La iniciación de una secuencia de peroxidación en una membrana o en un ácido graso poliinsaturado se produce por el ataque de cualquier especie suficientemente reactiva como para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-). El radical hidroxilo puede iniciar el proceso de peroxidación (Halliwell y Gutteridge, 1989b):

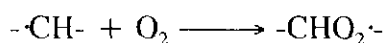


Sin embargo, el O₂^{·-} no es suficientemente reactivo como para abstraer H de los lípidos y además su carga negativa le impide acceder al interior hidrofóbico de las membranas. La forma protonada del radical superóxido, el HO₂[·], es más reactivo y puede extraer H de algunos ácidos grasos, aunque todavía no se ha demostrado su capacidad para iniciar la peroxidación en las membranas celulares:



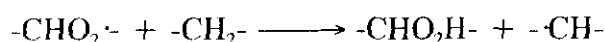
La abstracción de un H de un grupo metileno deja un electrón desapareado en el átomo de carbono (-·CH-). La presencia de un doble enlace en el ácido graso debilita el enlace C-H en el átomo de carbono adyacente al doble enlace y por lo tanto facilita la abstracción de H. El radical formado, tiende a ser estabilizado por un reordenamiento molecular para formar un **dieno conjugado**.

Los dienos conjugados pueden reaccionar de diversas maneras. Si dos de ellos entran en contacto dentro de la membrana, pueden formar enlaces cruzados entre las moléculas de ácidos grasos. También pueden reaccionar con otros componentes de la membrana como las proteínas. Sin embargo, con mayor frecuencia los dienos conjugados en condiciones aerobias reaccionan con O₂ dando lugar a la formación de **radicales peroxilo** LOO[·] (Halliwell y Gutteridge, 1989b):



B. Propagación

La formación de radicales peroxilo es de gran importancia debido a que son capaces de abstraer H de otra molécula lipídica, por ejemplo de un ácido graso adyacente.



Los autores utilizan el término de **estimulación** de la peroxidación lipídica para describir la abstracción continua de H por parte de los radicales peroxilo.

El nuevo radical formado puede reaccionar con O₂ para formar otro radical peroxilo y así la reacción en cadena de la peroxidación lipídica puede continuar. De esta manera, la iniciación de una secuencia de peroxidación puede dar lugar a que muchas moléculas de lípidos sean oxidadas a hidroperóxidos lipídicos (Niki, 1987).

La cantidad de radicales formados como respuesta a un determinado nivel de estrés oxidativo depende de la disponibilidad de ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos de membrana (North *et al.*, 1994).

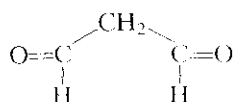
Los radicales peroxilo se combinan con el átomo de hidrógeno que abstraen dando lugar a un **hidroperóxido lipídico** LOOH. Los radicales peroxilo también pueden formar peróxidos cíclicos.

El oxígeno singlete puede reaccionar directamente con dobles enlaces carbono-carbono generando LOOH. Sin embargo, esta adición directa del O₂ singlete a los lípidos de membrana no causa la propagación del proceso de peroxidación, a menos que los LOOH sean descompuestos, por ejemplo mediante la acción de iones metálicos, formando radicales alcoxilo y peroxilo.

La abstracción inicial de H de un ácido graso poliinsaturado puede ocurrir en diferentes puntos de la cadena hidrocarbonada. Así, la peroxidación del ácido araquidónico da lugar a la formación de al menos seis hidroperóxidos lipídicos así como peróxidos cíclicos y otros productos como malondialdehído (MDA).

C. Terminación

El ciclo de propagación se rompe cuando tienen lugar reacciones de terminación, en las que los radicales libres son destruidos. La reacción de dos radicales contiguos, por ejemplo de tipo alquilo L·, da lugar a la formación de puentes cruzados (L-L) estables. Los peróxidos cíclicos formados en los ácidos grasos pueden fragmentarse en diversos productos como el MDA, cuya estructura se muestra a continuación:



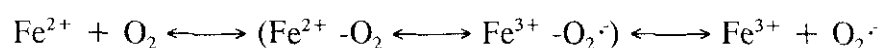
Las sustancias que eliminan radicales libres también contribuyen a la terminación del proceso de peroxidación.

Como consecuencia de la peroxidación lipídica, la membrana aumenta su viscosidad y disminuye su resistencia eléctrica, se facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas y las proteínas de membrana forman enlaces cruzados disminuyendo su movilidad lateral y rotacional (Richter, 1987).

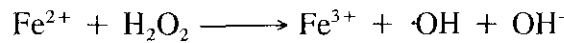
2. PAPEL DE LOS IONES METÁLICOS EN EL PROCESO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

En general, los metales de transición pueden cambiar su estado de oxidación debido a su valencia variable. Esto les permite participar en reacciones con otros radicales libres.

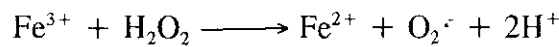
Los iones hierro pueden tomar parte en reacciones de transferencia de electrones con el oxígeno molecular:



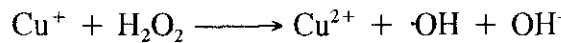
El ión Fe^{2+} puede reaccionar con H_2O_2 dando lugar a la formación de radicales hidroxilo en la **reacción de Fenton**:



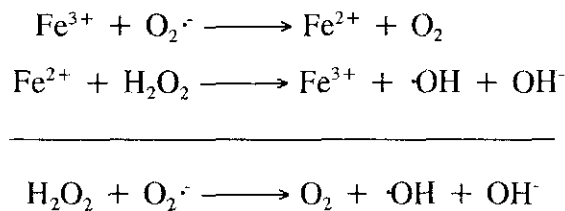
El ión Fe^{3+} también puede reaccionar con H_2O_2 , aunque esta reacción ocurre muy lentamente a pH fisiológico:



Los iones cobre también pueden reaccionar con H_2O_2 generando radicales hidroxilo:

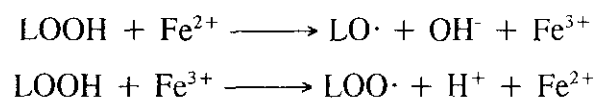


Debido a las bajas concentraciones de H_2O_2 y $\text{O}_2\cdot^-$ que existen *in vivo*, la **reacción de Haber-Weiss**, en la que el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno producen radicales hidroxilo, no puede ocurrir a no ser que sea catalizada por iones de transición:



El radical $\cdot\text{OH}$ formado puede iniciar el proceso de peroxidación.

Los hidroperóxidos lipídicos son estables a temperaturas fisiológicas, sin embargo, metales de transición como el hierro y el cobre, aceleran su descomposición:



Los radicales $\text{LO}\cdot$ y $\text{LOO}\cdot$ pueden abstraer H y estimular la peroxidación lipídica. Por esto, la eliminación de LOOH de las membranas es esencial para evitar la propagación

del proceso de peroxidación. La enzima GSH peroxidasa de membrana descrita por Ursini y colaboradores (1982) puede eliminar LOOH. La liberación de LOOH de la membrana mediante la fosfolipasa A₂ (Sevanian *et al.*, 1983), seguido por el metabolismo del grupo hidroperóxido mediante GSH peroxidasas citosólicas, constituye un mecanismo alternativo.

Los iones hierro unidos a proteínas como la transferrina, no pueden generar radicales ·OH a pH 7,4. Sin embargo, pueden producir estos radicales cuando las condiciones celulares provocan la liberación del hierro de las proteínas. Esto puede ocurrir en presencia de agentes quelantes como el ATP, el ADP y el citrato, a valores ácidos de pH, y también cuando se produce la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ mediante agentes reductores como el ácido ascórbico o el radical superóxido.

Los iones hierro que estaban unidos a la proteína, al ser liberados pueden reaccionar con H₂O₂ para formar el radical ·OH. Este último, por su alta reactividad puede atacar a componentes de la proteína cercanos a su lugar de formación. Así, la naturaleza química del daño celular producido por H₂O₂ podría depender de la localización específica de los iones metálicos que pueden generar ·OH a partir de H₂O₂.

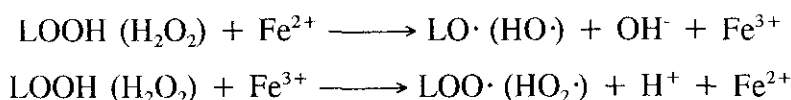
Algunos autores han observado que se produce peroxidación a pesar de que el H₂O₂ y el radical ·OH hayan sido eliminados, lo que ha llevado a postular que el propio hierro, en la forma de un complejo Fe²⁺-oxígeno-Fe³⁺, es el responsable de la iniciación de la peroxidación lipídica (Minotti y Aust, 1987). Sin embargo, este complejo no ha podido ser aislado ni caracterizado.

3. PROTECCIÓN FRENTE A LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los organismos aerobios están protegidos frente a la toxicidad del oxígeno mediante un conjunto de sistemas de defensa. Se pueden clasificar en dos categorías: los antioxidantes que reducen la tasa de iniciación y los que interrumpen la propagación del proceso de peroxidación lipídica (Niki, 1987).

Los antioxidantes que **reducen la tasa de iniciación** eliminan las especies activas y los posibles precursores de radicales libres. Por ejemplo, la descomposición de

hidroperóxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno por iones de metales de transición como el hierro y el cobre puede ser una vía importante de generación de radicales libres *in vivo*:



Las enzimas glutatión peroxidasa y catalasa descomponen hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno respectivamente, sin generar radicales libres y por lo tanto reducen su formación. Los compuestos que unen iones metálicos y reducen la tasa de las reacciones anteriores, también se consideran antioxidantes.

El oxígeno singlete oxida a los átomos de carbono que forman dobles enlaces generando hidroperóxidos lipídicos. Por consiguiente, el β -caroteno, que extingue al $^1\text{O}_2$, también reduce la tasa de iniciación.

Existen antioxidantes hidrosolubles y liposolubles que **interrumpen el proceso de propagación** de la peroxidación lipídica. Entre los primeros se encuentran el ácido ascórbico y el glutatión. El principal antioxidante liposoluble en células animales es la vitamina E, aunque existen otros como el β -caroteno, la bilirrubina y los estrógenos.

La unión de iones metálicos también constituye un mecanismo de protección frente a la peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 1989a). La transferrina y la ferritina, además de transportar y almacenar hierro, pueden considerarse defensas antioxidantes, ya que el hierro unido a proteínas no está disponible para estimular reacciones de radicales libres. Asimismo, el ácido úrico puede unir iones hierro y cobre *in vitro* evitando su participación en reacciones de radicales libres.

La mayoría del cobre plasmático está unido a la ceruloplasmina. Esta proteína tiene propiedades antioxidantes y es capaz de oxidar el Fe^{2+} a Fe^{3+} , menos reactivo, disminuyendo la producción de $\cdot\text{OH}$ dependiente de Fe^{2+} a partir de H_2O_2 y la peroxidación lipídica dependiente de Fe^{2+} . La pequeña cantidad de cobre plasmático no unido a ceruloplasmina está unido a histidina, péptidos pequeños y albúmina.

Los tres antioxidantes no enzimáticos principales, glutatión, ácido ascórbico y α -tocoferol, pueden actuar de manera complementaria frente a la peroxidación de lípidos insaturados de las membranas (figura I.10).

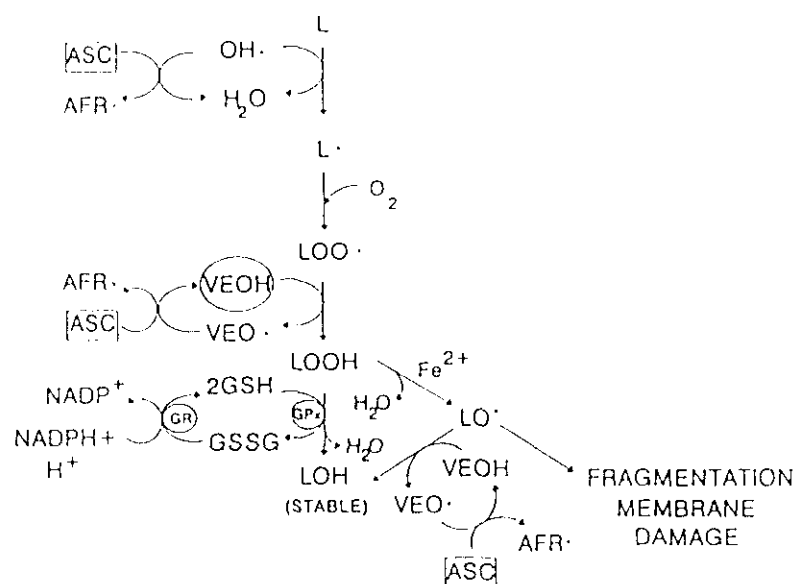


Figura I.10. Relación entre el glutatión y las vitaminas C y E durante la peroxidación lipídica. ASC: ascorbato; AFR·: radical del ascorbato; VEOH: vitamina E; VEO·: radical toferilo (Barja, 1996).

4. MEDIDA DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Las técnicas de cuantificación de la peroxidación lipídica son variadas. Los métodos utilizados más comunmente son: a) cromatografía gas-líquido de etano y pentano, b) absorbancia UV de dienos conjugados, c) cromatografía gas-líquido de ácidos grasos, d) colorimetría y fluorimetría de MDA tras la aplicación del test del ácido tiobarbitúrico (TBA) y e) determinación de diversos productos de peroxidación lipídica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La peroxidación de membranas genera pequeñas cantidades de MDA libre que pueden reaccionar en el test del TBA dando lugar a la formación de un producto coloreado. Además del MDA, otros compuestos relacionados (hidroperóxidos) o no (glucosa, ciertos aminoácidos) con la peroxidación lipídica, reaccionan con el TBA formando productos que absorben a longitudes de onda próximas a 535 nm (Halliwell y Gutteridge, 1989b).

Así, la medida espectrofotométrica a 535 nm (TBA *in vivo*) podría incluir las contribuciones de esas sustancias, aunque la medida fluorimétrica puede distinguir mejor esos productos del verdadero MDA.

La incubación en presencia de sistemas generadores de radicales (TBA *in vitro*) minimiza esas interferencias. En este caso, los resultados se interpretan como la sensibilidad de ese tejido a la peroxidación lipídica.

La cuantificación de productos de peroxidación lipídica mediante técnicas de HPLC presenta una alta sensibilidad y especificidad. La determinación de hidroperóxidos lipídicos proporciona información sobre los primeros estados de la peroxidación y la medida del MDA, sobre las etapas finales. Sin embargo, estos métodos tienen la limitación de que se detecta sólo uno de los muchos productos resultantes del proceso peroxidativo.

IV. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

El proceso de peroxidación lipídica ha recibido mucha atención, aunque también se producen ataques similares por parte de los radicales libres a las proteínas y a los ácidos nucleicos. Los productos de estas peroxidaciones se acumulan en proporciones menores, lo que ha dado lugar a que hayan pasado desapercibidos durante mucho tiempo. Sin embargo, estos procesos pueden ser de extrema importancia por el carácter cualitativo del daño y por la mayor dificultad de reparación del mismo, como ocurre en el caso del ADN.

Davies y colaboradores han realizado diversos estudios sobre el posible papel de las especies de oxígeno activo en el daño y degradación de proteínas, indicando una sensibilidad general de las proteínas a los radicales de oxígeno.

Las modificaciones inducidas por el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$ o por una combinación de $\cdot\text{OH} + \text{O}_2\cdot + \text{O}_2$, que refleja mejor la exposición biológica a los radicales de oxígeno, incluyen alteraciones del peso molecular (agregación o fragmentación), alteración de la carga eléctrica neta, pérdida de triptófano y producción del bifenol bitirosina.

Debido a que el radical $\text{O}_2\cdot$ no tiene efectos medibles en ninguno de estos parámetros, se ha propuesto que el radical $\cdot\text{OH}$ es la especie iniciadora de estas alteraciones, mientras que el O_2 y el $\text{O}_2\cdot$ parecen modificar significativamente el daño inducido por el radical $\cdot\text{OH}$ (Davies, 1987).

Estudios realizados en albúmina bovina indican que todos sus aminoácidos son susceptibles de modificación por $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OH} + \text{O}_2\cdot + \text{O}_2$, aunque el triptófano, la tirosina, la histidina y la cisteína son particularmente sensibles (Davies *et al.*, 1987).

El radical $\cdot\text{OH}$ puede modificar cualquier aspecto de la estructura primaria proteica. El O_2 y el $\text{O}_2\cdot$ pueden actuar transformando los productos iniciales de la reacción del $\cdot\text{OH}$ incrementando en el daño (pérdida de triptófano) o reparándolo (prevención de la formación de bitirosina).

El radical $\text{O}_2\cdot$ previene la formación de bitirosina mediante la reducción de radicales tirosilo, y por lo tanto inhibe la formación de agregados. Sin embargo, no puede deducirse que el $\text{O}_2\cdot$ es inofensivo. Primero, el $\text{O}_2\cdot$ reduce los puentes bisulfuro de la cisteína a grupos sulfidrilo, lo que provoca la desnaturalización de la proteína y su pérdida de función. Segundo, las proteínas que poseen grupos prostéticos hemo, con hierro-azufre o cobre, pueden sufrir daños más graves y permanentes cuando son expuestas a $\text{O}_2\cdot$ (Davies *et al.*, 1987).

Estas modificaciones oxidativas de la estructura primaria dan lugar a grandes alteraciones en las estructuras secundaria y terciaria (Davies y Delsignore, 1987). La exposición de albúmina bovina a $\cdot\text{OH}$ causa desnaturalización (desdoblamiento) de la proteína e incrementa su hidrofobicidad. A continuación tiene lugar la formación progresiva de enlaces covalentes cruzados que dan lugar a dímeros, trímeros y tetrámeros, parcialmente debido a la formación de bitirosina intermolecular.

La combinación de $\cdot\text{OH} + \text{O}_2 + \text{O}_2\cdot^-$ también causa desnaturalización. Sin embargo, a diferencia del $\cdot\text{OH}$, da lugar a la fragmentación espontánea de la albúmina bovina, produciendo nuevos grupos carbonilo sin aumentar los grupos amino libres. Este patrón general ha sido observado en una gran variedad de proteínas.

La fragmentación podría implicar la adición de O_2 a radicales inducidos por el $\cdot\text{OH}$ en el α -carbono de los aminoácidos, para formar radicales peroxilo cuya descomposición produciría la escisión de la cadena polipeptídica. El enlace peptídico permanecería intacto durante este proceso.

La exposición al radical $\text{O}_2\cdot^-$ no revela cambios medibles en la estructura de la proteína. El $\cdot\text{OH}$ es la especie responsable de la alteración de las estructuras secundaria y terciaria de la albúmina bovina. El O_2 y el $\text{O}_2\cdot^-$ modificarían posteriormente los productos de reacción del $\cdot\text{OH}$ (Davies y Delsignore, 1987).

La modificación oxidativa de la de la estructura proteica primaria, secundaria y terciaria está directamente relacionada con una susceptibilidad proteolítica incrementada.

Las proteínas desnaturalizadas representan un excelente sustrato para los sistemas proteolíticos celulares. La desnaturalización implica un desdoblamiento, lo cual incrementa la accesibilidad de las proteasas a los enlaces peptídicos. Así, el proceso de desnaturalización puede significar una señal universal para la degradación de proteínas oxidadas.

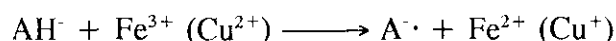
Las proteínas modificadas oxidativamente son degradadas rápida y selectivamente por sistemas proteolíticos intracelulares. En eritrocitos humanos y *E. coli*, la degradación parece llevarse a cabo mediante enzimas proteolíticas solubles, no lisosomales, e independientes de ATP (Davies, 1987).

Estas observaciones pueden tener importantes implicaciones en la regulación del "turnover" o recambio de proteínas en todos los organismos aerobios. Los mecanismos por los cuales los sistemas proteolíticos celulares reconocen las proteínas oxidativamente modificadas son todavía poco conocidos.

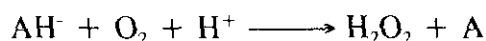
Algunos autores han descrito la existencia de un número de sistemas enzimáticos y no enzimáticos, a los que denominan sistemas oxidativos de función mixta (MFO) o sistemas de oxidación catalizada por iones metálicos (MCO), que son capaces de modificar oxidativamente a las proteínas (Oliver *et al.*, 1981; Fucci *et al.*, 1983; Stadtman, 1990). Los sistemas más relevantes fisiológicamente son la NADH y la NADPH oxidasas, la xantina oxidasa y las reductasas citocromo P-450, los cuales, en presencia de Fe^{3+} , O_2 y sus sustratos específicos donadores de electrones (NADH, NADPH, xantina) son capaces de catalizar la oxidación de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos de las proteínas.

Además, existen sistemas no enzimáticos que son capaces de catalizar la oxidación dependiente de O_2 de las proteínas, en presencia de Fe^{3+} y de donadores de electrones como el ascorbato (Stadtman, 1991).

La actividad prooxidante del ascorbato (AH) se debe a su capacidad de reducir los metales de transición, Fe^{3+} y Cu^{2+} , mediante la transferencia de un electrón, generando el radical semidehidroascorbato (A^{\cdot}):



El ascorbato también puede reducir al O_2 por transferencia de dos electrones produciendo peróxido de hidrógeno y dehidroascorbato (A):



Todos los sistemas MFO catalizan la reducción del O_2 a H_2O_2 , y del Fe^{3+} a Fe^{2+} , por vía dependiente o independiente de $\text{O}_2^{\cdot-}$. La producción de H_2O_2 y Fe^{2+} es la única función que tienen en común los sistemas MFO y que se requiere para la oxidación de proteínas (Stadtman *et al.*, 1992).

La oxidación de enzimas catalizada por MFO está acompañada por una pérdida de actividad catalítica y por la conversión de la enzima a una forma altamente susceptible a la degradación proteolítica, especialmente a la degradación por proteasas citosólicas neutras o alcalinas (Roseman y Levine, 1987).

Las reacciones de oxidación catalizadas por iones metálicos son de naturaleza sitio-específica. Las dianas más frecuentes de los sistemas MCO son los aminoácidos histidina, arginina, lisina, prolina y cisteína (Amici *et al.*, 1989) y también los centros de unión de hierro no hemínico de las proteínas (Turnbough y Switzer, 1975).

La oxidación de proteínas por los sistemas MFO proporciona un mecanismo general por el cual las proteínas son marcadas para su degradación (Oliver *et al.*, 1981).

Se ha observado que muchas de las enzimas que son fácilmente oxidadas por sistemas MFO se acumulan como formas inactivas o menos activas, y más termolábiles durante el envejecimiento (Stadtman *et al.*, 1992).

La oxidación de proteínas por sistemas MCO conduce a la conversión de las cadenas laterales de algunos aminoácidos en derivados carbonilo. Mediante la utilización de técnicas altamente sensibles para la medida del contenido en carbonilos de las proteínas, se ha encontrado que existe un incremento con la edad en el nivel de proteínas oxidadas.

El nivel de proteínas oxidadas en una célula depende de las tasas relativas de oxidación de proteínas y de degradación de proteínas oxidadas. Ambas tasas son funciones complejas de numerosos parámetros. La acumulación de proteínas oxidadas que ocurre con la edad es debida, en parte, a la pérdida de actividad proteasa (Starke-Reed y Oliver, 1989; Carney *et al.*, 1991).

La acumulación de proteínas oxidadas se ha asociado con la manifestación de disfunciones fisiológicas relacionadas con la edad, como la pérdida de agudeza de la memoria espacio-temporal. Estos cambios pueden ser revertidos mediante tratamiento crónico con agentes químicos terapéuticos (Carney *et al.*, 1991).

V. DAÑO OXIDATIVO AL ADN

La exposición de células a un estrés oxidativo implica la alteración de macromoléculas celulares como el ADN, el ARN, las enzimas, y proteínas y lípidos estructurales. Recientemente se ha dedicado mucha atención al ADN debido a su papel central en la transferencia de información entre generaciones de células somáticas (Saul *et al.*, 1987).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales el estrés oxidativo podría dañar al ADN (Halliwell y Aruoma, 1991). De acuerdo con el primero de ellos, es posible que el daño sea debido a la **formación del radical ·OH**. El H₂O₂, que cruza fácilmente las membranas biológicas, puede penetrar en el núcleo y reaccionar con iones hierro o cobre para formar ·OH. Debido a la alta reactividad del ·OH y a su incapacidad para difundir distancias significativas dentro de la célula, este mecanismo sólo es posible si el ·OH fuera generado a partir del H₂O₂ por reacción con iones metálicos unidos al ADN o muy próximos a este.

Una posibilidad es que estos iones metálicos estuvieran siempre presentes unidos al ADN *in vivo*. Por ejemplo, se cree que existen iones cobre presentes en los cromosomas. Otra posibilidad es que los iones metálicos fueran liberados dentro de las células como resultado del estrés oxidativo. Así, el estrés oxidativo aumentaría los niveles intracelulares de los iones hierro y cobre libres, que podrían unirse al ADN convirtiéndolo en diana del daño oxidativo.

Una segunda explicación de la capacidad del estrés oxidativo de causar daño al ADN es que el estrés oxidativo da lugar a una serie de procesos metabólicos dentro de la célula que conducen a la **activación de enzimas nucleasas**, las cuales cortan la estructura del ADN. El estrés oxidativo causa aumentos en el Ca²⁺ libre intracelular, el cual puede activar endonucleasas dependientes de Ca²⁺ que fragmentarían el ADN.

Estos dos mecanismos (daño al ADN por el radical ·OH y por la activación de nucleasas) no son excluyentes, sino que ambos pueden tener lugar. Su importancia relativa depende del tipo de células utilizado y de la manera en que se produce el estrés oxidativo (Halliwell y Aruoma, 1991).

El estrés oxidativo, generado mediante una gran variedad de mecanismos, produce efectos mutagénicos en bacterias y diversos tipos celulares de mamíferos. Los cambios químicos que se producen en el ADN pueden conducir al desarrollo de cáncer, aunque las relaciones precisas no se conocen todavía (Floyd, 1990).

La especies reactivas del oxígeno producen una serie de modificaciones químicas en el ADN. El radical $O_2\cdot^-$ y el H_2O_2 no reaccionan con el ADN a menos que estén presentes iones metálicos para permitir la formación de $\cdot OH$. Sin embargo, el radical $\cdot OH$ es tan reactivo que puede atacar a todos los componentes del ADN (Cadet y Teoule, 1978; Hutchinson, 1985; Dizdaroglu, 1991).

El radical $\cdot OH$ puede extraer átomos de hidrógeno de la desoxirribosa, dando lugar a un radical derivado del azúcar, que puede fragmentarse de diversas maneras. También puede reaccionar conduciendo a la liberación de bases púricas o pirimidínicas del ADN (produciendo sitios abásicos), y a la rotura de las hebras.

Se han caracterizado cambios químicos en las bases que constituyen las cadenas polinucleotídicas, que dan lugar a bases modificadas (Kasai *et al.*, 1986) como son la 8-hidroxi guanina, la 8-hidroxi adenina y la timina glicol. La figura I.11 muestra algunos de estos productos.

En la orina de humanos y otros mamíferos se han detectado nucleósidos y bases modificadas del ADN (Ames, 1989b; Shigenaga *et al.*, 1991). A diferencia de las bases modificadas, sus nucleósidos respectivos pueden ser utilizados como **biomarcadores** de daño oxidativo al ADN ya que no son absorbidos a través del tracto digestivo a partir de la dieta (Cathcart *et al.*, 1984).

Mediante técnicas de HPLC con detección electroquímica de alta sensibilidad y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se han detectado diversos productos generados por el daño oxidativo al ADN (Dizdaroglu, 1991; Floyd *et al.*, 1986; Shigenaga y Ames, 1991).

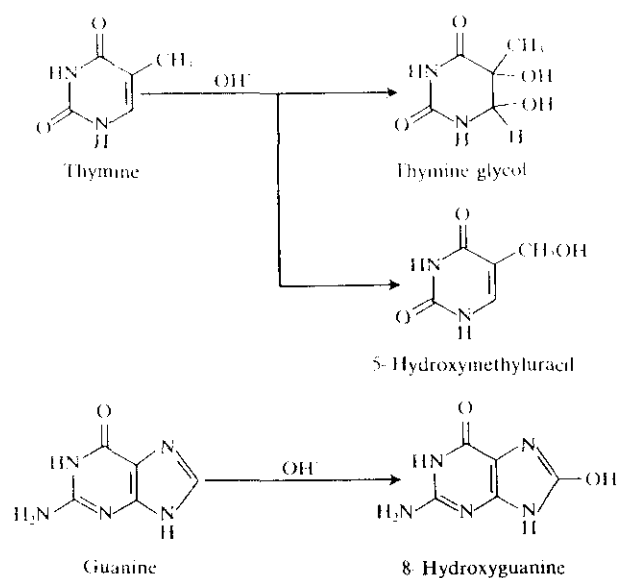


Figura I.11. Estructura de algunos productos formados por la reacción del radical hidroxilo con las bases del ADN.

La exposición de células completas o cromatina aislada a radiación ionizante, puede dar lugar a la aparición de enlaces cruzados entre bases del ADN y aminoácidos de proteínas nucleares. Así, se han identificado enlaces timina-tirosina, timina-aminoácidos alifáticos y citosina-tirosina en la cromatina de timo de ternera sometida a radiación (Gajewski *et al.*, 1990).

Algunas de estas modificaciones pueden tener efectos mutagénicos *in vivo* por la inducción de errores en la lectura de las bases modificadas o de las adyacentes (Kuchino *et al.*, 1987). La fragmentación de los anillos de las bases puede incluso bloquear la replicación del ADN (Halliwell y Aruoma, 1991).

El oxígeno singlete es capaz de producir rotura limitada de las hebras de ADN aislado y su capacidad para modificar las bases del ADN también es limitada, modificando preferencialmente la guanina mediante hidroxilación en C8 (Epe, 1991).

Los lípidos en proceso de peroxidación producen una serie de especies reactivas de oxígeno como $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , oxígeno singlete, radicales peroxilo y alcoxilo, que son capaces de dañar al ADN, aunque la contribución exacta de cada una de ellas se desconoce (Park y

Floyd, 1992; Fraga y Tappel, 1988; Hruszkewycz, 1988). Los peróxidos lipídicos también se descomponen para dar numerosos productos, incluyendo compuestos carbonilos como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-*trans* nonenal, que muestran efectos mutagénicos en células de mamíferos (Halliwell y Aruoma, 1991).

Para limitar los niveles de especies reactivas del oxígeno y el daño que inducen, han evolucionado numerosos mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos dentro de las células. En el caso del ataque de estas especies contra las moléculas de ADN nuclear, las células de mamíferos poseen otros tres mecanismos más de defensa (Saul *et al.*, 1987).

Primero, el ADN nuclear está compartimentalizado en el núcleo, alejado de las mitocondrias y los peroxisomas donde se generan la mayoría de los radicales. Segundo, la mayor parte del ADN (cuando no se está replicando) está rodeado por histonas, las cuales pueden protegerle contra los radicales. Finalmente, la mayoría de los tipos de daño producidos en el ADN pueden ser reparados por eficientes sistemas enzimáticos.

Los sistemas de reparación eliminan al menos algunas de las lesiones del ADN que resultan del ataque del radical $\cdot\text{OH}$ y otras especies reactivas de oxígeno. Las roturas en hebras simples son reparadas rápidamente. La 8-hidroxiguanina es eliminada lentamente del ADN celular (Breimer, 1984).

Otras lesiones, incluyendo la formación de timina glicol, pueden ser eliminadas de las células humanas por acción de una enzima **ADN glicosilasa** que corta el enlace base desoxirribosa produciendo un sitio abásico. Este sitio es reconocido por la actividad **endonucleasa**, en la misma enzima, que elimina la zona dañada. A continuación, se resintetiza el ADN y la hebra es unida de nuevo mediante una enzima **ADN ligasa**.

Una lesión concreta puede ser eliminada a través de diferentes vías de reparación. La participación de una vía determinada depende de la competitividad cinética entre ellas y de la extensión en la que están empleadas en corregir otras lesiones de la misma célula (Ramotar y Demple, 1993).

La tasa metabólica y la ingesta de calorías en la dieta pueden alterar la tasa de daño al ADN. El daño oxidativo al ADN podría descender mediante la disminución de la tasa metabólica o la reducción de la ingesta de calorías (Simic, 1992).

A pesar de los mecanismos de reparación enzimáticos y las demás defensas, el daño continuo al ADN puede alterar progresivamente la secuencia genómica (Shibutani *et al.*, 1991). La acumulación del daño puede contribuir al desarrollo de enfermedades como el cáncer (por activación de oncogenes o inactivación de genes supresores) y al envejecimiento (Simic, 1992).

Experimentos realizados en diversas especies indican la existencia de una correlación lineal entre la tasa metabólica específica y la excreción de productos de reparación de modificaciones oxidativas del ADN como la 8-OHdG y la timina glicol (Adelman *et al.*, 1988; Shigenaga *et al.*, 1989; Loft *et al.*, 1993; Loft *et al.*, 1994). Se ha observado un aumento en los niveles de 8-OHdG con la edad según algunos autores (Fraga *et al.*, 1990; Rattan *et al.*, 1995), pero no según otros (Kasai *et al.*, 1995).

Algunos autores han propuesto que el envejecimiento en células postmitóticas resulta del ataque de los radicales libres al ADN mitocondrial (Fleming *et al.*, 1982), el cual es particularmente vulnerable al ataque por radicales libres debido a que la mitocondria es la principal fuente de producción de radicales libres y a que algunas de las defensas y mecanismos de reparación del ADN presentes en el núcleo pueden ser menos efectivos, o inexistentes, en la mitocondria (Richter *et al.*, 1988). Recientemente se ha descrito un aumento de 8-OHdG con la edad en corazón humano (Ozawa, 1995) y en varios órganos de ratas y ratones (Asunción *et al.*, 1996).

El daño al ADN mitocondrial transformaría la mitocondria de un estado de división a un estado de no división y la haría más vulnerable al daño progresivo de la membrana. Esta teoría explica la disminución en la cantidad de mitocondrias funcionalmente intactas relacionada con la edad, lo cual podría contribuir a un deterioro de las funciones celulares por disminución de la producción de ATP y la síntesis de proteínas dependiente de energía.

VI. SHOCK ENDOTÓXICO Y RADICALES LIBRES

1. ENDOTOXINAS BACTERIANAS

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas se compone de proteínas, fosfolípidos y **lipopolisacáridos** (LPS). Estos últimos, que se disponen exclusivamente en la cara exterior de la membrana externa y son su principal constituyente, participan en diversas funciones y son indispensables para el ensamblaje e integridad de la pared bacteriana.

La presencia de moléculas de LPS juega un papel importante en la interacción de las bacterias Gram-negativas con los organismos superiores, y constituye el punto de reconocimiento de dichos organismos por el sistema inmune.

Tras la fagocitosis y lisis bacteriana (o cuando la bacteria se multiplica), los lipopolisacáridos liberados e introducidos en el torrente circulatorio, son capaces de inducir un shock circulatorio profundo denominado **shock endotóxico** o séptico; de ahí que esta sustancia tóxica y termoestable fuese denominada **endotoxina**, para diferenciarla de las **exotoxinas** que son proteínas segregadas activamente por las bacterias y que se inactivan por calor (Westphal *et al.*, 1986).

El LPS de las enterobacterias está constituido por un polisacárido (cadena O-específica u O-antigénica) que es la parte más externa de la molécula, responsable de la reacción inmunespecífica y está unido a un núcleo de oligosacárido (core) el cual a su vez está unido covalentemente mediante enlace cetosídico a una porción lipídica denominada lípido A. Las propiedades tóxicas del LPS residen principalmente en el lípido A (Galanos *et al.*, 1977).

Debido a su naturaleza anfipática, las moléculas de LPS se agregan y forman estructuras complejas en solución acuosa. Mediante la técnica de criofractura, que permite una mejor preservación de las muestras biológicas e introduce menos artefactos que la tinción negativa, se ha observado que los agregados de LPS son principalmente esféricos o elípticos y de tamaño más bien homogéneo (Risco *et al.*, 1993).

2. SHOCK ENDOTÓXICO

El término shock endotóxico, shock séptico o septicemia designa un estado de disfunción metabólico-circulatorio grave producido por la liberación en el torrente circulatorio del organismo de endotoxinas bacterianas (Berry, 1977) o subsiguiente a la administración experimental de endotoxinas aisladas (Weil *et al.*, 1956).

Los lipopolisacáridos permanecen inactivos si no se liberan de la superficie bacteriana, lo cual ocurre durante períodos de crecimiento activo y durante la lisis bacteriana tras la fagocitosis por macrófagos o la terapia con antibióticos.

El shock endotóxico inducido por las endotoxinas o lipopolisacáridos es un fenómeno sistémico que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, fallo respiratorio agudo, fallo orgánico generalizado y en último término la muerte (French *et al.*, 1994).

La activación de las células fagocíticas mononucleares (monocitos, células de Kupffer, macrófagos peritoneales y otros macrófagos tisulares) es una de las respuestas más tempranas frente a la intoxicación por LPS. Como consecuencia de esta activación, los macrófagos liberan una serie de **mediadores inflamatorios** como las citoquinas, metabolitos del ácido araquidónico, enzimas lisosomales y radicales libres de oxígeno. Estos mediadores ayudan a proporcionar una homeostasis metabólica óptima para las defensas sistémicas del huésped.

Así, cuando una bacteria invade un tejido y libera cantidades moderadas de endotoxina, éstas son reconocidas por el organismo y el conjunto de mediadores liberados por los macrófagos facilita la eliminación de la infección, generando una respuesta inmunitaria local y controlada. Cuando la infección se agrava, y se liberan grandes cantidades de endotoxina al torrente circulatorio, se produce una activación de macrófagos general e incontrolada en todo el organismo, con la consecuente liberación de cantidades elevadas de mediadores inflamatorios (factor de necrosis tumoral, interleuquina-1 e interleuquina-6, principalmente), que se vierten a la circulación general para ejercer efectos sistémicos que colectivamente constituyen el síndrome del shock séptico.

Durante el shock endotóxico tienen lugar una serie de alteraciones en los parámetros plasmáticos (Cowley *et al.*, 1969; Hinshaw *et al.*, 1977; Traber, 1985) y se produce daño en la estructura de varios órganos diana internos como las glándulas adrenales, el corazón, el hígado (McGovern, 1982) y los pulmones (Clowes *et al.*, 1974).

En la instauración y progresión de este tipo de shock se pueden distinguir dos fases, considerando tanto las características cardiovasculares como las metabólicas: una fase inicial compensadora o **shock hiperdinámico**, con elevación de la potencia cardíaca y aumento de la resistencia vascular, movilización de sustratos metabólicos, hiperglucemia y aumento de la concentración de ácidos grasos libres; y una fase final, descompensadora o **shock hipodinámico** con disminución de la potencia cardíaca y aumento de la resistencia vascular (Hinshaw, 1985).

Si el proceso continúa, se agotan las reservas de glucógeno y aparece una marcada hipoglucemia como consecuencia de un consumo acelerado de glucosa por los tejidos periféricos y de la inhibición de la gluconeogénesis hepática; también se produce hipoxia, como consecuencia de la cual y de la hipoperfusión tisular se desarrolla una acidosis metabólica que refleja un metabolismo anaerobio celular que da lugar a la producción de lactato.

La alteración de los parámetros plasmáticos que ocurre en ratas sometidas a shock endotóxico reversible se muestra en la figura I.12 (García *et al.*, 1990). El shock endotóxico reversible se caracteriza por la presencia de una fase aguda (2-4 horas) y una fase de recuperación. Los niveles de glucosa plasmática aumentan inicialmente de una manera rápida y transitoria, que revierte a hipoglucemia a las 2 h. Esta hipoglucemia es más pronunciada 6 h después de la inyección de endotoxina de *E. coli* y retorna progresivamente a los niveles normales.

La actividad aspartato aminotransferasa (GOT) aumenta notablemente a las 2 h, alcanzando sus valores máximos a las 6 h. Seguidamente, los niveles de GOT disminuyen hasta sus niveles normales a las 72 h. La concentración plasmática de albúmina disminuye progresivamente en los animales tratados durante al menos 72 h tras la intoxicación, lo que indica un proceso de shock. Este descenso puede ser explicado por una disminución de su

síntesis (Koj *et al.*, 1985) o por un incremento en la permeabilidad de los capilares que conduce a la extravasación de la proteína (Traber, 1985).

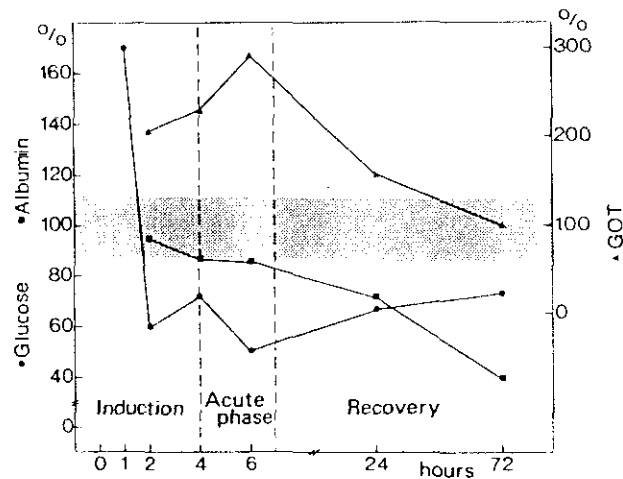


Figura I.12. Variación temporal de parámetros plasmáticos durante el shock endotóxico reversible *in vivo* (García *et al.*, 1990).

Las principales alteraciones macroscópicas aparecen en las glándulas adrenales, cuyo peso aumenta progresivamente desde las 6 hasta las 24 h tras la inyección de endotoxina y, aunque disminuye con el tiempo, permanece por encima de los niveles basales.

Los cambios histológicos que se producen en las glándulas adrenales, el hígado y los pulmones, se pueden observar ya a las 4 h de la administración de la endotoxina. El órgano más afectado es el hígado, que presenta coagulación intravascular diseminada y degeneración celular alrededor de las venas centrales, mientras que las áreas periportales permanecen inalteradas. A las 6 h, las áreas afectadas muestran también un aumento del retículo endoplásmico rugoso, lo que puede explicarse por alta actividad de síntesis de proteínas durante la fase aguda del shock.

Algunos estudios *in vitro* han demostrado una acción directa del LPS sobre diferentes tipos de células aisladas de rata, modificando la propiedades y funcionalidad de la membrana (Aracil *et al.*, 1985; García *et al.*, 1985; Portolés *et al.*, 1987). Sin embargo, las alteraciones observadas *in vivo* pueden ser mejor explicadas mediante la liberación de algunos mediadores

endógenos (Bosch *et al.*, 1988). También se ha descrito un descenso en los niveles de citocromo P-450 en glándulas adrenales, hígado y pulmón de animales tratados con LPS (Bosch *et al.*, 1988).

Estudios realizados *in vitro* en pneumocitos tipo II, que son las células pulmonares implicadas en la síntesis y secreción del surfactante pulmonar (Dobbs *et al.*, 1982), que el LPS forma agregados en el citoplasma y se observa en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico y puede eventualmente entrar en el núcleo, donde se acumula tras tiempos de incubación largos (Risco *et al.*, 1991).

3. IMPLICACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES EN EL SHOCK ENDOTÓXICO

El shock endotóxico está asociado con un aumento del estrés oxidativo y el daño celular subsiguiente (Kunimoto *et al.*, 1987; Ohtake y Ogawa, 1984; Sakaguchi *et al.*, 1991). La patogénesis que tiene lugar durante el shock endotóxico está relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (Arthur *et al.*, 1985; Flohé y Giertz, 1987; Yoshikawa, 1990).

Los radicales libres de oxígeno son generados principalmente por las **células fagocíticas** activadas y producen daño tisular durante el proceso endotóxico (Pilaro y Laskin, 1986). Aunque la liberación de estos compuestos está asociada con mecanismos antimicrobianos, también pueden llegar a resultar tóxicos para los tejidos, puesto que inician la **peroxidación lipídica** (Bautista *et al.*, 1990; Fantone y Ward, 1982; Freeman y Crapo, 1982; Portolés *et al.*, 1993) e inducen modificaciones irreversibles en la estructura y función de la membrana celular (Sakaguchi *et al.*, 1991). Estas alteraciones incluyen cambios en la organización de los lípidos de membrana, fluidez y permeabilidad al Ca^{2+} (Comporti, 1985).

Recientemente se ha observado que, tras la incubación con LPS, se produce un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en las células hepáticas endoteliales y de Kupffer, y un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno en estas últimas células (Portolés *et al.*, 1994).

Los neutrófilos contienen la enzima mieloperoxidasa, que cataliza la oxidación de

iones halógenos utilizando peróxido de hidrógeno (Weiss, 1989). Los resultantes ácidos hipohalogenados (principalmente **hipoclorito**) son poderosos agentes oxidantes que reaccionan con numerosas moléculas biológicas produciendo alteraciones similares a las que pueden producir los radicales libres.

Se ha sugerido que la inducción de la peroxidación lipídica puede producir la inactivación del citocromo P-450 (Plaa y Witson, 1976; Wang y Kimura, 1976). Por otra parte, la actividad metabólica del citocromo P-450 es capaz de generar radicales libres a partir del oxígeno molecular (O'Brien, 1978).

Diversos estudios han demostrado que antioxidantes como la superóxido dismutasa (Koyama *et al.*, 1992), la catalasa (Milligan *et al.*, 1988; Seekamp *et al.*, 1988), el ácido ascórbico (Dwenger *et al.*, 1994), la dimetilurea (Olson *et al.*, 1987) y la N-acetilcisteína (Bernard *et al.*, 1984) atenúan el daño pulmonar causado por la endotoxina. Estas observaciones confirman el importante papel de las especies reactivas del oxígeno en el daño producido por la endotoxina.

VII. VITAMINAS ANTIOXIDANTES Y ENFERMEDADES DEGENERATIVAS EN HUMANOS

La implicación de los radicales libres de oxígeno en estados patológicos tiene lugar en situaciones en las que el estrés oxidativo celular (el balance entre factores prooxidantes y antioxidantes) se descontrola. Esto puede suceder como consecuencia de un aumento en la producción de radicales de oxígeno, un descenso de los antioxidantes, o un aumento en la cantidad de macromoléculas especialmente susceptibles al daño oxidativo (Barja, 1993).

Los radicales libres están claramente implicados en el desarrollo de diversos estados patológicos tales como el daño producido al perfundir tejidos isquémicos (McCord, 1985) o en procesos inflamatorios (Flohé, 1988). También se sospecha su implicación en otras enfermedades degenerativas como el cáncer (Cerutti, 1985; Bandy y Davison, 1990), la arterioesclerosis (Steinbrecher *et al.*, 1990) y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Adams y Odunze, 1991).

Durante los últimos años se han realizado numerosos **estudios epidemiológicos** sobre la posible relación entre los antioxidantes naturales presentes en la dieta y enfermedades degenerativas como el cáncer y la arterioesclerosis.

En cuanto a la **vitamina C**, en un estudio de casos-controles realizado en Utah en 672 individuos se ha observado una relación inversa entre la ingesta diaria de vitamina C y el desarrollo de cáncer de cuello uterino (Slattery *et al.*, 1990).

Una revisión reciente que incluye 17 estudios epidemiológicos independientes realizados a partir de 1987, describe, en 11 de los 17 estudios, un riesgo mayor de desarrollo de cáncer en individuos pertenecientes al cuarto o al tercio de menor ingesta de vitamina C, incluyendo cáncer de pulmón, mama, cuello uterino, ovario, páncreas, piel, colon, recto y estómago (Byers y Perry, 1992).

En otra revisión que incluye 90 estudios epidemiológicos, se ha observado una clara asociación negativa entre la ingesta de vitamina C en humanos y la incidencia de cáncer de esófago, estómago, cavidad oral y páncreas (Block, 1991) y también evidencia de su efecto protector frente al cáncer de cuello uterino, recto, mama, y pulmón.

El efecto sobre los cánceres relacionados con el tracto gastrointestinal puede ser debido a la capacidad del ácido ascórbico de inhibir la formación de nitrosaminas intragástricas (O'Connor, 1985) además de a sus propiedades antioxidantes.

Los resultados de los estudios epidemiológicos sugieren, en conjunto, un efecto positivo de la vitamina C en la prevención frente a diversos cánceres, y esto coincide con los estudios de cánceres inducidos en animales de laboratorio. Sin embargo, los estudios epidemiológicos no pueden demostrar una relación causa-efecto. Esto ha aumentado el interés sobre los **estudios prospectivos longitudinales**.

Un total de 11.580 ancianos que no padecían cáncer inicialmente, fueron estudiados durante 8 años y se observó una relación inversa entre la ingesta de vitamina C y la incidencia de cáncer de vejiga en hombres y de colon en mujeres (Shibata *et al.*, 1992).

En un estudio de 12 años de duración, realizado en Basilea (Suiza) con 2.974 participantes, se observó un efecto protector de la ingesta de vitamina C frente al cáncer de estómago y gastrointestinal (Eichholzer *et al.*, 1992).

Un estudio prospectivo más reciente, llevado a cabo en 29.584 adultos en Linxian, China, muestra el efecto protector frente a la muerte causada por cáncer tras 5 años de suplementación con vitamina E, β -caroteno y selenio pero no con vitamina C y molibdeno (Blot *et al.*, 1993). No resulta fácil obtener conclusiones directas de este estudio debido a la utilización de suplementos combinados en lugar de un sólo antioxidante.

Existe una situación similar a la del cáncer, respecto a la vitamina C, y la otra causa principal de muerte en los países industrializados, las enfermedades cardiovasculares. Una revisión de diferentes estudios en animales y humanos, sugiere una disminución del riesgo producida por la vitamina C y otros antioxidantes (Gaziano *et al.*, 1992). Otra revisión que incluye 37 estudios en humanos sugiere que existe una asociación entre la ingesta de vitamina C y la protección frente a las enfermedades cardiovasculares (Simon, 1992).

Los resultados de dos estudios realizados en la Universidad de Harvard, sugieren que la suplementación con vitamina E reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares tanto en mujeres (Stampfer *et al.*, 1993) como en hombres (Rimm *et al.*, 1993). En ambos estudios, derivados de dos grandes investigaciones epidemiológicas, se observó el efecto protector de la vitamina E en individuos suplementados con más de 100 IU de vitamina E diarias. Dosis superiores a 400 IU diarias no produjeron una mayor reducción del riesgo.

Entre los posibles mecanismos protectores de la vitamina C frente a las enfermedades cardiovasculares se encuentra la inhibición de la oxidación de lipoproteínas (Rifici y Khachadurian, 1993), la regulación de los niveles de colesterol (Jacques, 1992; Simon, 1992) y el descenso de la presión sanguínea (Jacques, 1992; Simon, 1992).

En el estudio longitudinal de Basilea, se ha observado una mayor incidencia de cardiopatía isquémica, infarto y accidentes cerebrovasculares en individuos con una concentración plasmática baja de β -caroteno y vitamina C (Eichholzer *et al.*, 1992). Actualmente se considera que el riesgo de cardiopatía isquémica disminuye cuando las

concentraciones plasmáticas de vitamina C en humanos son mayores de 50 μM (Gey *et al.*, 1993).

Las vitamina C también puede resultar beneficiosa en las cataratas, la principal causa de ceguera en las poblaciones occidentales (Rosenberg, 1994). La suplementación con vitamina C aumenta los niveles de ascorbato en el cristalino (Taylor *et al.*, 1991) e incrementa la resistencia de las proteínas y de las enzimas proteolíticas del cristalino al estrés fotooxidativo *in vitro* (Davies, 1990).

Epidemiológicamente, el riesgo de desarrollar cataratas aumenta cuatro veces en individuos con una ingesta o unos niveles plasmáticos de vitamina C bajos (Taylor *et al.*, 1992) aunque otros estudios no han encontrado ninguna relación entre la incidencia de cataratas y los niveles plasmáticos de antioxidantes (Wong *et al.*, 1993).

Se ha observado una incidencia menor de cataratas en individuos suplementados con vitamina C en un estudio prospectivo realizado con 50.000 enfermeras durante 4 años (Hankinson, 1992).

La vitamina C también puede ser beneficiosa en relación con otras patologías como la diabetes (Sinclair *et al.*, 1992), la enfermedad de Parkinson (Rabey y Hefti, 1990) y otras enfermedades relacionadas con la edad (Ames *et al.*, 1993)

Diversas revisiones muestran la importancia de la vitamina C en relación con el funcionamiento óptimo del sistema inmune (Bendich, 1990; Rosenberg, 1994) y la resistencia a las infecciones (Hemilä, 1992).

En relación con la **vitamina E**, también se han realizado un gran número de estudios para clarificar su posible efecto protector frente al cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

En el estudio de Basilea se ha observado una relación inversa entre los niveles plasmáticos de vitamina E y la incidencia de cánceres de pulmón, estómago y colon (Stähelin *et al.*, 1984).

En un estudio realizado en 5.004 mujeres del Reino Unido, se observó un riesgo 5 veces menor de incidencia de cáncer de mama en las mujeres que presentaban niveles plasmáticos de vitamina E elevados (Wald *et al.*, 1984).

En un estudio casos-contróles realizado en mujeres y hombres no fumadores de Nueva York, se observó una disminución en la incidencia de cáncer de pulmón en individuos que tomaban suplementos de vitamina E (Mayne *et al.*, 1994).

También se ha observado un riesgo menor de cáncer oral en individuos que tomaban suplementos de vitamina E, aunque los complejos multivitamínicos y la vitamina E de la dieta no mostraron ningún efecto significativo. Estos resultados se obtuvieron en un estudio casos-contróles realizado en Nueva Jersey, Georgia y California (Gridley *et al.*, 1992).

La utilización de suplementos de vitamina E disminuyó en un 84% el riesgo de cáncer de colon en mujeres de Iowa entre 55 y 59 años, en un 63% entre 60 y 64 años, y ningún efecto entre 65 y 69 años (Bostick *et al.*, 1993).

En un estudio llevado a cabo en Finlandia, se detectó una incidencia mayor de cáncer en los individuos pertenecientes al tercio de menor ingesta de selenio y α -tocoferol (Salonen *et al.*, 1985). También en Finlandia, se ha observado un riesgo menor de incidencia de cáncer en estudios realizados en 15.093 mujeres (Knekt, 1988) y en 21.172 hombres (Knekt *et al.*, 1988).

En el estudio prospectivo realizado en más de 30.000 adultos en Linxian (China), el grupo suplementado diariamente con vitamina E (40 mg), β -caroteno (15 mg) y selenio (50 μ g) durante 5 años, mostraron un descenso del 21% por cáncer de estómago, junto con un descenso en la mortalidad total (Blot *et al.*, 1993).

Sin embargo, en un estudio realizado en 29.133 varones en Finlandia durante una media de 6,1 años, la suplementación con β -caroteno (20 mg) aumentó en un 18% los cánceres de pulmón, mientras que la vitamina E (50 mg) no mostró ningún efecto (The α -tocopherol, β -carotene cancer prevention study group, 1994). Sin embargo, algunos científicos piensan que los resultados de este estudio están condicionados por haberse

realizado sólo en fumadores, un grupo de alto riesgo en relación con el cáncer de pulmón.

Se han realizado numerosos estudios en relación con la vitamina E y las enfermedades cardiovasculares. Existe evidencia importante que asocia a las especies reactivas de oxígeno con el desarrollo de arterioesclerosis, puesto que estas especies pueden oxidar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL oxidadas han sido encontradas en las paredes arteriales dañadas y se ha observado que pueden contribuir al inicio y progresión del daño arterial. La inhibición de la oxidación de las LDL por parte del α -tocoferol constituye un mecanismo de prevención frente al desarrollo de arterioesclerosis.

Dos estudios epidemiológicos principales, realizados por investigadores de Harvard, han asociado la utilización de suplementos de vitamina E con una disminución en el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias (Stampfer *et al.*, 1993; Rimm *et al.*, 1993).

En un estudio realizado en 87.245 enfermeras de Estados Unidos, 552 de las cuales desarrollaron enfermedades coronarias durante los ocho años de seguimiento, se observó que la suplementación con vitamina E durante dos o más años disminuyó en un 41% las enfermedades coronarias (Stampfer *et al.*, 1993). Sin embargo, la utilización de otros tipos de suplementos o la vitamina E de la dieta no presentaron efectos protectores.

De manera similar, en el estudio realizado en 40.720 profesionales de la salud varones, de los cuales 880 desarrollaron enfermedades coronarias durante los cuatro años de seguimiento, se ha demostrado que la suplementación con 100 IU o más de vitamina E diarios durante al menos dos años, causó un descenso del 37% en el riesgo coronario (Rimm *et al.*, 1993). Tampoco en este caso fueron efectivos otros suplementos.

Un estudio epidemiológico realizado en unos 100.000 individuos de 12 poblaciones diferentes en Europa, indica una correlación inversa entre la mortalidad por cardiopatía isquémica y los niveles cardíacos de α -tocoferol (Gey *et al.*, 1991).

La suplementación con 100 mg de vitamina E diariamente durante 6 años, en un estudio realizado en 161 individuos adultos de Hirosaki, Japón, disminuyó la aparición de alteraciones coronarias (Takamatsu *et al.*, 1996). Los autores de este trabajo concluyen que

la suplementación crónica con 100 mg de vitamina E diarios puede prevenir los primeros estadios de la aterogénesis coronaria, mediante la disminución de la peroxidación de LDL.

En un estudio realizado en Dallas, la suplementación de varones con 800 IU de vitamina E diarias durante 12 semanas, resultó en una disminución en la susceptibilidad de las LDL a la oxidación, sin producir ningún efecto secundario (Jialal y Grundy, 1992).

La vitamina E parece ser beneficiosa en otros estados patológicos como las cataratas (Robertson *et al.*, 1989) y en el mantenimiento del sistema inmune durante el envejecimiento (Meydani *et al.*, 1990).

OBJETIVOS

Actualmente se considera al estrés oxidativo como un factor importante en el desarrollo de diversas enfermedades degenerativas. Entre los factores capaces de modificar el estrés oxidativo, existe un gran interés en las vitaminas antioxidantes C y E, cuya ingesta puede ser controlada de un manera sencilla y segura a través de la dieta.

A pesar de la importancia de las vitaminas C y E en el mantenimiento de la salud, existe poca información sobre los niveles óptimos de estas vitaminas en la dieta de humanos o de otros animales. Una amplia evidencia experimental apoya la idea de que los niveles óptimos de vitaminas C y E para proteger contra el estrés oxidativo *in vivo* es sustancialmente mayor que la administración diaria recomendada (RDA), necesaria para evitar los síndromes carenciales. En humanos adultos, el RDA es 50 mg de vitamina C y 15 mg de vitamina E diarios (Food and Nutrition Board, 1989).

En este trabajo nos planteamos el estudio de la capacidad de diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta, separada o conjuntamente, para reducir el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN en tejidos vitales. Además, estudiamos el balance entre el glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG), y realizamos un análisis de la composición en ácidos grasos en diferentes fracciones lipídicas, como complemento al estudio de peroxidación lipídica. La suplementación conjunta con las vitaminas C y E nos permitió estudiar el posible efecto sinérgico de ambas vitaminas *in vivo*, que ya ha sido demostrado *in vitro* (Packer *et al.*, 1979).

El estudio fue realizado en varios modelos *in vivo* e *in vitro*. Los modelos *in vivo* incluyeron al cobaya y a la rata ODS por su incapacidad, como en el caso de los humanos, de sintetizar el ascorbato y el α -tocoferol. Incluimos también un estudio de los productos de peroxidación lipídica en la orina humana tras la suplementación con vitaminas C y E.

Los tejidos estudiados en el cobaya fueron el hígado y el corazón. El hígado fue seleccionado por ser uno de los órganos que presenta una mayor tasa de generación celular de radicales libres *in vivo*. El músculo cardíaco posee un metabolismo aerobio elevado, basado en el consumo de oxígeno en las mitocondrias (una de las principales fuentes de

producción de radicales de oxígeno en los tejidos). Además, el corazón es un órgano particularmente pobre en antioxidantes y su carácter post-mitótico dificulta la reparación del tejido dañado a largo plazo. Por otra parte, las enfermedades cardíacas constituyen una de las principales causas de mortalidad en los países industrializados.

Además de los estudios en individuos intactos, en el caso del cobaya realizamos también investigaciones en animales tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (un inhibidor de la actividad catalasa) y con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, que pueden alterar el equilibrio redox celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio llevado a cabo en el presente trabajo consta de tres experimentos complementarios.

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS, PROTEÍNAS Y ADN, LA RAZÓN GSH/GSSG Y LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS EN EL HÍGADO Y EL CORAZÓN DE COBAYA.

En este estudio se utilizaron cobayas (*Cavia porcellus*) por ser animales de laboratorio incapaces de sintetizar, como en el caso de los humanos, ácido ascórbico y α -tocoferol.

El experimento consta a su vez de tres apartados, que se realizaron en tres años consecutivos.

1.1 Estudio del efecto de la suplementación con ácido ascórbico en la dieta y del 3-amino-1,2,4-triazol (AT) en el hígado y el corazón de cobaya.

En este experimento utilizamos 21 cobayas Dunkin-Hartley macho (200-250 g) a los que se dividió en tres grupos de peso medio similar.

Los cobayas fueron alimentados durante 5 semanas con una dieta basal de laboratorio (U.A.R., Francia) deficiente en vitamina C, que contenía 15 mg vitamina E/kg dieta y cuya composición detallada se muestra en la tabla M.1.

Las dietas con diferentes niveles de vitamina C se obtuvieron mediante la adición de las siguientes cantidades de ácido L-ascórbico a la dieta basal:

Tabla M.1. Composición de la dieta basal (U.A.R., Francia) deficiente en vitamina C.

COMPOSICIÓN DE LA DIETA BASAL	
COMPONENTE	CANTIDAD
	<i>g/100 g</i>
Proteínas	19,5
Grasa	3,1
Hidratos de carbono	68
Minerales y vitaminas	4,5
Humedad	12
Fibra	4,4

El contenido en minerales y vitaminas por kg de dieta fue: fósforo, 6.791 mg; calcio, 9.450 mg; potasio, 6.700 mg; sodio, 1.900 mg; magnesio, 2.003 mg; manganeso, 90,7 mg; hierro, 252 mg; cobre, 30,6 mg; zinc, 113,4 mg; cobalto, 1,61 mg; iodo, 0,9 mg; vitamina A, 19.000 U.I.; vitamina D₃, 1.500 U.I.; vitamina D₂, 1.150 U.I.; tiamina, 18,5 mg; riboflavina, 18 mg; ácido pantoténico, 16,5 mg; piridoxina, 3,15 mg; α -tocoferol, 15 mg; menadiona, 2,5 mg; niacina, 190 mg; ácido fólico, 0,5 mg; biotina, 0,04 mg; colina, 1.600 mg; y vitamina B₁₂, 0,02 mg.

- **C BAJA:** 33 mg vitamina C/kg dieta (6)
- **C MEDIA:** 660 mg vitamina C/kg dieta (8)
- **C ALTA:** 13.200 mg vitamina C/kg dieta (7)

El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

Paralelamente, 5 cobayas recibieron la dieta de 33 mg vitamina C/kg dieta y otros 5 la de 13.200 mg vitamina C/kg dieta y se utilizaron para el estudio del efecto de la vitamina C y del 3-amino-1,2,4-triazol (AT) sobre los parámetros analizados. A estos 10 cobayas se les administró una inyección intraperitoneal de AT (1 mg/g peso) preparado a una concentración de 2,5 g AT por cada 50 ml NaCl al 0,9%, 3 horas antes de ser sacrificados. A estos dos grupos los denominamos **C BAJA +AT** y **C ALTA +AT** respectivamente.

1.2 Estudio del efecto de la suplementación con α -tocoferol en la dieta en el hígado y el corazón de cobaya.

En este experimento utilizamos 21 cobayas Dunkin-Hartley macho (200-250 g) a los que se dividió en tres grupos de peso medio similar.

Los animales recibieron durante 5 semanas dietas preparadas por U.A.R. (Francia) mediante la adición de diferentes cantidades de vitamina E (dl- α -tocoferol acetato) a una dieta de cobaya estándar (dieta 114, U.A.R.) que contenía 660 mg vitamina C/kg dieta:

- **E BAJA:** < 15 mg vitamina E/kg dieta (7)
- **E MEDIA:** 150 mg vitamina E/kg dieta (7)
- **E ALTA:** 1.500 mg vitamina E/kg dieta (7)

El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

Estas cantidades fueron confirmadas por medio de HPLC-UV en dos muestras de cada dieta en nuestro laboratorio. La composición de la dieta basal se muestra en la tabla M.2.

Tabla M.2. Composición de la dieta basal (U.A.R., Francia) deficiente en α -tocoferol.

COMPOSICIÓN DE LA DIETA BASAL

COMPONENTE	CANTIDAD
	<i>g/100 g</i>
Proteínas	18,5
Grasa	2,9
Hidratos de carbono	46,9
Minerales	8,4
Vitaminas	1,4
Humedad	11
Fibra	10,9

El contenido en minerales y vitaminas por kg de dieta fue: fósforo, 8.600 mg; calcio, 10.600 mg; potasio, 12.000 mg; sodio, 3.450 mg; magnesio, 3.130 mg; manganeso, 100 mg; hierro, 320 mg; cobre, 26 mg; zinc, 85 mg; cobalto, 1,61 mg; vitamina A, 19.000 U.I.; vitamina D₃, 2.031 U.I.; tiamina, 22,5 mg; riboflavina, 21 mg; ácido pantoténico, 123 mg; piridoxina, 10,7 mg; menadiona, 55 mg; niacina, 1.930 mg; ácido fólico, 7,3 mg; biotina, 0,275 mg; colina, 1.740 mg; M-inositol, 250 mg; selenio, 114 μ g; y vitamina C, 660 mg.

1.3 Estudio del efecto de la suplementación con ácido ascórbico y α -tocoferol en la dieta en el hígado y el corazón de cobayas sometidos a shock endotóxico inducido por lipopolisacárido de *E. coli*.

Utilizamos 23 cobayas Dunkin-Hartley macho (200-250 g) a los que se dividió en 5 grupos de peso medio similar.

Los animales recibieron durante 5 semanas dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitaminas C y E, que fueron preparadas por U.A.R. (Francia) a partir de una dieta de cobaya estándar (dieta 114, U.A.R.) deficiente ambas vitaminas, cuya composición se muestra en la tabla M.3.

Las siguientes cantidades de vitaminas C y E se añadieron a la dieta basal para obtener las 4 dietas experimentales:

- **C BAJA E BAJA:** 33 mg vitamina C y < 15 mg vitamina E/kg dieta (11)
- **C MEDIA E BAJA:** 660 mg vitamina C y < 15 mg vitamina E/kg dieta (4)
- **C BAJA E MEDIA:** 33 mg vitamina C y 150 mg vitamina E/kg dieta (4)
- **C MEDIA E MEDIA:** 660 mg vitamina C y 150 mg vitamina E/kg dieta (4)

El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

Todos los cobayas, excepto 5 animales del grupo C BAJA E BAJA que fueron inyectados con solución salina, recibieron una inyección intraperitoneal de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* serotipo 0111:B4 (1,6 mg LPS/100 g peso) preparado a una concentración de 1,6 mg LPS por cada 0,1 ml de solución salina, 4 ó 5 horas antes de ser sacrificados. A estos 4 grupos se les denominó +LPS, +LPS +C, +LPS +E y +LPS +C+E, respectivamente.

En estos tres experimentos, los animales fueron mantenidos a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo luz:oscuridad de 12 h. Las jaulas se colocaron en el interior de cabinas de presión positiva de aire aséptico (A 130 SP, Flufrance, Cachan, Francia) equipadas con un filtro de aire HEPA (99,999% para partículas $>0,3 \mu\text{m}$) a la entrada.

Tabla M.3. Composición de la dieta basal (U.A.R., Francia) deficiente en vitaminas C y E.

COMPOSICIÓN DE LA DIETA BASAL

COMPONENTE	CANTIDAD
	<i>g/100 g</i>
Proteínas	18,5
Grasa	2,9
Hidratos de carbono	46,9
Minerales	8,4
Vitaminas	1,4
Humedad	11
Fibra	10,9

El contenido en minerales y vitaminas por kg de dieta fue: fósforo, 8.600 mg; calcio, 10.600 mg; potasio, 12.000 mg; sodio, 3.450 mg; magnesio, 3.130 mg; manganeso, 100 mg; hierro, 320 mg; cobre, 26 mg; zinc, 85 mg; cobalto, 1,61 mg; vitamina A, 19.000 U.I.; vitamina D₃, 2.031 U.I.; tiamina, 22,5 mg; riboflavina, 21 mg; ácido pantoténico, 123 mg; piridoxina, 10,7 mg; menadiona, 55 mg; niacina, 1.930 mg; ácido fólico, 7,3 mg; biotina, 0,275 mg; colina, 1.740 mg; M-inositol, 250 mg; y selenio, 114 μ g.

El peso corporal y la ingesta de alimento se determinaron tres veces a lo largo del período experimental. Al finalizar los tratamientos de 5 semanas, los animales fueron sacrificados mediante decapitación. A continuación, se extrajeron el hígado y los ventrículos del corazón, que fueron inmediatamente congelados a -25°C (primer año) ó -75°C (segundo y tercer año) hasta su posterior análisis bioquímico. Se separaron distintas fracciones de cada órgano que serían utilizadas para las distintas medidas y valoraciones.

En estos tres experimentos se estudiaron los parámetros:

- ácido ascórbico (HPLC-UV)
- α -tocoferol (HPLC-UV)
- razón GSH/GSSG como estimador del estado redox citosólico (método enzimático)
- peroxidación lipídica *in vivo* e *in vitro* mediante la valoración de sustancias ácido tiobarbitúrico (TBA) positivas (UV y fluorescencia)
- malondialdehído (MDA) libre (HPLC-UV)

En las muestras de hígado, además de los parámetros citados anteriormente, se determinaron los niveles de:

- ácidos grasos e índices de insaturación de las principales fracciones lipídicas de membrana y de triglicéridos (HPLC-CG)
- carbonilos proteicos como estimador del daño oxidativo a proteínas (UV)
- 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) como estimador del daño oxidativo al ADN (HPLC-EC)

2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA SOBRE LOS HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL HÍGADO Y EL PLASMA DE RATAS ODS.

Este estudio se llevó a cabo en la Facultad de Agricultura (Departamento de Bioquímica Aplicada) de la Universidad de Tohoku, Sendai, Japón.

En este experimento utilizamos 45 ratas ODS macho de 6 semanas de edad (100-120

g). Las ratas se colocaron en jaulas de acero inoxidable con fondo alambrado y fueron mantenidas a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, una humedad relativa de $55 \pm 5\%$ y un fotoperíodo luz:oscuridad de 12 h.

Los animales fueron alimentados con una dieta estándar deficiente en vitamina C (Clea Japan, Inc., Tokio) suplementada con 1 mg de ácido ascórbico por cada ml de agua de bebida durante 1 semana. A continuación, las ratas fueron divididas al azar en 9 grupos de 5 ratas cada uno y alimentadas con una dieta basal en polvo deficiente en vitaminas C y E (Oriental Yeast Co., Tokio). La tabla M.4 muestra la composición de la dieta basal.

Las dietas experimentales se obtuvieron mediante la adición de 5, 50 ó 250 mg α -tocoferol/kg dieta basal y 150, 300 ó 900 mg ácido ascórbico/kg dieta basal. Las ratas fueron alimentadas durante 21 días con las siguientes dietas:

- **E BAJA C BAJA:** 5 mg vitamina E y 150 mg vitamina C/kg dieta (5)
- **E BAJA C MEDIA:** 5 mg vitamina E y 300 mg vitamina C/kg dieta (5)
- **E BAJA C ALTA:** 5 mg vitamina E y 900 mg vitamina C/kg dieta (5)
- **E MEDIA C BAJA:** 50 mg vitamina E y 150 mg vitamina C/kg dieta (5)
- **E MEDIA C MEDIA:** 50 mg vitamina E y 300 mg vitamina C/kg dieta (5)
- **E MEDIA C ALTA:** 50 mg vitamina E y 900 mg vitamina C/kg dieta (5)
- **E ALTA C BAJA:** 250 mg vitamina E y 150 mg vitamina C/kg dieta (5)
- **E ALTA C MEDIA:** 250 mg vitamina E y 300 mg vitamina C/kg de dieta (5)
- **E ALTA C ALTA:** 250 mg de vitamina E y 900 mg de vitamina C/kg de dieta (5)

Los animales accedieron libremente a la comida y al agua. El peso corporal y la ingesta de alimento se determinaron semanalmente entre 17:00 y 18:00 h.

Después de las 3 semanas experimentales, y tras retirar el alimento a las ratas durante la noche, la sangre heparinizada fue extraída mediante punción cardíaca bajo anestesia suave con éter. A continuación, el hígado fue perfundido *in situ* con NaCl 150 mM frío y seguidamente fue extraído y pesado. El plasma se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a $1.500 \times g$ durante 15 min a 4°C .

Tabla M.4. Composición de la dieta basal (Oriental Yeast Co., Tokio) deficiente en vitaminas C y E.

COMPOSICIÓN DE LA DIETA BASAL	
COMPONENTE	CANTIDAD
	<i>g/100 g</i>
Caseína	25,0
Minerales	3,5
Vitaminas	1,0
Bitartrato de colina	0,2
Aceite de soja	5,0
Celulosa	5,0
Fécula de maíz:sacarosa (2:1)	60,0
DL-Metionina	0,3

La dieta basal contiene los siguientes minerales (mg/kg dieta): AIN-76 mineral mixture CaHPO_4 , 17.500; NaCl , 2.590; $\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 7.700; K_2SO_4 , 1.820; MgO , 840; MnCO_3 , 122,5; Fe-citrate (Fe 17%), 210; ZnCO_3 , 56; $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10,5; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,35; KIO_3 , 0,35; y $\text{CrK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 19,25.

La dieta basal contiene las siguientes vitaminas (mg/kg dieta): AIN-76A vitamin mixture vitamina B_{12} , 0,01; vitamina D_3 , 0,027; vitamina K_3 , 0,05; D-biotina, 0,2; ácido fólico, 2; vitamina $\text{B}_1\text{-HCl}$, 6; vitamina B_2 , 6; vitamina $\text{B}_6\text{-HCl}$, 7; vitamina A acetato, 8; ácido pantoténico-Ca, 16; y ácido nicotínico, 30.

Las muestras de hígado y plasma fueron inmediatamente congeladas a -84°C hasta su posterior análisis bioquímico, que se realizó durante las 4 semanas siguientes.

En este experimento se determinaron los siguientes parámetros:

- ácido ascórbico (UV)
- α -tocoferol (HPLC-FL)
- hidroperóxidos lipídicos (HPLC-CL)
- peroxidación lipídica *in vivo* e *in vitro* mediante la valoración de sustancias TBA positivas (UV)

3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA SOBRE LOS NIVELES DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EN LA ORINA HUMANA.

Se ha descrito en animales y en humanos que los niveles de TBARS en plasma y orina aumentan significativamente por diversos factores como el ejercicio, el alcoholismo, las hormonas relacionadas con el estrés (Kosugi *et al.*, 1994), el ayuno (Dhanakoti y Draper, 1987), enfermedades como el hipertiroidismo (Fernández y Videla, 1989), la diabetes ó enfermedades hepáticas (Yagi *et al.*, 1981) y diversos xenobióticos (Kosugi *et al.*, 1994, Ekström *et al.*, 1986, Gavino *et al.*, 1985, Bagchi *et al.*, 1992).

La posible influencia de otros factores como la edad ó el sexo han sido descritos de forma controvertida (Knight *et al.*, 1987) o bien no han sido encontrados (Yagi *et al.*, 1981). Respecto a la dieta, se han descrito aumentos en los niveles de TBARS en orina en ratas que recibieron dietas enriquecidas (10-15%) en ácido grasos n-3 (Dhanakoti y Draper, 1987; Nelson *et al.*, 1993) mientras que el paso de una dieta rica en vegetales a una dieta rica en carne no alteró los niveles de productos de peroxidación lipídica en orina (Yagi *et al.*, 1981).

Este estudio se diseñó con el fin de minimizar estos efectos demostrados ó sugeridos. En una primera selección, los voluntarios rellenaron el siguiente cuestionario: 1) fecha de nacimiento; 2) altura; 3) peso; 4) enfermedades recientes; 5) enfermedades crónicas; 6) régimen de alimentación; 7) fármacos; 8) suplementos de vitaminas o minerales; cantidad en

el caso de las vitaminas C y E; 9) deportes practicados y frecuencia; 10) consumo de tabaco; 11) ingesta de alcohol y frecuencia.

Esta información se utilizó para seleccionar a 21 varones jóvenes entre 23 y 28 años de edad, en buen estado de salud. Los individuos seleccionados no eran fumadores ni obesos, no habían padecido ninguna enfermedad inmediatamente antes ó durante el estudio, no seguían ningún régimen alimenticio, no tomaban suplementos de vitaminas ó minerales ni fármacos, no practicaban deportes fuertes y no ingerían una cantidad de alcohol superior a 80 ml por semana.

Los individuos seleccionados fueron codificados con números y asignados al azar a diferentes grupos de suplementación. Cada individuo recibió dos hojas de instrucciones. En la primera de ellas se les indicaba ingerir una cápsula cada día. Las cápsulas contenían:

- **VITAMINA C:** 1 g de ácido L-ascórbico (7)
- **VITAMINA E:** 100 mg de dl- α -tocoferol (7)
- **CONTROL:** ninguna vitamina (7)

El número de individuos en cada grupo aparece entre paréntesis.

La cápsula debía tomarse inmediatamente después de la comida del mediodía (que en España culturalmente es la más fuerte). Esto es importante en el caso de la vitamina E con el fin de asegurar su absorción intestinal efectiva debido a la presencia de grasa y sales biliares en el intestino.

Si los sujetos olvidaban tomar la cápsula, debían tomarla después de la cena, excepto en el caso de que al día siguiente tuvieran que entregar una muestra de orina. Si habían tomado la cápsula después de la cena ó habían olvidado tomarla durante todo el día, debían hacer una marca en el lugar correspondiente de la segunda hoja.

Todos los individuos comenzaron a tomar las cápsulas el día 8 de Marzo de 1995 y las muestras de la primera orina de la mañana, antes del desayuno, se recogieron en contenedores estándar esterilizados los días 8 y 22 de Marzo y 6 de Abril. Estos tres días

eran miércoles y se seleccionaron con el fin de minimizar la posible influencia de cambios de hábitos durante los fines de semana.

Los 30 días del período experimental eran días de trabajo normal sin incluir vacaciones para los sujetos seleccionados para el estudio. Las muestras de orina fueron rápidamente congeladas y mantenidas a -80°C hasta su análisis.

Dos días antes de la toma de muestras, los sujetos no debían beber alcohol. Si no dormían bien la noche anterior a la toma de muestras, debían postponer la obtención de la muestra uno ó incluso dos días si era necesario. Se han descrito aumentos en los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la orina humana tras permanecer despiertos durante toda la noche (Kosugi *et al.*, 1994).

La segunda hoja contenía 30 casillas, correspondientes a los días del estudio, las cuales debían ser marcadas cada día después de tomar la cápsula. Asimismo, se les indicó describir en esta hoja cualquier incidencia adicional si consideraban que podía afectar a los resultados del estudio. Todos los sujetos debían traer al laboratorio esta hoja de control, debidamente cumplimentada, junto con la última muestra de orina.

Entre los 21 voluntarios, el cumplimiento de las instrucciones se llevó a cabo en un 96% de los casos y sólo un sujeto del grupo de vitamina E abandonó el estudio.

Todos los voluntarios firmaron un documento dando su consentimiento escrito para la suplementación con vitaminas a las dosis y tiempos seleccionados así como para la toma de muestras de orina.

En las muestras de orina se determinaron los niveles de:

- sustancias reactivas al TBA (TBARS) por fluorimetría y espectrofotometría
- creatinina (UV)

II. MATERIAL

1. PRODUCTOS QUÍMICOS

- Acetato sódico (Merck)
- Acetato de etilo (Aldrich)
- Acetonitrilo (Carlo Erba)
- Ácido acético (Panreac, Merck)
- Ácido ascórbico (Merck, Wako)
- Ácido bórico (Wako)
- Ácido clorhídrico (Merck)
- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (Sigma)
- Ácido metafosfórico (Wako)
- Ácido ortofosfórico (Merck)
- Ácido perclórico (Merck, Wako)
- Ácido pícrico (Merk)
- Ácido sulfúrico (Panreac)
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Sigma)
- Ácido tricloroacético (Panreac)
- Albúmina bovina (Sigma)
- Alcohol isoamilo (Merck)
- Aminotriazol (3-amino-1,2,4-triazol) (Sigma)
- Amidol (dihidrocloruro de 2,4-diaminofenol) (Wako)
- Aprotinina (Sigma)
- Bromuro de miristiltrimetilamonio (Aldrich)
- n-Butanol (Merck)
- Butilhidroxitolueno (Sigma, Wako)
- Carbonato sódico (Merck, Wako)
- Citocromo *c* de corazón de caballo (Sigma)
- Cloroformo (Wako, Romil)
- Cloruro de estaño (Kanto)
- Cloruro de zinc (Merck)
- Cloruro potásico (Wako)

- Cloruro sódico (Panreac, Wako, Merck, Riedel deHäen)
- 2'-Desoxiguanosina (Sigma)
- Digitonina (Sigma)
- 2,6-Diclorofenol-indofenol (Wako)
- 2,4-Dinitrofenilhidracina (DNPH) (Sigma, Kanto)
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (Merck)
- EDTA Na₂ (Sigma, Riedel deHäen)
- Estreptomina (Sigma)
- Etanol (Panreac, Scharlau)
- Etanol 96% (De Danske Spritfabrikker)
- n-Etilmaleimida (NEM) (Sigma)
- Fécula de patata
- Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (Sigma)
- Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Sigma)
- Fosfatidilcolina (Nippon Oil & Fats)
- Fosfato bipotásico (Panreac)
- Fosfato monopotásico (Panreac, Wako)
- Fosfato monosódico (Scharlau)
- Fosfato disódico (Scharlau)
- Glicerol (Sigma)
- Glutación reducido (Sigma)
- Glutación reductasa tipo III de levadura (Sigma)
- Helio (Carburos metálicos)
- n-Hexano (Carlo Erba)
- Hidrocloruro de creatinina (Sigma)
- Hidrocloruro de guanidina (Sigma)
- Hidróxido potásico (Panreac)
- Hidróxido sódico (Merck, Kanto)
- Homocisteína (Sigma)
- Ioduro potásico (Wako)
- Isopropanol (Wako)
- Leupeptina (Sigma)
- Lipopolisacárido de *E. coli* serotipo 0111:B4 (Sigma)

- Luminol (3-aminofaloil hidracina) (Wako)
- Malondialdehído (Merck)
- Metanol (Scharlau, Wako)
- Molibdato amónico (Wako)
- NADPH (Boehringer Mannheim)
- Nitrógeno (SEO)
- Nucleasa P1 de *Penicillium citrinum* (Sigma)
- 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-hydroxycromano (PMC) (Wako)
- Pepstatina (Sigma)
- Perclorato sódico (Merck)
- Peróxido de hidrógeno (Merck)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac)
- Sulfato de cobre (Probus)
- Sulfato de hierro (Panreac)
- Sulfato monosódico (Wako)
- Tartrato sódico-potásico (Merck)
- Tiosulfato sódico (Wako)
- α -Tocoferol (Sigma, Eisai)
- Tris (Merck, Sigma)
- Triton-X-100 (Sigma)

2. EQUIPO INSTRUMENTAL

- Agitador magnético Framo-Gerätetechnik (Holm & Halby)
- Agitadores vórtex HEIDOLPH reax 1D y Labinco L46 (Holm & Halby)
- Balanzas de precisión SAUTER 404 y SARTORIUS
- Balanza Mettler PM460 (Delta Range)
- Baño termostatzado Hetofrig (Heto Birkerod Denmark)
- Baño termostatzado con agitación GRANT INSTRUMENTS ss 30 A-13838
- Bomba para HPLC JASCO PU-980
- Bomba para HPLC MERCK-HITACHI L-6000
- Bomba para HPLC Waters 510 MILLIPORE
- Cabinas con filtración de aire (0,3 μm) con carbón activo y presión positiva para mantenimiento de animales. A 130 SP, FLUFRANCE
- Centrífuga refrigerada KONTRON Hermle ZK 365
- Centrífuga refrigerada SORVALL INSTRUMENTS RC5C
- Centrífuga Minifuge T (HERAEUS)
- Cromatógrafo de gas SHIMAZDU GC14A
- Destiladores de agua MERIT W4000 y ELGA
- Detector de fluorescencia JASCO 821-FP
- Detectores de quimioluminiscencia JASCO 825-CL y TOHOKU CDL-100
- Detector electroquímico Coulochem II ESA
- Detector UV para HPLC GILSON 115
- Detector UV para HPLC JASCO UV-970
- Detector UV para HPLC MERCK-HITACHI L-4000
- Espectrofotómetro JASCO Ubest-35
- Espectrofotómetros MILTON ROY spectronic 1201 y 601
- Fluorímetro PERKIN-ELMER LS50B
- Homogeneizador mecánico WHEATON INSTRUMENTS
- Incubador con agitación DUBNOFF PRECISION SCIENTIFIC
- Integrador Waters 746 MILLIPORE
- Inyector automático MERCK-HITACHI AS-2000A
- Micro pH-metro CONSORT P314
- Multiagitador magnético con placa térmica SBS A-08

- Pipetas automáticas GILSON, KARTELL y VARI
- pH-metro PHM62 (Radiometer Copenhagen)
- pH/mV-metro CRISON D-501 13145
- Sonicador VIBRA CELL SONICS MATERIALS
- Termostatizador con agitación B. BRAUN 3656 y P. SELECTA tectron 3000543
- Termostatizador para HPLC JASCO CO-965
- Termostatizador para HPLC MERCK L-5025

3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los cobayas (*Cavia porcellus*) Dunkin-Hartley macho, de 2-3 semanas de edad (200-250 g), utilizados en este trabajo se obtuvieron de Iffa-Credo (Lyon, Francia).

El cobaya es el animal de laboratorio ideal para realizar experimentos de suplementación con vitaminas C y E ya que carece de la capacidad de sintetizar endógenamente el ácido ascórbico, además del α -tocoferol.

Recientemente se ha establecido una colonia de ratas Wistar mutantes que poseen un defecto hereditario en la capacidad de sintetizar ácido L-ascórbico. Se denominan ratas ODS (Osteogenic Disorder Shionogi) y en ellas esta característica está controlada por un gen autosómico recesivo (Horio *et al.*, 1985; Makino y Katagiri, 1980; Mizushima *et al.*, 1984).

Las ratas mutantes ODS, al igual que los cobayas y los primates, carecen de la actividad enzimática L-gulonolactona oxidasa (EC 1.1.3.8) que cataliza la conversión de L-gulono- γ -lactona en ácido L-ascórbico en el último paso de la biosíntesis del ácido L-ascórbico y por tanto requieren un suplemento de vitamina C en la dieta. Las ratas ODS macho de 6 semanas de edad (100-120 g) utilizadas en este trabajo se obtuvieron de Clea Japan, Inc. (Tokio, Japón).

III. MÉTODOS ANALÍTICOS

1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ofrece la combinación de una gran sensibilidad y selectividad evitando la interferencia de otras sustancias endógenas.

El método utilizado (Barja de Quiroga *et al.*, 1991) permite una cuantificación eficiente del ácido ascórbico en los tejidos utilizados, mediante HPLC de pares iónicos en fase reversa con detección UV (figura M.1).

A. Preparación de muestras

Las muestras fueron homogeneizadas en frío, en ácido perclórico 50 mM a una concentración de 100 mg de tejido por cada ml, en homogeneizadores de vidrio tipo Pobel. Los homogeneizados se centrifugaron a $3.000 \times g$ durante 10 minutos a 5°C. A continuación, los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de membrana de diámetro de poro 0,5 μm .

Una alícuota de cada muestra fue neutralizada con K_2HPO_4 al 45%. Inmediatamente después, se añadió a las alícuotas DL-homocisteína al 1% para reducir al ácido ascórbico y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, 20 μl de muestra se inyectaron directamente en la columna.

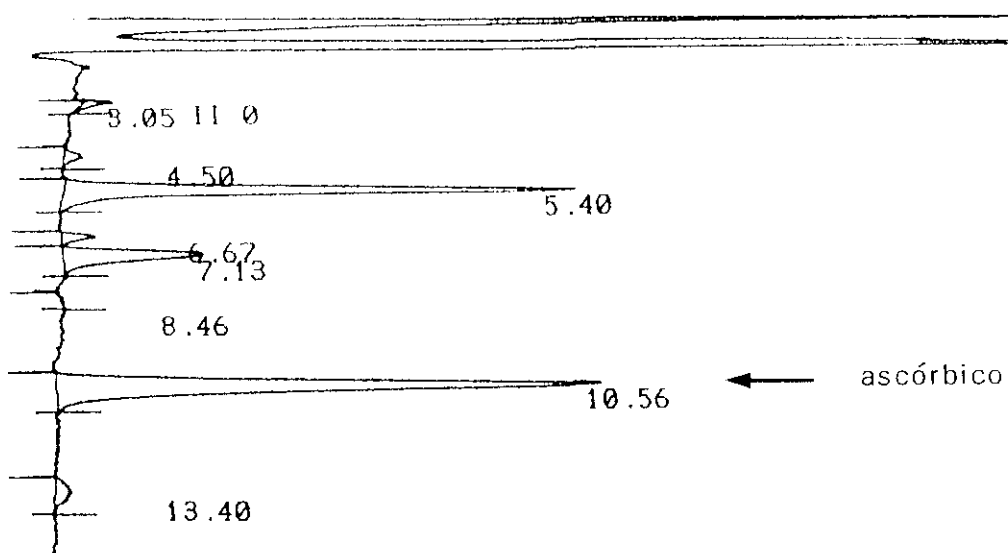
B. Solución estándar

La solución estándar se preparaba cada día inmediatamente antes de ser utilizada. Antes de cada serie de análisis, se inyectaba directamente en la columna una solución de ácido ascórbico 0,4 mM en ácido perclórico 50 mM.

C. Condiciones cromatográficas

La cromatografía de pares iónicos en fase reversa se llevó a cabo isocráticamente

a



b

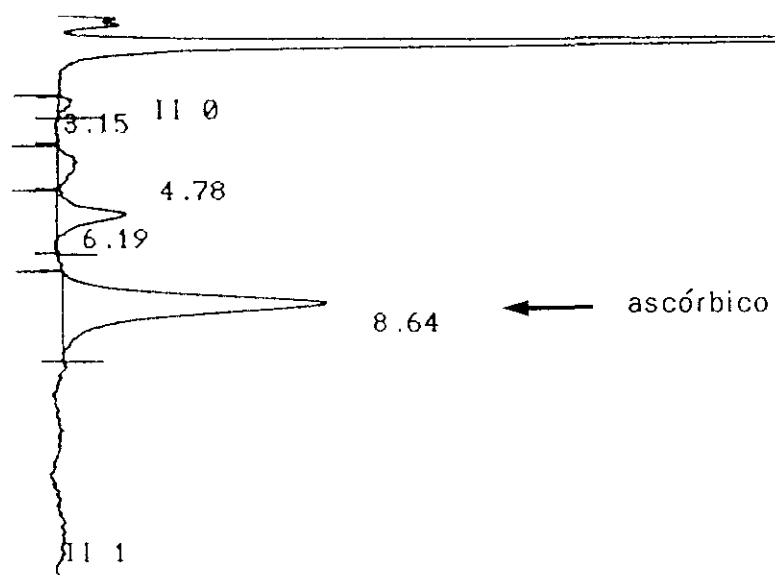


Figura M.1. Separación cromatográfica (HPLC-UV) de ácido ascórbico en hígado (a) y corazón (b) de cobaya.

utilizando una bomba Waters 510, un inyector Rheodyne (7125) con un puerto de inyección de 20 μ l y una columna Macherey-Nagel C₁₈ (nucleosil) de 7 μ m (15 cm \times 4,6 mm) ó una columna Supelcosil LC-18 (tetracloruro de carbono) de 3 μ (15 cm \times 4,6 mm).

La fase móvil fue acetonitrilo:agua (12,5:87,5; v/v) y contenía fosfato disódico 4,3 mM y bromuro de miristiltrimetilamonio 1,07 mM como contraión. El pH se ajustó a 5,5 con ácido fosfórico. Seguidamente se filtró con filtros Phenomenex (Millipore) AFO-0503 (47 mm; 0,2 μ m). La fase móvil fue bombeada isocráticamente a un flujo de 0,75 (columna Macherey-Nagel) ó 1,1 (columna Supelco) ml/min. La presión media de la columna era de 26 bares. La separación cromatográfica se llevó a cabo a 25 \pm 2°C.

La absorbancia se registró a 280 nm con un detector UV Gilson 115 de longitud de onda variable (sensibilidad 0,02 unidades de absorbancia a fondo de escala) y se utilizó un integrador Waters 746.

El cálculo de la concentración del ácido ascórbico se llevó a cabo por relación con el área de la solución estándar, mediante la siguiente expresión:

$$\text{Ácido ascórbico } (\mu\text{moles/g tejido}) = \frac{\text{área muestra}}{\text{área estándar}} \cdot s \cdot \frac{1}{x}$$

siendo:

- s: concentración del estándar (0,4 μ moles/ml)
- x: g de tejido por cada ml de ácido empleado en la homogeneización

2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA

La concentración de ácido ascórbico en las muestras de hígado y plasma de ratas ODS se determinó mediante el método de la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (Arakawa *et al.*, 1982).

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en frío en ácido metafosfórico al 2% a una concentración de 250 mg por cada ml. A cada ml de plasma se añadieron 4 ml de

HPO₃ al 2%. Las muestras se agitaron en el vórtex durante 30 s y se centrifugaron a 1.500 × g durante 10 min a 4°C.

El sobrenadante se dividió en dos alícuotas de 1 ml a cada una de las cuales se añadieron 2 gotas de 2,6-diclorofenol-indofenol al 0,2% y seguidamente 1 ml de una solución de SnCl al 1% y HPO₃ al 5%. A una de las dos alícuotas se le añadió una solución de DNPH (20 mg/ml) en H₂SO₄. Las muestras se incubaron en un baño de agua con agitación a 37°C durante 3 horas.

Al finalizar el período de incubación, se añadieron a las muestras 2,5 ml de H₂SO₄ al 85% y a continuación 0,5 ml de DNPH a la alícuota a la que no se le había añadido anteriormente. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min.

La concentración de ácido ascórbico se midió a 540 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (JASCO Ubest-35, Japan Spectroscopic Co. Ltd.).

Diariamente se realizó una curva de calibración. Se preparó una solución estándar de ácido ascórbico a una concentración de 20 µg por cada ml de HPO₃ al 2% y a partir de ésta tres diluciones 2:1, 2:2 y 1:2 (v/v) con HPO₃. La solución de HPO₃ al 2% se utilizó como blanco.

La concentración de ácido ascórbico en el hígado se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Ácido ascórbico } (\mu\text{g/g tejido}) = \frac{DO-a}{b} \cdot \frac{1000/x}{V_m}$$

y la concentración en plasma se calculó mediante la expresión:

$$\text{Ácido ascórbico } (\mu\text{g/ml plasma}) = \frac{DO-a}{b} \cdot \frac{f}{V_m}$$

siendo:

- DO: absorbancia a 540 nm
- a: ordenada en el origen
- b: coeficiente de regresión
- V_m : volumen de muestra (1000 μ l)
- x: g de tejido por cada ml de HPO_3 empleado en la homogeneización
- f: factor de dilución de la muestra en HPO_3

3. DETERMINACIÓN DE α -TOCOFEROL POR HPLC CON DETECCIÓN UV

La concentración tisular de α -tocoferol se determinó utilizando HPLC en fase reversa con detección UV a 292 nm, mediante el método de Vatassery *et al.* (1988) (figura M.2).

A. Preparación de muestras

Para realizar el procedimiento de saponificación, de cada muestra se pesaron 50 mg aproximadamente, que se colocaron en tubos que contenían 0,2 ml de una solución al 15% de ácido ascórbico. Bajo atmósfera de nitrógeno se añadieron 2 ml de etanol que contenía 0,025% de butilhidroxitolueno (BHT).

Las muestras se calentaron en un baño de agua a 55°C con agitación durante 10 min. A continuación, de nuevo bajo atmósfera de N_2 , a cada muestra se le añadió 1 ml de hidróxido potásico al 40% y se incubaron a 55°C durante 30 minutos agitando cada pocos minutos.

Al finalizar el período de incubación, los tubos se enfriaron y se añadieron 2 ml de H_2O destilada y 2 ml de hexano que contenía 0,025% de BHT. Tras agitar durante 2 min y centrifugar a $430 \times g$ durante 10 min, se recogió 1 ml de la fase de hexano que se evaporó bajo atmósfera de N_2 . El residuo se redisolvió en 0,5 ml de metanol y se inyectaron 20 μ l en la columna.

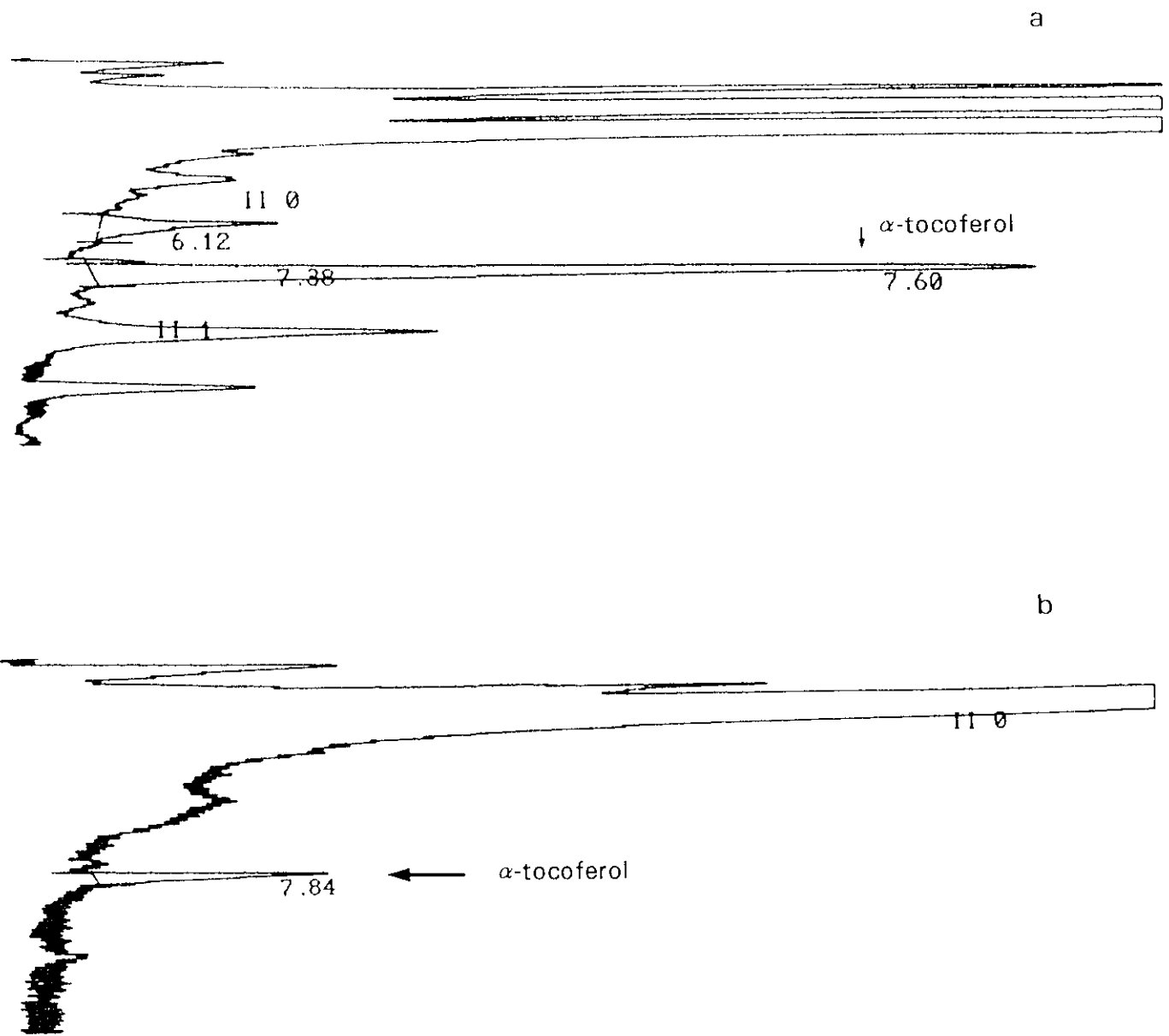


Figura M.2. Separación cromatográfica (HPLC-UV) de α -tocoferol en hígado (a) y corazón (b) de cobaya.

B. Solución estándar

Se preparó una solución estándar de α -tocoferol a una concentración de 4 mg/dl en etanol con 0,025 % de BHT. De esta solución se procesaron diariamente 50 μ l de la misma manera que las muestras y se inyectaron en la columna antes de cada serie de análisis.

C. Condiciones cromatográficas

La cromatografía en fase reversa se llevó a cabo utilizando una bomba Waters 510, un inyector Rheodyne (7125) con un puerto de inyección de 20 μ l y una columna Macherey-Nagel C₁₈ (nucleosil) de 7 μ m (10 cm \times 4,6 mm) ó una columna Supelcosil LC-18 (tetracloruro de carbono) de 3 μ (15 cm \times 4,6 mm).

La fase móvil fue metanol al 100% que fue bombeada isocráticamente a un flujo de 0,5 (columna Macherey-Nagel) ó 0,9 (columna Supelco) ml/min. La presión media de la columna era 2,5 PSI (26 bares). La separación cromatográfica se llevó a cabo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

La absorbancia se registró a 292 nm con un detector UV Gilson 115 de longitud de onda variable (sensibilidad 0,02 unidades de absorbancia a fondo de escala) y se utilizó un integrador Spectra-Physics.

El cálculo de la concentración de α -tocoferol se llevó a cabo por relación con el área de la solución estándar, mediante la siguiente expresión:

$$\alpha\text{-Tocoferol } (\mu\text{g/g tejido}) = \frac{\text{área muestra}}{\text{área estándar}} \cdot \frac{s}{x}$$

siendo:

- s: μ g de estándar (2 μ g)
- x: g de tejido

4. DETERMINACIÓN DE α -TOCOFEROL POR HPLC CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA

La concentración de α -tocoferol en las muestras de hígado y plasma de la ratas ODS se determinó mediante HPLC con detección fluorimétrica (Abe *et al.*, 1976) (figura M.3).

A. Preparación de muestras

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en NaCl 150 mM frío a una concentración de 100 mg por cada ml. En el caso del plasma se utilizaron 200 μ l a los que se añadieron 2 ml de NaCl.

Se tomaron 2 ml de homogeneizado hepático ó 2 ml de plasma diluído y se añadieron 2 ml de etanol que contenía 2 μ g de 2,2,5,7,8-pentametil-6-hidroxicromano (PMC) como estándar interno.

A continuación, se llevó a cabo la extracción del α -tocopherol con 5 ml de n-hexano. Las muestras se agitaron en el vórtex durante 2 min y seguidamente se centrifugaron a 700 \times g durante 5 min. La capa de hexano obtenida tras la centrifugación se evaporó utilizando un rotavapor y finalmente bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se redisolvió en 100 μ l de n-hexano agitando suavemente con la mano y 20 μ l se inyectaron en el HPLC.

B. Solución estándar

Se preparó una solución de α -tocoferol en n-hexano a una concentración de 0,2 μ g/ μ l. Asimismo, se preparó una solución de PMC en n-hexano a la misma concentración. La solución estándar definitiva se preparó mezclando ambas soluciones a partes iguales.

C. Condiciones cromatográficas

La fase móvil fue n-hexano:isopropanol (99,5:0,5; v/v) y se bombeó a un flujo de 1 ml/min utilizando una bomba JASCO PU-980. La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante una columna de 5 μ m JASCO Finepak SIL-5 (4,6 mm \times 25 cm).

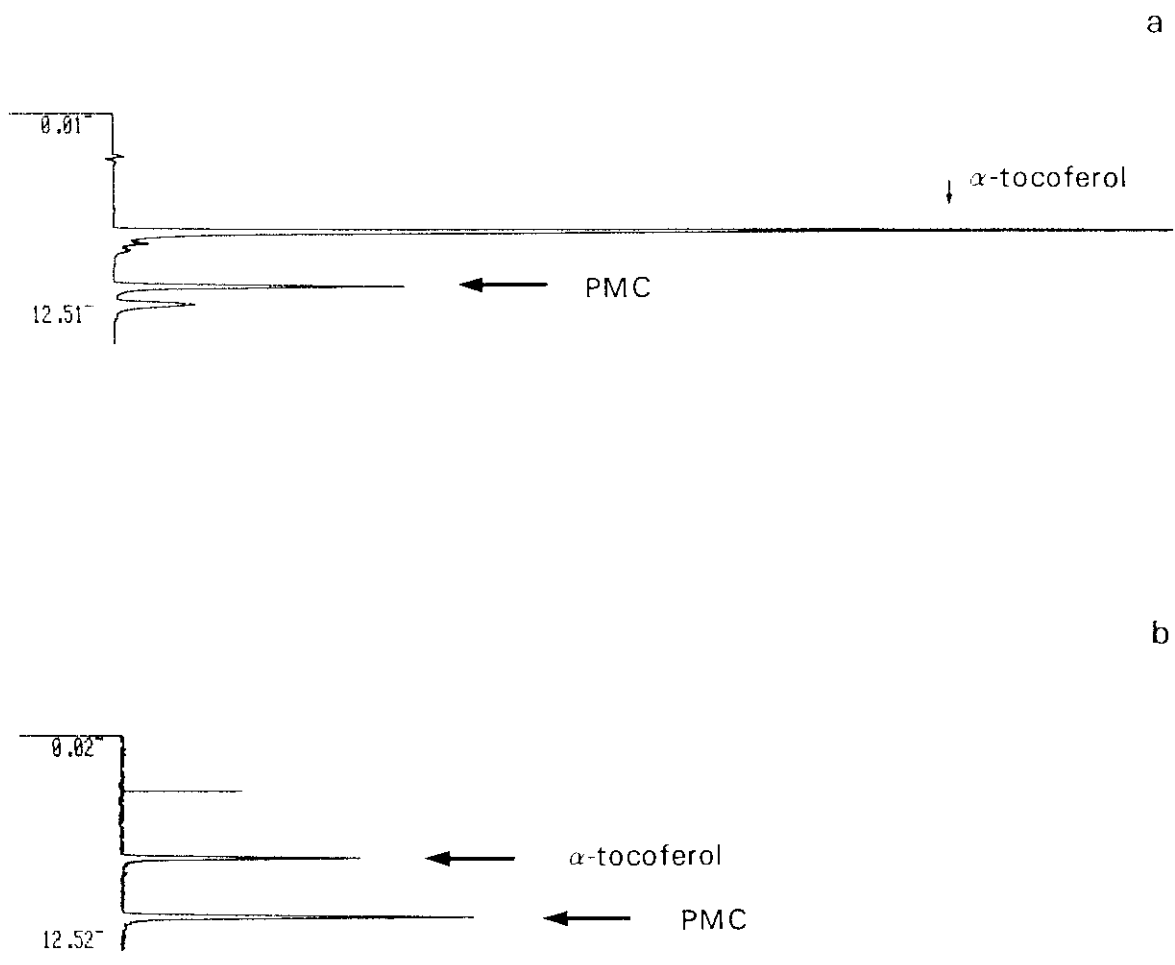


Figura M.3. Separación cromatográfica (HPLC-FL) de α -tocoferol en hígado (a) y plasma (b) de ratas ODS.

La concentración de α -tocoferol se determinó utilizando un detector de fluorescencia (Ex. 298 nm; Em. 325 nm) JASCO 821-FP (Japan Spectroscopic Co., Ltd.).

Para calcular la concentración de α -tocoferol en hígado y plasma se utilizó la siguiente expresión:

$$\alpha\text{-Tocoferol } (\mu\text{g/g ó 100 ml}) = S. (A/B) . f. (1/x)$$

siendo:

- S: concentración del estándar interno ($\mu\text{g/ml}$)
- A: área del α -tocoferol en la muestra
- B: área del PMC en la muestra
- x: g de tejido ó ml de plasma
- f = ($\mu\text{g } \alpha\text{-toc}/\mu\text{g PMC}$)/(área $\alpha\text{-toc}/\text{área PMC}$)

5. ESTUDIO DEL BALANCE ENTRE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO Y OXIDADO

El contenido en glutatión de las muestras se determinó mediante el método de reciclado enzimático basado en la glutatión reductasa (GR) (Tietze, 1969). El cociente entre el glutatión reducido y el oxidado se obtuvo como estimador del estado redox citosólico.

A. Preparación de muestras

Para la determinación del glutatión total (reducido y oxidado) los órganos fueron pesados y homogeneizados rápidamente en ácido tricloroacético (TCA) al 5% que contenía HCl 0,01 N para evitar la oxidación del GSH, a una concentración de 50 mg de tejido/ml de TCA, en homogeneizadores de vidrio tipo Pobel y en frío. La solución de TCA fue previamente desoxigenada mediante el burbujeo de nitrógeno durante 10 minutos.

Otra fracción de las muestras se utilizó para la determinación del glutatión oxidado (GSSG). Para la derivatización del GSH, se utilizó la *N*-etilmaleimida (NEM), que reacciona

rápidamente con el GSH formando un complejo estable y evitando, de esta manera, la participación del GSH en la medida enzimática, así como su posible oxidación a GSSG.

Las muestras fueron pesadas, homogeneizadas en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 con EDTA 1 mM y NEM 12,5 mM e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente.

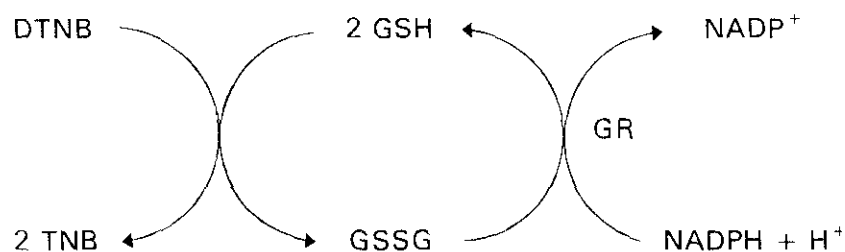
El exceso de NEM que no ha reaccionado, debe ser eliminado completamente de la muestra ya que es un inhibidor de la GR y por tanto podría interferir en la medida enzimática. El método utilizado para eliminar la NEM fue el de la hidrólisis alcalina (Sachetta *et al.*, 1986) modificado en nuestro laboratorio.

Para alcalinizar las muestras, añadimos a cada una 25 μ l de KOH al 10% por cada ml de homogeneizado y dejamos actuar durante 5 minutos. Utilizando un micro pH-metro comprobamos que el pH era próximo a 11 ya que a un pH superior a 12 el GSSG no es estable. Finalmente, añadimos en frío 0,56 ml de TCA por cada ml de homogeneizado inicial y comprobamos que el pH era cercano a 1,65.

Tras la homogeneización, las muestras fueron centrifugadas a $3.200 \times g$ durante 5 minutos y a 5°C , bajo atmósfera de nitrógeno.

B. Medida del glutatión

Tanto el glutatión total como el oxidado se analizaron por el método de Tietze (1969). Se trata de un procedimiento de reciclado enzimático en el que el glutatión es secuencialmente oxidado por el 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) ó reactivo de Ellman y reducido por el NADPH en presencia de glutatión reductasa (GR):



La forma reducida del DTNB, ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), tiene un máximo de absorción a 412 nm por lo que el análisis se realizó siguiendo el cambio de absorbancia a 412 nm en presencia de DTNB 6 mM, NADPH 0,3 mM y 10 U de GR por ml, en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 que contenía EDTA 6,3 mM. La adición de EDTA previene la oxidación del GSH. Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron a 25°C.

También se realizaron reacciones control substituyendo la muestra por TCA-HCl (en el caso del glutatión total) y por tampón fosfato con EDTA y NEM procesado de la misma manera que las muestras (en el caso del GSSG) para evitar sobrevalorar la concentración de glutatión en las muestras y comprobar el estado de reactivos químicos como el DTNB.

Los valores de glutatión total y oxidado se corrigieron restando la reacción espontánea en ausencia de muestra y fueron llevados a la siguiente expresión mediante la cual se obtuvieron los resultados definitivos expresados en μ moles de equivalentes de GSH por g de tejido:

$$\text{Glutación } (\mu\text{moles/g tejido}) = \frac{(a+b \cdot \Delta DO/\text{min}) \cdot f \cdot 1000/x}{V_m \cdot 10^6 \cdot 0,30733}$$

siendo:

- $\Delta DO/\text{min}$: incremento de absorbancia por minuto
- a: ordenada en el origen
- b: coeficiente de regresión
- f: factor de dilución de la muestra
- V_m : volumen de muestra (0,07 ml)
- x: mg de tejido por cada ml de tampón empleado en la homogeneización

Los valores a y b se obtuvieron tras construir una recta de regresión. Esta curva de calibración se construyó a partir de una solución madre de GSH comercial a una concentración de 16 mg de GSH/250 ml de TCA al 5%-HCl 0,01 N. La serie de concentraciones fue desde 14 hasta 448 ng de GSH/cubeta.

Los valores obtenidos para el GSSG se multiplicaron por un factor de corrección 1,56 debido a la dilución de las muestras con TCA. Los valores del GSH fueron calculados tras sustraer del glutatión total los obtenidos para el GSSG. Finalmente, se calculó la tasa GSH/GSSG como estimador del estrés oxidativo de los tejidos.

6. ACTIVIDAD CATALASA

A. Preparación de muestras

Las muestras se homogeneizaron en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 a una concentración de 50 mg de tejido por cada ml de tampón. El proceso de homogeneización se realizó en frío, utilizando un homogeneizador automático Wheaton y homogeneizadores teflón-vidrio tipo Pobel. Los homogeneizados así obtenidos se sonicaron, también en frío, con un sonicador Vibra-Cell durante tres períodos de 10 segundos separados por dos intervalos de 20 segundos.

A continuación fueron centrifugados a $3.200 \times g$ durante 20 minutos a 5°C. Seguidamente se recogieron los sobrenadantes y se separó una alícuota a la que se añadieron 0,1 ml de Triton-X-100 por cada ml para solubilizar la enzima. Después de 30 min se realizaron las medidas espectrofotométricas.

B. Medida de la actividad catalasa

La valoración de la enzima se realizó por el método de Beers y Sizer (1952). Este método se basa en el descenso de absorbancia por unidad de tiempo que se observa a 240 nm debido a la descomposición del H₂O₂ por la catalasa.

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro termostatzado a 25°C utilizando microcubetas de cuarzo que contenían:

- 0,67 ml de H₂O₂ 14 mM en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 y
- 30 μ l de muestra

El ensayo duraba 1 min a partir de la adición de la muestra. Se prepararon blancos que contenían 0,67 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 y 30 μ l de muestra.

La actividad total de la enzima se calculó a partir de la expresión:

$$ACT. TOTAL (\mu moles H_2O_2/min.mg tejido) = \frac{\Delta DO/min. V_t \cdot f}{\epsilon \cdot V_m \cdot x}$$

siendo:

- $\Delta DO/min$: incremento de absorbancia por minuto
- V_t : volumen total en la cubeta (0,7 ml)
- f : factor de dilución de la muestra
- ϵ : coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($43,6 \times 10^{-3} \mu M^{-1}.cm^{-1}$)
- V_m : volumen de muestra (30 μ l)
- x : mg de tejido por cada ml de tampón utilizado en la homogeneización

Para calcular la actividad específica de la enzima se determinó la cantidad de proteínas de las muestras mediante el método de Lowry *et al.* (1951)

7. ANÁLISIS DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (SUSTANCIAS TBA POSITIVAS) *IN VIVO* E *IN VITRO*

A. Preparación de muestras

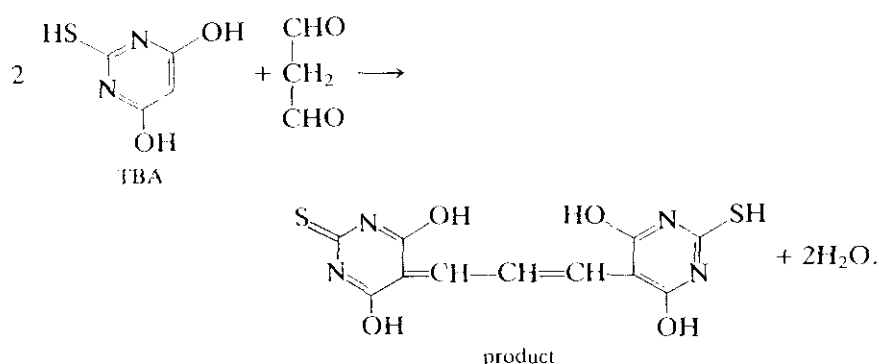
Las muestras fueron pesadas en una balanza de precisión y homogeneizadas en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 a una concentración de 50 mg de tejido por cada ml de tampón. El proceso de homogeneización se llevó a cabo en frío. Se utilizó un homogeneizador automático Wheaton y homogeneizadores teflón-vidrio tipo Pobel. Los homogeneizados así obtenidos se sonicaron, también en frío, con un sonicador Vibra-Cell durante tres períodos de 10 segundos separados por dos intervalos de 20 segundos.

A continuación fueron centrifugados a $3.200 \times g$ durante 20 minutos a 5°C. Los sobrenadantes que fueron mantenidos en frío hasta el momento de su utilización.

B. Peroxidación lipídica *in vivo*. Método del ácido tiobarbitúrico

La concentración de productos de peroxidación lipídica se estimó por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Uchiyama y Mihara en 1978, con algunas modificaciones.

Durante el proceso de peroxidación lipídica se generan pequeñas cantidades de malondialdehído (MDA) que reacciona con el TBA dando lugar a la formación de un compuesto de color rosa mediante la siguiente reacción:



Este compuesto coloreado presenta un máximo de absorción a 535 nm.

Para llevar a cabo el ensayo del TBA, tras la preparación de la muestras, se tomaron 140 μl de cada muestra y se mezclaron con los siguientes reactivos:

- 1 ml de ácido fosfórico al 1%
- 33 μl de butilhidroxitolueno (BHT) al 0,01% en alcohol etílico
- 0,3 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,6%

El blanco se preparó con 140 μl de fosfato potásico en vez de muestra.

La adición del antioxidante BHT previene la autoxidación de la muestra durante la fase de calentamiento en presencia de aire, evitando la obtención de valores de TBA artificialmente altos (Pikul *et al.*, 1983).

Las muestras fueron calentadas durante 45 minutos en un baño de agua hirviendo y tras ser enfriadas se realizó una extracción con n-butanol. A cada muestra se añadió 1,4 ml de n-butanol, mezclándose vigorosamente. A continuación se centrifugó a $1.700 \times g$ durante 15 minutos a 5°C , se recogió la fase orgánica y se midió la absorbancia a 535 nm.

Para el cálculo de la peroxidación lipídica en las muestras se utilizó la siguiente expresión:

$$MDA \text{ (nmoles/g tejido)} = \frac{DO-a}{b} \cdot \frac{1000/x}{V_m}$$

siendo:

- DO: absorbancia a 535 nm
- a: ordenada en el origen
- b: coeficiente de regresión
- V_m : volumen de muestra (0,14 ml)
- x: mg de tejido por cada ml de tampón empleado en la homogeneización

Se realizó una curva patrón a partir de una solución madre de MDA a una concentración de 200 nmoles/ml de tampón fosfato 50 mM pH 7,4 que contenía HCl 1N. La serie de concentraciones de la curva patrón fue desde 9,88 hasta 0,077 nmoles de MDA/tubo.

En las muestras de hígado y corazón de cobaya del tercer año y en las de orina humana también se estimó la concentración de productos de peroxidación lipídica mediante fluorimetría. Se realizaron medidas de prebarrido de fluorescencia en las muestras que establecieron 503 nm como la longitud de onda óptima de excitación y 548 nm la de emisión.

En cada muestra se realizaron espectros completos de fluorescencia entre 500 y 600 nm. Los valores obtenidos fueron referidos a una curva estándar construida al realizar la medida con diferentes concentraciones conocidas de MDA puro (figura M.4).

La concentración de productos de peroxidación lipídica de las muestras de plasma de ratas ODS se determinó mediante el método fluorimétrico de Yagi (1976).

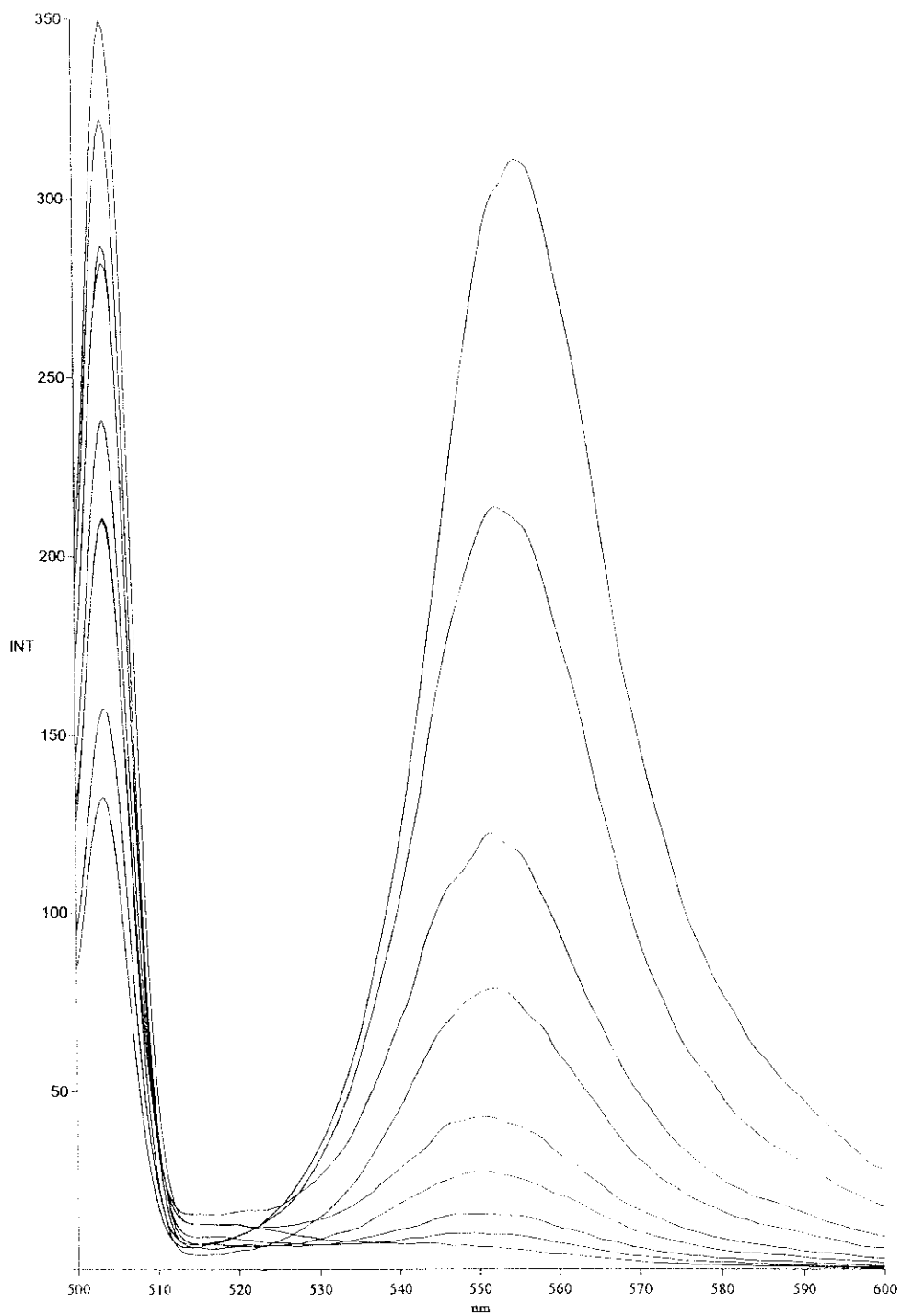


Figura M.4. Curva patrón de estándar de MDA obtenida por fluorimetría. Se observa un primer pico de excitación (503 nm) y un pico de emisión (548 nm) para concentraciones crecientes de MDA puro.

C. Peroxidación lipídica inducida (*in vitro*)

La sensibilidad de los extractos tisulares a la peroxidación inducida *in vitro* se estimó incubando los sobrenadantes de las muestras en un baño de agua a 37°C con agitación, en presencia de ascorbato 0,4 mM y FeSO₄ 0,05 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4. La incubación se llevó a cabo a distintos tiempos según las muestras:

- 30, 60 y 90 min para las muestras de cobaya del primer año
- 90 y 180 min, y 22 h para las muestras de cobaya de los años segundo y tercero
- 180 min para las muestras de hígado de ratas ODS

Una vez transcurrido el período de incubación se tomaron 140 µl de cada tubo y se llevó a cabo el ensayo del TBA de la manera descrita en el apartado anterior.

8. DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHÍDO POR HPLC

Los valores de MDA libre fueron estudiados dado su potencial interés por tratarse de uno de los productos del proceso de peroxidación presente normalmente en los tejidos *in vivo*.

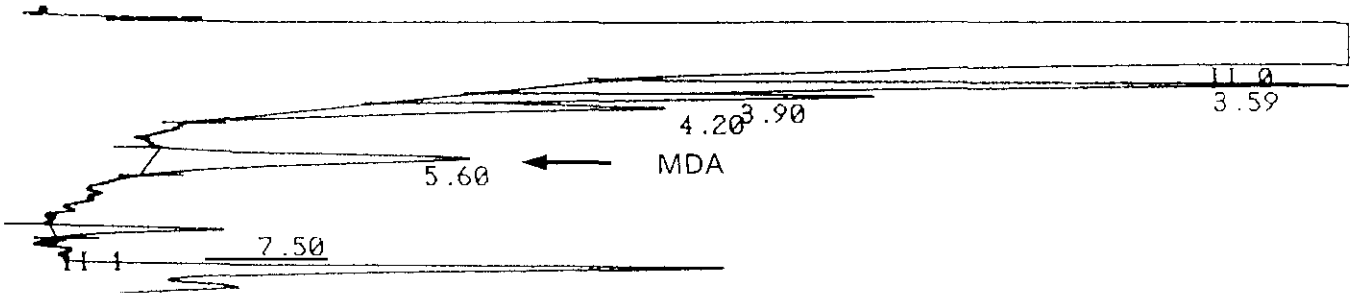
El método utilizado es una modificación del descrito por Bull y Marnett (1985). Se trata de un método de HPLC de pares iónicos en fase reversa. La detección se realiza mediante la absorbancia del MDA a 267 nm (figura M.5).

A. Preparación de muestras

Las muestras se homogeneizaron en tampón Tris 30 mM, pH 7,4 a una concentración de 100 mg de tejido por cada ml de tampón. El homogeneizado fue inmediatamente diluido (1:1; v/v) con acetonitrilo y, tras agitar en el vórtex durante 30 segundos, se centrifugó a 3.000 × g durante 10 minutos a 5°C.

Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de membrana con diámetro de poro de 0,45 µm (acetato de celulosa) y seguidamente se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo.

a



b

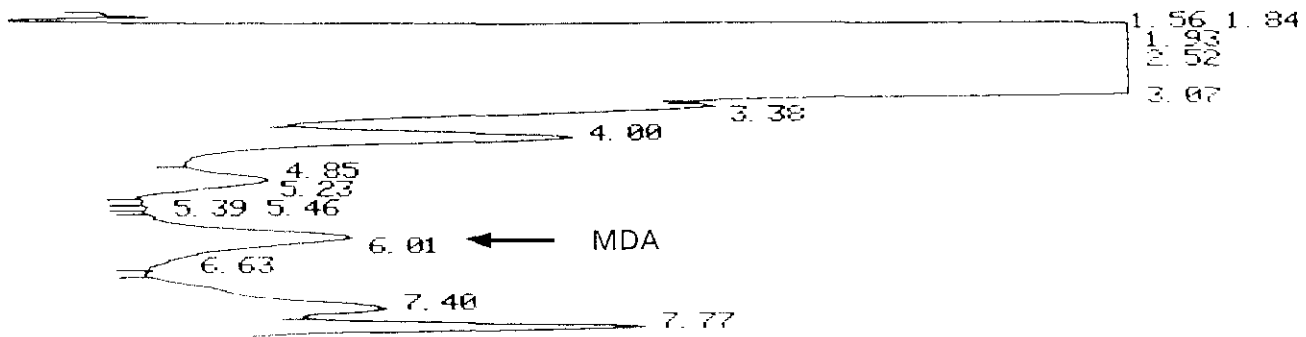


Figura M.5. Separación cromatográfica (HPLC-UV) de MDA libre en hígado (a) y corazón (b) de cobaya.

B. Solución estándar

La solución estándar se obtenía por hidrólisis ácida según describen Esterbauer *et al.* (1984). Se preparaba una solución madre de malondialdehído-bis(dimetilacetal) 10 mM en H₂SO₄ al 1% y después de dos horas a temperatura ambiente, a partir de la solución madre se preparaba una segunda solución de MDA 40 μM en tampón Tris 30 mM, pH 7,4. A continuación, se mezclaba esta solución con tampón Tris y acetonitrilo (1:3:4; v/v) para obtener la solución estándar definitiva de MDA 5 μM que era inyectada directamente en el cromatógrafo.

C. Condiciones cromatográficas

La cromatografía de pares iónicos en fase reversa se llevó a cabo isocráticamente, utilizando el mismo equipo instrumental que en el caso del ácido ascórbico y con una columna Macherey-Nagel C₁₈ (Nucleosil) de 7 μm (10 cm × 4,6 mm) ó una columna Supelcosil LC-18 (tetracloruro de carbono) de 3 μ (15 cm × 4,6 mm).

La fase móvil fue acetonitrilo:agua (25:75; v/v) y contenía fosfato disódico 10 mM y bromuro de miristiltrimetilamonio 2,5 mM como contraión. El pH se ajustó a 7,4 con ácido fosfórico o sosa. A continuación se filtró la fase móvil. En este caso el flujo fue de 0,5 ml/min (columna Macherey-Nagel) ó 0,8 ml/min (columna Supelco) y la presión media de 19 bares.

La separación se llevó a cabo a 25 ± 2°C y la detección se realizó mediante la absorción del MDA a 267 nm utilizando un detector UV con una sensibilidad de 0,02 unidades de absorbancia a fondo de escala.

El cálculo de la concentración tisular de MDA se realizó por relación con el área de la solución estándar de MDA, mediante la siguiente expresión:

$$\text{MDA (nmoles/g tejido)} = \frac{\text{área muestra}}{\text{área estándar}} \cdot s.2. \frac{1}{x}$$

siendo:

- s: concentración del estándar (5 nmoles/ml)
- x: g de tejido por cada ml de tampón empleado en la homogeneización

Se multiplica por 2 debido a la dilución 1:1 del extracto con acetonitrilo.

9. DETERMINACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS

El procedimiento de preparación de muestras seguido para la determinación de hidroperóxidos lipídicos mediante HPLC con detección de quimioluminiscencia se muestra en la figura M.6.

A. Extracción de los lípidos

Los lípidos fueron extraídos de las muestras de hígado y plasma de ratas ODS con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) de acuerdo con el método de Folch *et al.* (1957).

Las muestras de hígado (500 mg) fueron homogeneizadas en frío, en 2 ml de NaCl 150 mM que contenía BHT al 0,002% como antioxidante. Se utilizó un homogeneizador automático vidrio-teflón. A continuación, se añadieron al homogeneizado 5 ml de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) con BHT al 0,002% y se agitaron en el vórtex durante 1 min. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a $1.500 \times g$ durante 15 min a 4°C.

Tras la centrifugación, se recogió la capa inferior de cloroformo. Se llevó a cabo una segunda extracción en la capa superior de metanol-agua con cloroformo:metanol y posteriormente se realizó una tercera extracción con cloroformo.

La capa de cloroformo, que contiene los lípidos totales, fue deshidratada con 2 g de sulfato sódico y se dejó en la nevera a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, las muestras fueron filtradas a través de papel de filtro N°5C (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) y el residuo lavado tres veces con 2 ml de cloroformo. El solvente se eliminó utilizando un rotavapor y finalmente bajo atmósfera de nitrógeno.

Los lípidos totales obtenidos fueron inmediatamente disueltos en 200 μ l de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se tomaron 20 μ l para la determinación de hidroperóxidos mediante HPLC con detección de quimioluminiscencia (CL). La cantidad restante se utilizó para la determinar la concentración de fósforo.

Previamente se ha confirmado que la formación de hidroperóxidos como artefacto no tiene lugar durante el procedimiento de extracción descrito (Miyazawa, 1989).

Los lípidos totales de las muestras de plasma se extrajeron de manera similar a los de las muestras de hígado. A cada ml de plasma se añadieron 5 ml de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) que contenía BHT al 0,002%, se agitó en el vórtex durante 1 min y se centrifugó a $1.500 \times g$ durante 15 min a 4°C.

La capa inferior de cloroformo se recogió y la extracción (sin BHT) se repitió por segunda vez en la capa superior. Las muestras fueron secuencialmente deshidratadas, filtradas, lavadas con cloroformo y evaporadas de la manera descrita anteriormente.

Los lípidos totales se redisolviéron en 100 μ l de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y 20 μ l se inyectaron en el HPLC-CL. La cantidad restante se utilizó para determinar la concentración de fósforo.

B. Solución estándar

Se realizaron curvas de calibración de hidroperóxidos de fosfatidilcolina (PCOOH) y fosfatidiletanolamina (PEOOH) tras la determinación del valor de peroxidación (POV) del estándar de PC (Nippon Oil & Fats Co. Ltd., Tokio, Japón) según se describe en el siguiente apartado.

Diariamente se inyectaron por triplicado 20, 10 y 5 μ l de estándar de PCOOH a una concentración de 240 pmoles/20 μ l, al inicio y al final de cada serie de análisis. Utilizando los valores de concentración del estándar y el área obtenida mediante HLPC se realizó una curva de calibración.

C. Determinación del valor de peroxidación

El valor de peroxidación del estándar de PC (Nippon Oil & Fats) se determinó mediante el procedimiento de titulación yodométrica (Senzel *et al.*, 1975).

Se preparó una solución estándar de PC a una concentración de 1 g/25 ml en cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se mantuvo en frío hasta el momento de su utilización.

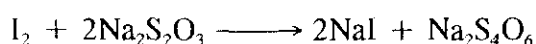
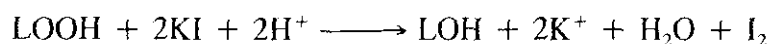
A continuación se disolvió 1 g de fécula de patata en 100 ml de agua destilada. Esta solución se calentó en un baño de agua con agitación durante 2 min aproximadamente hasta alcanzar la transparencia e inmediatamente después se filtró con papel de filtro n°2. Esta solución se mantuvo a temperatura ambiente y se utilizó como indicador de color.

Finalmente, se preparó una solución saturada de ioduro potásico a una concentración de 1,6 g/ml que fue mantenido a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se tomaron 6 ml de solución estándar de PC que se colocaron en un erlenmeyer y se añadieron 34 ml de una solución de cloroformo:ácido acético (2:3; v/v) y se agitó con la mano. A continuación se añadió 1 ml de KI saturado y transcurrido 1 min, la mezcla se mantuvo en condiciones de oscuridad durante 5 min. Seguidamente se añadieron 75 ml de agua destilada para detener la reacción.

Después de la adición de agua, se añadieron 2 ml de la solución de fécula de patata y se comenzó a añadir lentamente $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 N mientras la mezcla fue agitada constantemente con la mano para eliminar todo el yodo de la capa de cloroformo hasta la total desaparición del color azul.

En el procedimiento descrito tienen lugar las siguientes reacciones:



Este proceso se realizó por triplicado en el estándar. También se preparó un blanco sin solución estándar.

El valor de peroxidación del estándar de PC se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$POV \text{ (miliequiv/kg)} = S.N.1000/x$$

siendo:

- S: ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ empleados (corregidos con el blanco)
- N: normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,01 N)
- x: g de estándar de PC utilizados (0,24 g)

Debido a que la estequiometría de la reacción entre LOOH y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ es 1:2, el valor de POV se dividió entre 2 para obtener el valor definitivo (nmoles/mg), que multiplicado por la concentración del estándar de PC (0,04 mg/ μl) nos daría la concentración de hidroperóxidos en el estándar de PC (nmoles/ μl).

D. Condiciones cromatográficas

La concentración de hidroperóxidos fosfolipídicos (PCOOH and PEOOH) se determinó en la fracción de lípidos totales de hígado y plasma mediante HPLC-CL. El sistema analítico consistente en HPLC y detección de quimioluminiscencia ha sido descrito por Miyazawa *et al.* (1994). La figura M.7 muestra un diagrama esquemático del sistema de HPLC-CL.

Utilizamos una columna JASCO Finepak SIL NH_2 -5 (4.6 mm \times 25 cm) de 5 μm (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón). La fase móvil fue hexano:2-isopropanol:metanol:agua (5:7:2:1; v/v) con un flujo de 1,0 ml/min (bomba JASCO PU-980).

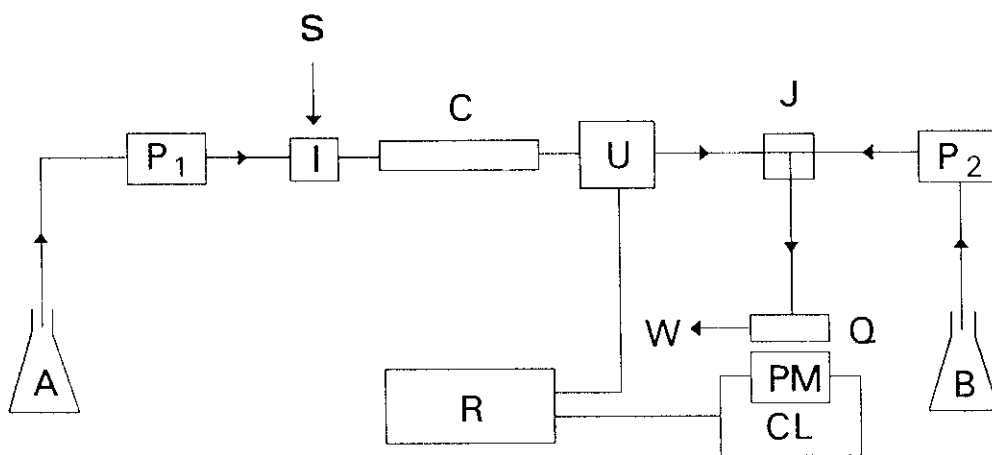
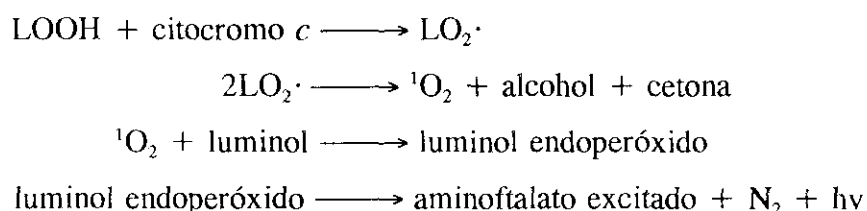


Figura M.7. Esquema del sistema de HPLC-CL utilizado para la determinación de PCOOH y PEOOH en hígado y plasma de ratas ODS. A, fase móvil; P₁ y P₂, bombas; I, puerto de inyección; S, muestra; C, columna; U, detector UV; J, mezclador; B, reactivo de quimioluminiscencia; Q, célula espiral de teflón (200 μ l); PM, fotomultiplicador; CL, detector de quimioluminiscencia; R, integrador; W, desecho.

El eluyente de la columna pasó a través de un detector JASCO UV-970 para detectar los dienos conjugados a 234 nm. A continuación el eluyente fue mezclado con un reactivo de quimioluminiscencia (CL) en un mezclador situado detrás de la columna (tipo Y; Kyowa Seimitsu, Tokio, Japón). La temperatura de la columna y del mezclador se mantuvo constante a 35°C mediante un termostizador (JASCO CO-965).

El reactivo de quimioluminiscencia se preparó disolviendo 10 µg/ml de citocromo *c* y 2 µg/mL de luminol (3-aminoftaloil hidracina) en tampón H₃BO₃ 50 mM, KCl 50 mM y Na₂CO₃ 72 mM, pH 10, y se mantuvo en condiciones de oscuridad para evitar la fotooxidación del luminol. Este reactivo fue bombeado a 1,1 ml/min con una bomba JASCO PU-980.

Los hidroperóxidos lipídicos (LOOH) reaccionan con el grupo hemo del citocromo *c* y producen radicales peroxilo (LO₂·). La degradación de los radicales peroxilo da lugar a la formación de oxígeno singlete (¹O₂) que oxida al luminol y éste emite quimioluminiscencia. Las reacciones de los hidroperóxidos lipídicos con el reactivo de quimioluminiscencia se muestran a continuación:



La quimioluminiscencia generada por la reacción entre los hidroperóxidos con el reactivo de quimioluminiscencia se midió con un detector JASCO 825-CL ó un detector CLD-100 CL (Tohoku Electronic Industries Co., Sendai, Japón) equipado con una célula espiral de teflón de 200 µl de volumen (figura M.8).

La concentración de PCOOH y PEOOH en las muestras de hígado y plasma se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{PCOOH o PEOOH (pmoles/g tejido o ml plasma)} = \frac{A_m - a}{b} \cdot \frac{V_r/x}{V_i}$$

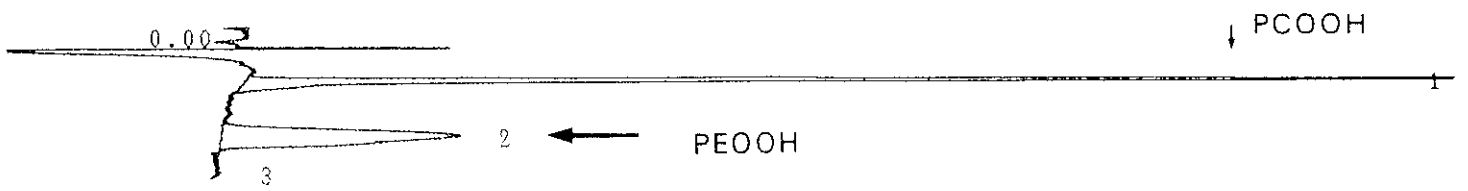


Figura M.8. Separación cromatográfica (HPLC-CL) de PCOOH y PEOOH en hígado de ratas ODS.

siendo:

- a: ordenada en el origen
- b: coeficiente de regresión
- A_m : área de la muestra
- V_r : volumen de resuspensión (200 μ l hígado; 100 μ l plasma)
- V_i : volumen de inyección (20 μ l)
- x: g de tejido ó ml de plasma

10. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS

Este estudio fue realizado por el grupo del Dr. Reinaldo Pamplona en la Facultad de Medicina (Departamento de Ciencias Médicas Básicas) de la Universidad de Lérida.

El análisis de los lípidos de las muestras de hígado de cobaya y en concreto, su composición en ácidos grasos, se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente:

- extracción de los lípidos de la muestra de hígado
- separación de las diferentes fracciones lipídicas: fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol
- extracción de los ácidos grasos de las diferentes fracciones lipídicas
- análisis (identificación y cuantificación porcentual) de los diferentes ácidos grasos obtenidos

A. Extracción de los lípidos

Las muestras (200-250 mg) fueron homogeneizadas en solución fisiológica acidificada con ácido fórmico (pH 1,58) a una concentración de 1 mg/ μ l. A continuación, se llevó a cabo la extracción de los lípidos de la muestra mediante una modificación del método de Folch *et al.* (1957).

A cada 200 μ l de muestra se añadieron 5 ml de 2-propanol. Tras agitar durante 15 min, se centrifugó a $1.500 \times g$ durante 15 min. Seguidamente se recogieron los sobrenadantes, que fueron burbujeados con N_2 para evitar la oxidación de los ácidos grasos,

y se guardaron a -20°C en oscuridad.

B. Separación de las fracciones lipídicas

Las fracciones lipídicas fueron separadas mediante cromatografía en capa fina. Para ello se aplicaron 1,5 ml de 2-propanol (que contiene el extracto lipídico) a unas placas de sílica que se prepararon utilizando 20 gr de silicagel 60H y 60 ml de etanol por cada 4 placas de 20×20 cm.

Estas placas se desarrollaron, pasándolas por tres cubetas que contenían diferentes solventes, permitiendo la separación de las distintas fracciones:

- 2-propanol (hasta 1 cm) y secar
- n-hexano, 1,2-dicloroetano, metanol, ác. fórmico (16:14:8:1; v/v) (hasta 7 cm) y secar: separación de los lípidos polares (fosfolípidos)
- dicloroetano (hasta el extremo superior) y secar: separación de los lípidos apolares (ésteres de colesterol, triglicéridos, colesterol libre)

Estas fracciones se visualizaron con luz UV gracias a un spray de ácido p-anilinaftalensulfónico 0,02% en etanol (1/100). Así, las fracciones que se separaron fueron:

- fosfolípidos (lípidos de membrana): fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, fosfatidilcolina y esfingomiélin
- colesterol (que no contiene ácidos grasos)
- triglicéridos (lípidos citoplasmáticos)
- ésteres de colesterol (que no se pudieron valorar debido a su escasez)

Posteriormente se pasaron las diferentes fracciones a tubos individuales con tapón de rosca y teflón (previamente limpiados con acetona para eliminar cualquier resto de grasa) y se procedió a la transesterificación de los ácidos grasos.

C. Obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (transesterificación)

Los lípidos fueron transesterificados con 2 ml de HCl al 5 % en metanol. Las muestras se calentaron a 75 °C durante 90 min en el caso de los fosfolípidos y ésteres de colesterol, y durante 30 min en el caso de los triglicéridos.

Después de la esterificación, los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron extraídos con 2 ml de n-pentano y 1 ml de NaCl saturado. La solución saturada de NaCl aumenta la fuerza iónica del medio y favorece la recuperación de los ácidos grasos gracias al pentano. Tras agitar vigorosamente durante 15 min, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min y seguidamente se recogió la fase de pentano.

Se tomó 1 ml de la fase de pentano que fue evaporado bajo atmósfera de nitrógeno y redisolto en 40 μ l de CS₂. De esta solución se inyectaron 8 μ l en el cromatógrafo.

D. Análisis en el cromatógrafo de gases

Los ésteres de ácidos grasos obtenidos fueron separados y analizados utilizando un cromatógrafo de gas Shimadzu GC14A. El gas conductor fue N₂ a un flujo de 60 ml/min. El detector de ionización de llama recibía H₂ a un flujo de 50 ml/min y aire sintético a 500 ml/min. La temperatura del inyector y el detector era de 250 °C. Los tiempos de retención y el área de los picos se registraron en un integrador Spectra-Physics SP4400.

Se utilizó una columna capilar de sílice Supelcowax TM 10 (Supelco, Inc., Bellefonte, PA; 30 m \times 0,53 mm). Para favorecer la separación de los diferentes ácidos grasos fue imprescindible programar una rampa de temperaturas desde 135 °C hasta 235 °C: a partir de un tiempo inicial de 0 min, desde 135 °C hasta 195 °C, a 4 °C/min; desde 195 °C hasta 215 °C, a 1 °C/min; y desde 215 °C hasta 235 °C, a 4 °C/min; con un tiempo final de 5 min, mantenido a 235 °C.

La identificación de los ésteres se llevó a cabo mediante la comparación con estándares de ácidos grasos (Sigma). Los resultados que obtenidos indican el porcentaje de los distintos ácidos grasos de una determinada fracción lipídica.

11. DETERMINACIÓN DE CARBONILOS PROTEICOS

A. Preparación de muestras

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,4 que contenía digitonina al 0,1%, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (36 $\mu\text{g/ml}$) y los inhibidores de proteasas leupeptina (0,5 $\mu\text{g/ml}$), pepstatina (0,7 $\mu\text{g/ml}$) y aprotinina (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Las muestras se incubaron durante 15 min y después fueron centrifugadas a $1.300 \times g$ durante 10 min.

Los ácidos nucleicos se eliminaron de las muestras mediante la adición de estreptomycinina al 10% a una concentración final del 1%. Tras una incubación de 15 min se centrifugó a $1.700 \times g$ durante 10 min.

El sobrenadante se dividió en dos alícuotas de 1 ml a las que se añadieron 2,5 ml de HCl 2M ó 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) 10 mM disuelta en HCl 2M respectivamente y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La solución de DNPH fue mantenida en oscuridad ya que puede ser destruída por la luz.

Las dos alícuotas fueron secuencialmente precipitadas en frío con 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, incubadas durante 10 min y centrifugadas a $1.700 \times g$ durante 5 min y posteriormente con 4 ml de TCA al 10%, agitadas en el vórtex durante 10 segundos y centrifugadas otra vez a $1.700 \times g$ durante 10 min.

Los pellets fueron lavados 3 veces con 4 ml de etilacetato:etanol (1:1, v/v) centrifugando cada vez a $1.700 \times g$ durante 10 min, excepto la última vez que fueron 15 min con el fin de obtener pellets más compactos.

Finalmente, los pellets se redisolviéron en 2 ml de hidrocloreuro de guanidina 6M disuelta en fosfato potásico 20 mM, pH 2,3. Por último, se centrifugaron a $1.700 \times g$ durante 10 min y se realizaron las lecturas espectrofotométricas en los sobrenadantes.

B. Medida de los carbonilos proteicos

En cada muestra de DNPH se realizó en el espectrofotómetro un barrido desde 320 hasta 410 nm frente al correspondiente blanco de HCl. El máximo de absorbancia se utilizó para calcular los carbonilos proteicos (coeficiente de extinción $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La concentración de proteínas se determinó en las muestras de HCl utilizando como blanco hidrocloreuro de guanidina 6M a 280 nm.

La concentración de carbonilos proteicos se calculó en nmoles carbonilos por mg de proteína utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Carbonilos (nmoles/mg proteína)} = \frac{A_{\text{max}} \cdot 10^6}{A_{280} \cdot 1,8 \cdot \epsilon}$$

siendo:

- A_{max} : máximo de absorbancia entre 320 y 410 nm
- A_{280} : absorbancia a 280 nm de las muestras de HCl
- ϵ : coeficiente de extinción molar ($22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Para obtener el valor de la concentración de proteínas se realizó una curva patrón a partir de una solución de albúmina bovina a una concentración de 2 mg/ml de guanidina-HCl 6 M. La serie de concentraciones fue desde 0,2 hasta 2 mg albúmina/ml, obteniéndose una pendiente de 1,8 mg de proteína por unidad de absorbancia.

12. DETERMINACIÓN DE 8-OHdG

Los efectos inducidos por las especies reactivas de oxígeno sobre el ADN incluyen enlaces cruzados entre ADN y proteínas, rotura simple y doble de cadena, liberación de bases y modificaciones oxidativas de bases, algunas de las cuales han sido caracterizadas (Dizdaroglu, 1991).

Una de las bases del ADN más fácilmente oxidable es la guanina (Steenken, 1989) y la modificación oxidativa conocida más abundante es su hidroxilación en C-8 dando lugar a la formación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Mientras que el análisis de la mayoría de las bases modificadas requiere cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la 8-OHdG puede ser detectada mediante HPLC con detección electroquímica (EC) (Floyd *et al.*, 1986).

Además, recientemente se ha demostrado que la detección mediante HPLC-MS da lugar a valores artificialmente altos de 8-OHdG (Ravanat *et al.*, 1995). Por tanto, la técnica de elección actual es la determinación por HPLC con detección electroquímica de alta sensibilidad (coulométrica).

El balance entre 8-OHdG y la base no modificada, desoxiguanosina (dG), es un marcador ampliamente utilizado como medida del daño oxidativo al ADN, tanto en ADN aislado como en diferentes sistemas celulares y tejidos animales.

Este estudio se realizó en la Facultad de Ciencias de la Salud (Departamento de Farmacología) de la Universidad de Copenhague, Dinamarca.

El procedimiento de preparación de muestras seguido para la determinación de 8-OHdG y dG por HPLC se muestra en el esquema de la figura M.9.

A. Aislamiento del ADN

Las muestras de hígado fueron pesadas y homogeneizadas en NaCl al 0,9% a una concentración de 1 mg por cada μl de NaCl. Se utilizaron homogeneizadores de vidrio tipo Pobel. A cada 200 μl de homogeneizado se añadieron 1,8 ml de tampón Tris 10 mM con NaCl 150 mM y Na_2EDTA 10 mM, pH 8,0.

A continuación, se añadieron a cada muestra 200 μl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% y se agitaron en el vórtex durante 20 s. Las muestras se colocaron en un banco de extracción giratorio durante 15 min y posteriormente se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 10 min.

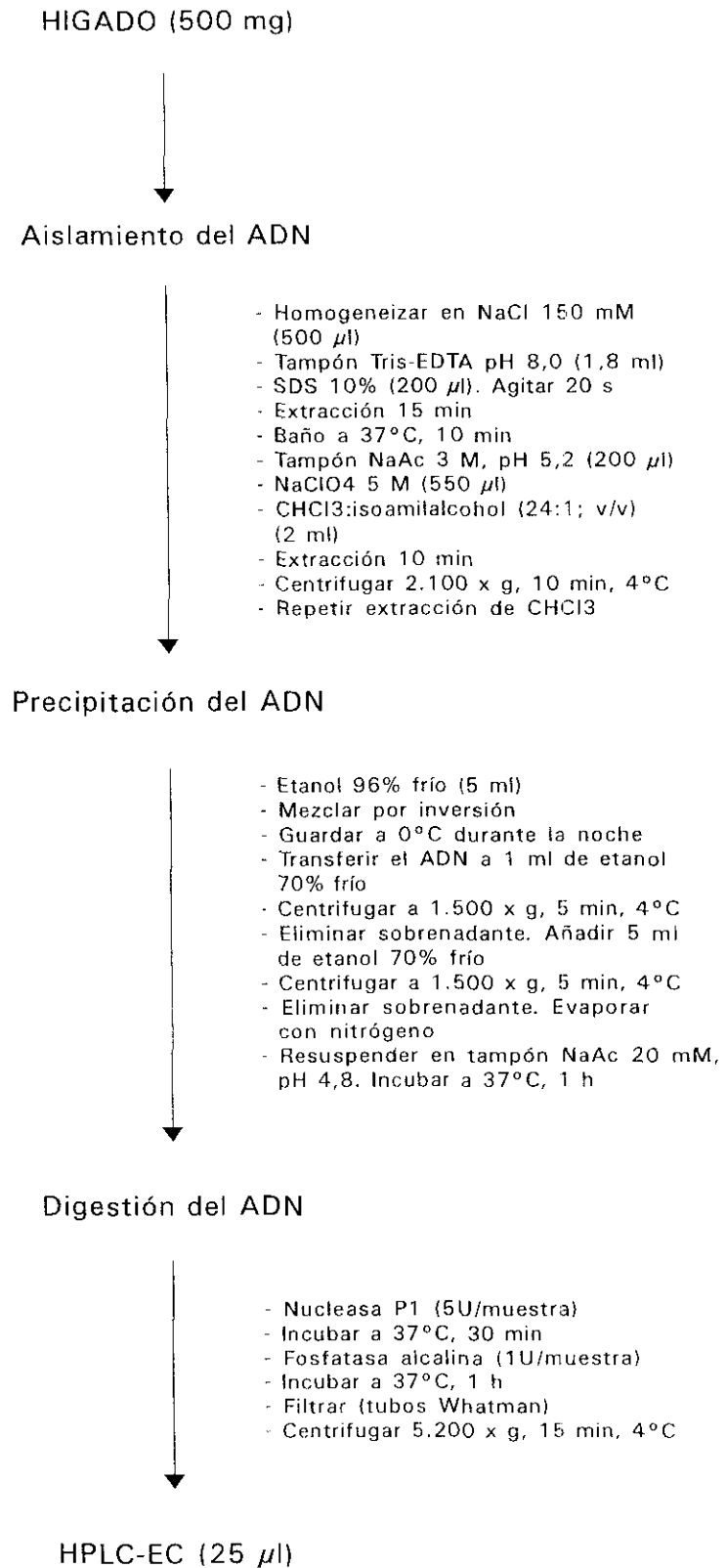


Figura M.9. Esquema del protocolo seguido en la preparación de muestras de hígado de cobaya para la determinación de 8-OHdG mediante HPLC-EC.

Las proteínas se eliminaron de las muestras mediante extracción con cloroformo (Marmur, 1961). A cada muestra se añadieron 200 μ l de tampón acetato sódico 3 M, pH 5,2 y seguidamente 550 μ l de NaClO₄ 5 M. Las muestras se transfirieron a tubos de polietileno, se añadieron 2 ml de cloroformo:alcohol isoamilo (24:1; v/v) y se colocaron en el banco de extracción durante 10 min. A continuación se centrifugaron a $2.100 \times g$ durante 10 min, a 4°C. Tras la centrifugación, las proteínas quedaron confinadas a la capa de interfase y el ADN a la capa superior no orgánica.

Se recogió la capa superior y se realizó una segunda extracción con 2 ml de cloroformo:alcohol isoamilo (24:1; v/v). Después de rotar y centrifugar las muestras de la misma manera que anteriormente, la capa superior se transfirió a tubos cónicos de polipropileno.

B. Precipitación del ADN

Para precipitar el ADN se añadieron lentamente a cada muestra 5 ml de etanol al 96% enfriado a 0°C y se mezcló por inversión. Las muestras se guardaron en el congelador a 0°C durante toda la noche.

A la mañana siguiente, el ADN fue transferido a tubos de plástico que contenían 1 ml de etanol al 70% enfriado a 0°C. Se centrifugó a $1.550 \times g$ durante 5 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante se añadieron 5 ml de etanol al 70% a 0°C y se centrifugó por segunda vez a $1.550 \times g$ durante 5 min a 4°C. De nuevo se eliminó el sobrenadante.

El etanol remanente se evaporó bajo atmósfera de N₂ durante 10 min aproximadamente. El residuo se redisolvió en 200 μ l de tampón acetato sódico 20 mM, pH 4,8 y se incubó en un baño de agua a 37°C durante 1 h.

C. Digestión del ADN

La digestión de 200 μ l de muestra se realizó primero con 20 μ l de nucleasa P1 (5U/muestra) disuelta en tampón acetato sódico 20 mM pH 4,8 que contenía ZnCl₂ 10 mM y 15% de glicerol. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 30 min.

A continuación se añadieron 20 μl de fosfatasa alcalina (1U/muestra) diluída en tampón Tris 1 M pH 8,0. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 1 hora.

Finalmente, se transfirieron 200 μl de muestra a tubos Whatman y se filtraron mediante centrifugación a $5.200 \times g$, durante 15 min a 4°C. Los filtrados se colocaron en un inyector automático Merck-Hitachi AS-2000 A y 25 μl fueron inyectados en el HPLC.

La digestión del ADN, así como su extracción y precipitación, se realizaron en condiciones de luz tenue para evitar la posible oxidación de la desoxiguanosina.

Todas las muestras se prepararon por duplicado y para los cálculos se utilizó la media de los valores obtenidos.

D. Solución estándar

La cuantificación de 8-OHdG se realizó mediante la inyección de concentraciones conocidas de 8-OHdG pura. Diariamente, antes de cada serie de análisis y después de las mismas, se inyectaron tres soluciones estándar de 8-OHdG 400, 40 y 4 nM diluído en acetato sódico 20 mM pH 4,8 y Tris 1 M pH 8,0 (11:1; v/v) a partir de una solución de 8-OHdG 8 μM . Seguidamente se inyectó un estándar de dG 100 μM diluído en acetato sódico 20 mM pH 4,8 y Tris 1 M pH 8,0 (11:1; v/v) a partir de dG 2 mM.

E. Condiciones cromatográficas

Una vez digerido el ADN con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina hasta el nivel de desoxinucleósidos, se determinaron los niveles de 8-OHdG y dG. Tras su separación por HPLC, el desoxinucleósido no modificado (dG) fue fácilmente cuantificado utilizando un detector ultravioleta Merck-Hitachi L-4000 a 254 nm (figura M.10).

Aunque el coeficiente de extinción molar para 8-OHdG es igual que para dG, la absorción ultravioleta no es suficientemente sensible para la determinación de 8-OHdG, debido a que la base modificada está presente sólo en muy pequeñas cantidades, siendo su nivel

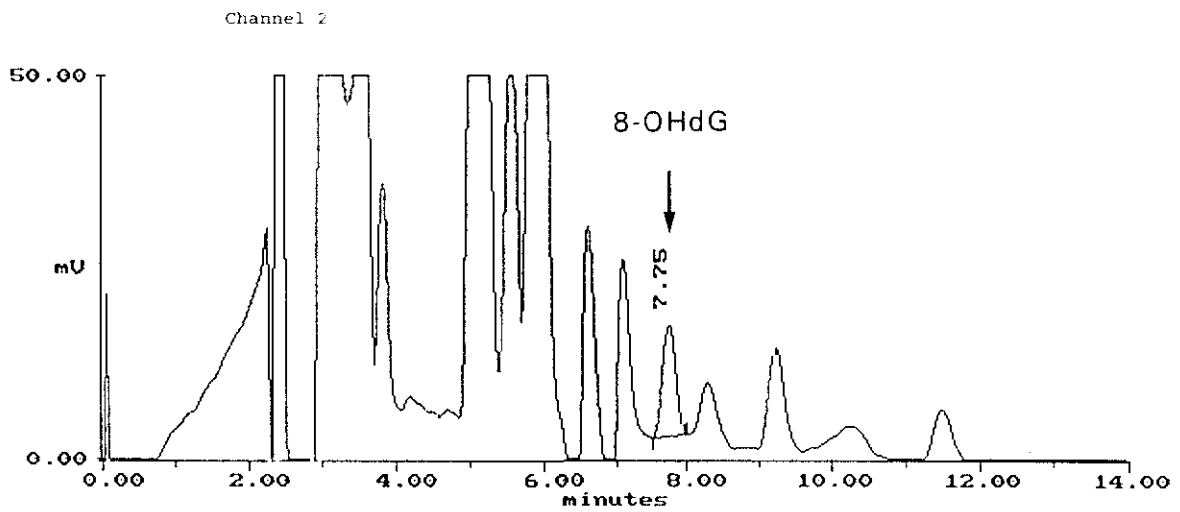
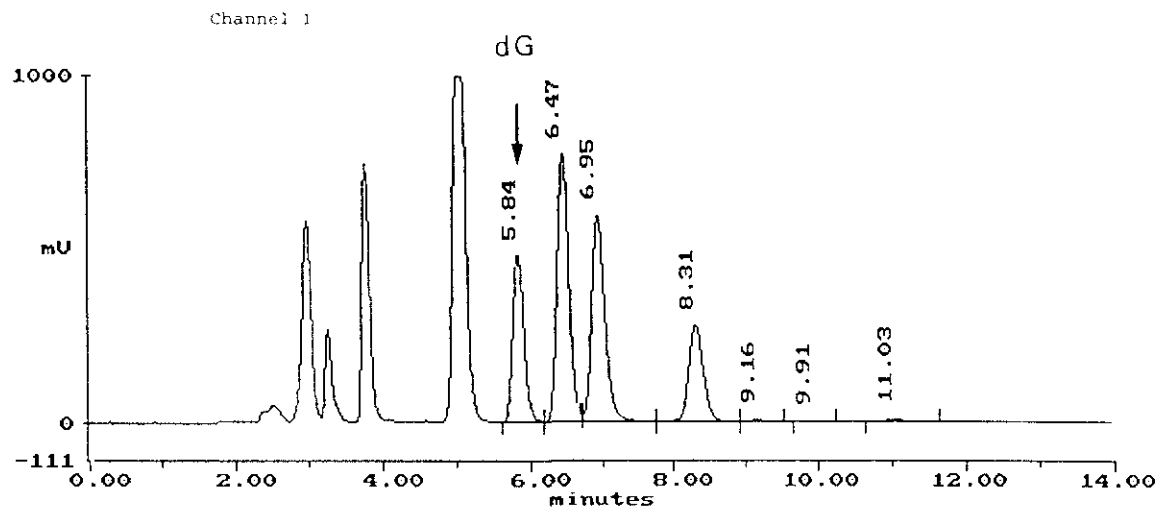


Figura M.10. Separación cromatográfica de dG (HPLC-UV) y 8-OHdG (HPLC-EC) en hígado de cobaya.

básico *in vivo* 0,5-5 8-OHdG/10⁵ dG. Por esto, la concentración de 8-OHdG en el ADN se determinó utilizando un sistema de HPLC con detección electroquímica coulométrica descrito originalmente por Floyd *et al.* (1986) (figura M.10).

Para determinar el potencial de voltaje óptimo para el compuesto específico y el equipo utilizado, se generó un voltamograma (medida de intensidad de la corriente en función del voltaje).

La cromatografía en fase reversa se llevó a cabo utilizando una columna Ultrasphere (25 cm × 4,6 mm) Beckman y un detector Coulochem II (ESA, Inc. Bedford, MA) con una célula analítica ESA modelo 5011 (E1 = 140 mV/100 nA; E2 = 180 mV/100 nA). El potencial preanalítico (E1) es demasiado bajo como para oxidar 8-OHdG y se utilizó para oxidar sustancias irrelevantes posiblemente presentes en las muestras.

La fase móvil fue H₃PO₄ 50 mM y 4% de acetonitrilo. El pH se ajustó a 3,2 con NaOH 5 M. A continuación, la fase móvil se filtró a través de filtros Millipore HVLP de 0,45 μm y fue bombeada por una bomba Merck-Hitachi L-6000. El flujo fue de 1 ml/min y la presión media de 98 bares. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 30°C mediante un termostatizador Merck L-5025.

A partir del área de los estándares de 8-OHdG se calculó un factor de calibración f(8-OHdG):

$$f(8-OHdG) = (400/S_{1i} + 40/S_{2i} + 4/S_{3i} + 400/S_{1f} + 40/S_{2f} + 4/S_{3f}) / 6$$

siendo:

- S_{1i,f}: área del estándar de 8-OHdG 400 nM inicial y final
- S_{2i,f}: área del estándar de 8-OHdG 40 nM inicial y final
- S_{3i,f}: área del estándar de 8-OHdG 4 nM inicial y final

Los datos de 8-OHdG se obtuvieron multiplicando el área de la muestra por el factor de calibración f(8-OHdG).

A partir de los estándares de dG se calculó un factor de calibración $f(dG)$:

$$f(dG) = 200 / (S_i + S_f)$$

siendo:

- $S_{i,f}$: área del estándar de dG 100 μM inicial y final

Los datos de dG se obtuvieron multiplicando el área de la muestra por el factor de calibración $f(dG)$.

Finalmente, se calculó la razón 8-OHdG/ 10^5 dG mediante la expresión:

$$8\text{-OHdG}/10^5\text{dG} = 100 \cdot C(8\text{-OHdG}) / C(dG)$$

siendo:

- $C(8\text{-OHdG})$: concentración de 8-OHdG de la muestra (nM)
- $C(dG)$: concentración de dG de la muestra (μM)

13. DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA

La concentración de productos de peroxidación lipídica en orina se refirió a la concentración de creatinina con el fin de eliminar las variaciones debidas a cambios en el volumen de orina excretada.

La creatinina se determinó en las muestras de orina diluída después de aplicar la reacción de Jaffé. Esta reacción consiste en la formación de picrato de creatinina en medio alcalino, formándose una sustancia de color ámbar cuantificable espectrofotométricamente.

Las muestras de orina se centrifugaron a $3.615 \times g$ durante 10 min a 4°C . Los sobrenadantes se recogieron y se mantuvieron en frío.

Con anterioridad al momento del ensayo experimental se preparó una solución de

ácido pícrico 1 mM y NaOH 1,6 M mezclando al 50% cada reactivo.

Las muestras de orina se diluyeron (1:49; v/v) con agua destilada. Se tomaron 0,5 ml de muestra y se añadió 1 ml de la solución de ácido pícrico y NaOH, se mezclaron bien y se incubaron durante 20 min a 25°C. También se preparó un blanco con 0,5 ml de agua destilada y un estándar con 0,5 ml de creatinina a una concentración de 2 mg/100 ml.

Al finalizar la incubación, se midió la absorbancia de las muestras y del estándar frente al blanco a 520 nm.

La concentración de creatinina se obtuvo aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Creatinina (mg/100 ml)} = C_e \cdot A/A_e \cdot f$$

siendo:

- C_e : concentración del estándar (2 mg/100 ml)
- A: absorbancia de la muestra
- A_e : absorbancia del estándar
- f: factor de dilución de la muestra (50)

14. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la valoración de proteínas se siguió la técnica colorimétrica descrita por Lowry *et al.* (1951). La técnica se basa en la reacción del reactivo de Folin (fosfomolibdotúngstico) con los grupos fenólicos de la tirosina, aminoácido que se encuentra a intervalos regulares de muchas proteínas, dando lugar a la formación de compuestos hemiquinónicos coloreados. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteína.

Previamente las proteínas se desnaturalizan de forma que todos los restos de tirosina quedan expuestos al medio acuoso. Para ello es necesaria la presencia de iones cobre que se unen a las proteínas formando un complejo Cu-proteína que deja accesibles las tirosinas al reactivo de Folin. Este complejo reduce al reactivo de Folin dando un compuesto coloreado, cuya intensidad se detecta por colorimetría.

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- reactivo A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N
- reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 1%
- reactivo C: $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartrato Na-K) al 2%

Una vez preparadas las muestras como se ha explicado en el apartado 4.A., se tomaron 0,05 ml de muestra a los que se añadieron 0,95 ml de agua destilada. En el caso de los blancos se utilizó 1 ml de agua destilada.

Se mezclaron 100 partes del reactivo A, 1 parte del reactivo B y 1 parte del C añadiéndose a cada tubo 5 ml de esta mezcla. Seguidamente, los tubos se mantuvieron en un baño de agua a 30°C con agitación durante 15 minutos.

A continuación, se añadieron 0,5 ml por tubo de reactivo Folin-Ciocalteau al 50% y se incubaron a la misma temperatura y también con agitación durante 30 minutos. La lectura colorimétrica se realizó a 546 nm.

La curva patrón de proteínas se construyó a partir de una solución patrón con una concentración de 8 mg/ml de albúmina bovina en agua destilada, y a partir de ésta las distintas diluciones. La serie de concentraciones fue desde 0,4 hasta 0,038 mg albúmina/0,05 ml, obteniéndose una recta de regresión con unos coeficientes a y b que se utilizaron para el cálculo de la concentración de proteínas de las muestras, mediante la siguiente expresión:

$$\text{Proteína (mg/mg tejido)} = \frac{DO-a}{b} \cdot \frac{1000/x}{V_m}$$

siendo:

- DO: absorbancia a 546 nm
- a: ordenada en el origen
- b: coeficiente de regresión
- V_m : volumen de muestra (50 μl)
- x: mg de tejido por cada ml de tampón empleado en la homogeneización

15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO

Una vez realizada la extracción de los lípidos totales según se describe en el apartado 7.A., se llevó a cabo la determinación de la concentración de fósforo mediante el método de Bartlett (1959) utilizando ácido perclórico al 72% en lugar de H_2SO_4 y H_2O_2 para digerir las muestras.

Se tomaron 5 μ l de la solución de lípidos totales de hígado y 10 μ l en el caso del plasma. Todas las muestras se determinaron por duplicado. Las muestras fueron digeridas con 400 μ l de $HClO_4$ al 72% y calentadas a 180°C durante 2 h.

A continuación, las muestras fueron enfriadas en un baño de agua durante 15 min aproximadamente y se añadieron 4,2 ml de agua destilada a cada tubo.

Seguidamente se añadieron 0,2 ml de molibdato amónico al 5% y 0,2 ml de una solución de amidol (dihidrocloruro de 2,4-diaminofenol) al 1% y sulfito monosódico al 20% previamente filtrada y preparada en el día. Las muestras fueron agitadas en el vórtex y calentadas en agua hirviendo durante 15 min.

Finalmente, las muestras fueron enfriadas y se midió la absorbancia a 830 nm en un espectrofotómetro JASCO Ubest-35.

Se realizó una curva de calibración utilizando una solución estándar de fosfolípidos a partir de KH_2PO_4 a una concentración final en equivalentes de fosfolípidos (PL) de 6 μ g/ μ l. La serie de concentraciones fue desde 60 hasta 240 μ g PL/tubo. También se preparó un blanco en ausencia de estándar.

El cálculo de la concentración de fósforo en los lípidos totales de las muestras de hígado y plasma se realizó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Fósforo } (\mu\text{g/g tejido o ml plasma}) = \frac{DO-a}{b} \cdot \frac{V_r/x}{V_m \cdot 25}$$

siendo:

- DO: absorbancia a 830 nm
- a: ordenada en el origen
- b: coeficiente de regresión
- V_m : volumen de muestra (5 μ l; 10 μ l)
- V_r : volumen de resuspensión (200 μ l; 100 μ l)
- x: g de tejido ó ml de plasma

IV. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

1. CARACTERÍSTICAS MUESTRALES

Los datos se analizaron estadísticamente obteniéndose de cada grupo:

- media aritmética (\bar{x})
- desviación típica de la muestra (s)
- error típico o estándar de la media (e)

Todos los resultados que se muestran en este trabajo están expresados como media aritmética \pm error estándar.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el análisis de los datos obtenidos se realizaron los siguientes tratamientos estadísticos.

A. Test t de Student

Los resultados obtenidos en cobayas controles y tratados con AT se compararon utilizando el test t de Student y se seleccionó un nivel de $p < 0,05$ como el punto de mínima diferencia significativa.

B. Análisis de la varianza

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para el análisis del efecto del tratamiento sobre los parámetros valorados en hígado y corazón de cobaya y en la orina humana. También se utilizó para analizar la variación del peso corporal, la ingesta de alimento y la peroxidación lipídica *in vitro* en función del tiempo de tratamiento, dentro de cada grupo experimental.

En el experimento de suplementación con vitaminas en ratas ODS, se analizó mediante ANOVA de una vía el efecto de los diferentes niveles de vitamina C en cada nivel de vitamina E y de vitamina E en cada nivel de vitamina C sobre los parámetros estudiados.

Mediante ANOVA de dos vías se estudió la posible interacción entre la suplementación con vitamina C y el tratamiento con AT, así como entre la suplementación con vitaminas y los valores de peroxidación lipídica *in vitro* en función del tiempo de incubación. También se estudió la interacción entre la suplementación con vitaminas C y E y los valores de TBA en función del tiempo de suplementación en la orina humana.

En todos los casos se seleccionó un nivel de $p < 0,05$ como el punto de significación estadística mínima en cada comparación.

C. Test de Fisher de mínima diferencia significativa

El test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD) se aplicó *a posteriori*, a fin de precisar las diferencias entre pares de grupos, en los casos en que el ANOVA previo resultó significativo.

D. Test de Bartlett

Este test se utilizó para estudiar la igualdad de varianzas entre grupos.

En el experimento de suplementación con vitaminas C y E en ratas ODS se realizó una transformación logarítmica de los datos cuando las varianzas eran significativamente diferentes.

RESULTADOS

I. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA DIETA EN EL HÍGADO Y EL CORAZÓN DE COBAYA.

En este estudio los cobayas fueron suplementados con 33 (C BAJA), 660 (C MEDIA) ó 13.200 (C ALTA) mg vitamina C/kg dieta, y con 15 mg vitamina E/kg dieta, durante 5 semanas.

1. PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

Tras la primera semana de suplementación con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta, no se detectaron diferencias en el peso corporal ni en la ingesta de alimento entre los tres grupos de animales. Sin embargo, al finalizar el período experimental, el peso corporal resultó significativamente mayor (25-31 %) en el grupo C MEDIA que en los otros dos grupos (tabla 1).

El grupo C BAJA presentó una ingesta significativamente menor que la de los otros dos grupos en la quinta semana (tabla 2), y fue el único grupo experimental que no aumentó significativamente su peso durante las cinco semanas de tratamiento.

2. HÍGADO

A. Ácido ascórbico y α -tocoferol

El contenido hepático de vitamina C aumentó significativamente del grupo C BAJA a los grupos C MEDIA y C ALTA ($p < 0,001$; figura 1a y tabla 3).

No se encontraron diferencias en los niveles de vitamina E entre los tres grupos de animales (figura 1b y tabla 3).

Tabla 1. Peso corporal de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

PESO CORPORAL (g)			
	C BAJA	C MEDIA	C ALTA
SEMANA 1	265,4 ± 6,5 (13)	252,3 ± 9,5 (7) ***	253,9 ± 8,5 (13) *
SEMANA 5	282,3 ± 19,5 (11)	** 369,0 ± 21,5 (8)	** 294,2 ± 15,4 (13)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los asteriscos situados verticalmente indican diferencias respecto al tiempo de tratamiento; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

Tabla 2. Ingesta diaria de alimento de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

INGESTA DE ALIMENTO (g/cobaya.día)			
	C BAJA	C MEDIA	C ALTA
SEMANA 1	16,4 ± 0,8 (13) ***	17,5 ± 2,1 (7) ***	17,3 ± 1,1 (13) ***
SEMANA 5	33,6 ± 0,8 (11)	** 44,8 ± 1,8 (8)	43,9 ± 3,2 (13)**

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; los asteriscos situados verticalmente indican diferencias respecto al tiempo de tratamiento; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

Tabla 3. Vitamina C, vitamina E y razón GSH/GSSG en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	C BAJA		C MEDIA	C ALTA
VITAMINA C	0,034 ± 0,021 (6)	***	1,63 ± 0,38 (8)	1,99 ± 0,17 (7)***
VITAMINA E	17,0 ± 5,5 (6)		15,7 ± 1,7 (8)	16,8 ± 2,0 (7)
GSH/GSSG	11,2 ± 1,6 (6)		15,7 ± 2,6 (8)	14,4 ± 1,1 (7)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (μ moles/g tejido) y vitamina E (μ g/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; ***p < 0,001.

HIGADO

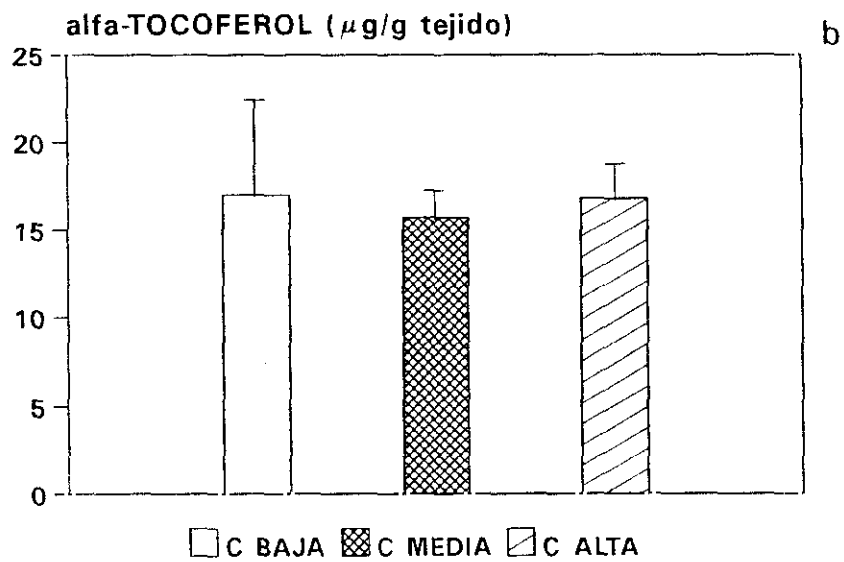
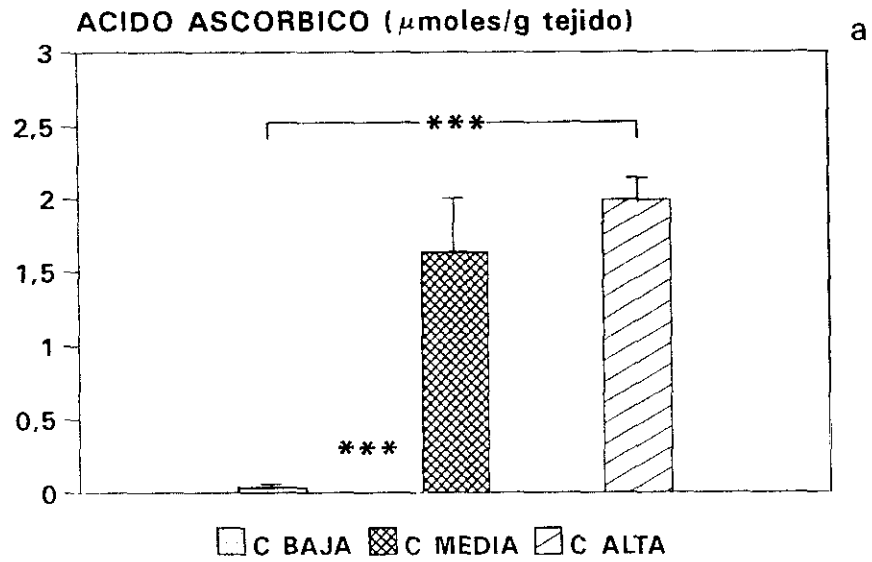


Figura 1. Concentración hepática de ácido ascórbico (a) y α -tocoferol (b) en cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: *** $p < 0,001$.

B. Razón GSH/GSSG

La razón GSH/GSSG no se modificó de manera significativa en los tres grupos estudiados, aunque el grupo C BAJA presentó niveles menores (figura 2a y tabla 3).

C. MDA libre

El contenido en MDA libre, medido directamente por HPLC, resultó más alto en el grupo C BAJA que en los grupos C MEDIA y C ALTA ($p < 0,05$; figura 2b y tabla 4).

D. Daño oxidativo a proteínas

Los niveles de carbonilos proteicos aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en el grupo C BAJA respecto a los grupos C MEDIA y C ALTA (figura 3a y tabla 4).

E. Daño oxidativo al ADN

La razón 8-OHdG/ 10^5 dG no mostró diferencias significativas entre los tres grupos de cobayas (figura 3b y tabla 4).

F. Peroxidación lipídica (TBARS)

Los niveles endógenos de productos de peroxidación lipídica (TBARS a 0 min) no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales.

La incubación *in vitro* de los sobrenadantes hepáticos con ascorbato- Fe^{2+} incrementó la peroxidación lipídica (TBARS) en los tres grupos de animales. Sin embargo, los valores de TBA resultaron significativamente mayores en el grupo C BAJA que en los otros dos grupos ($p < 0,05$; figura 4 y tabla 5).

HIGADO

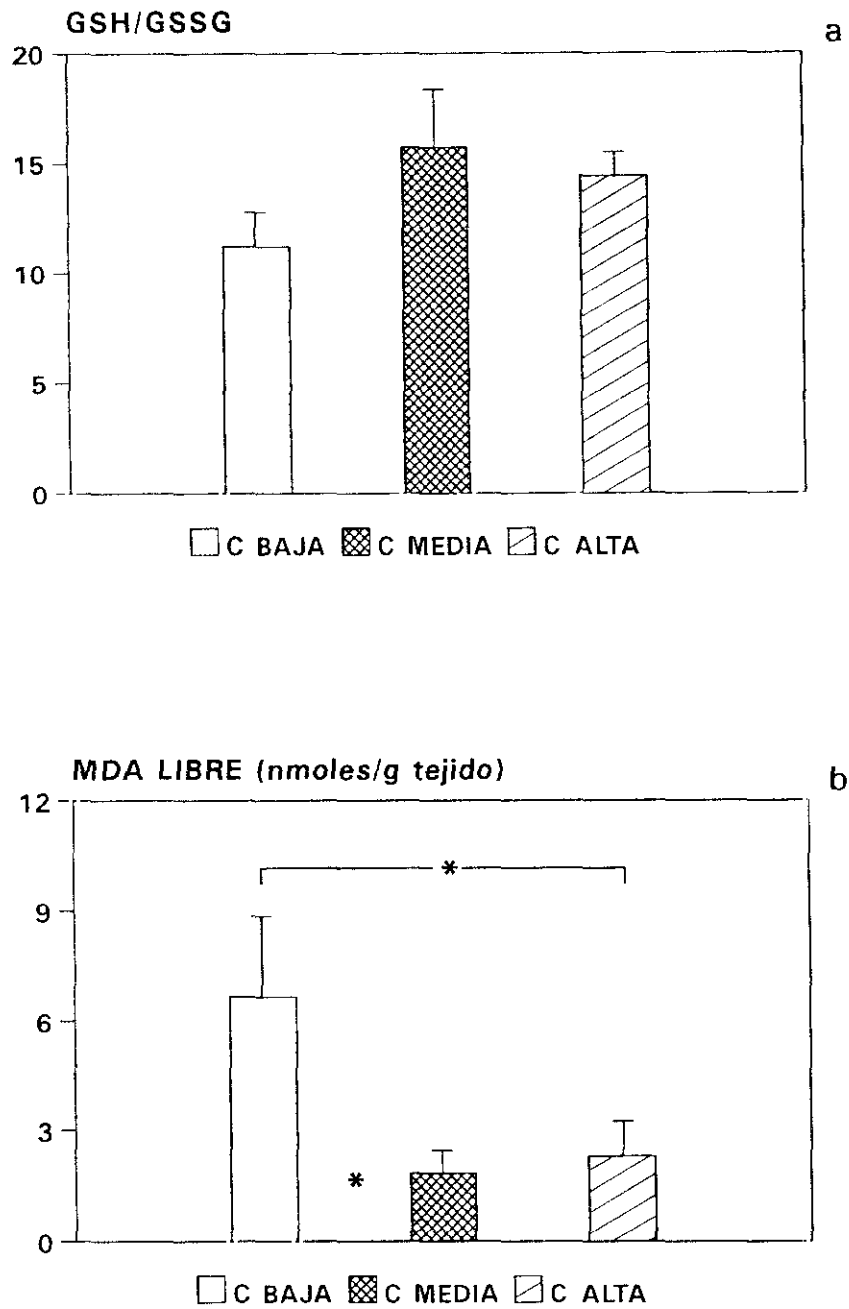


Figura 2. Razón GSH/GSSG (a) y contenido en MDA libre (b) en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 4. Malondialdehído (MDA) libre (HPLC), carbonilos proteicos y 8-OHdG, estimadores del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	C BAJA	C MEDIA	C ALTA
MDA LIBRE	6,66 ± 2,26 (6) *	1,83 ± 0,62 (8)	2,29 ± 0,96 (7)*
CARBONILOS	9,09 ± 1,29 (5) *	4,76 ± 1,16 (8)	3,33 ± 1,59 (7)*
8-OHdG/10 ⁵ dG	1,89 ± 0,13 (6)	1,94 ± 0,28 (8)	1,93 ± 0,25 (7)

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar. MDA (nmoles/g tejido) y carbonilos proteicos (nmoles/mg proteína). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; *p < 0,05.

HIGADO

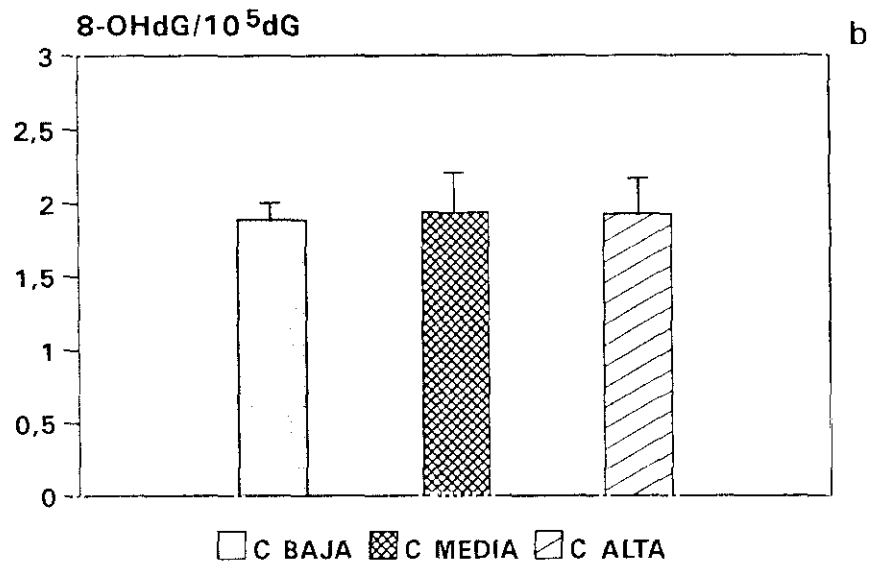
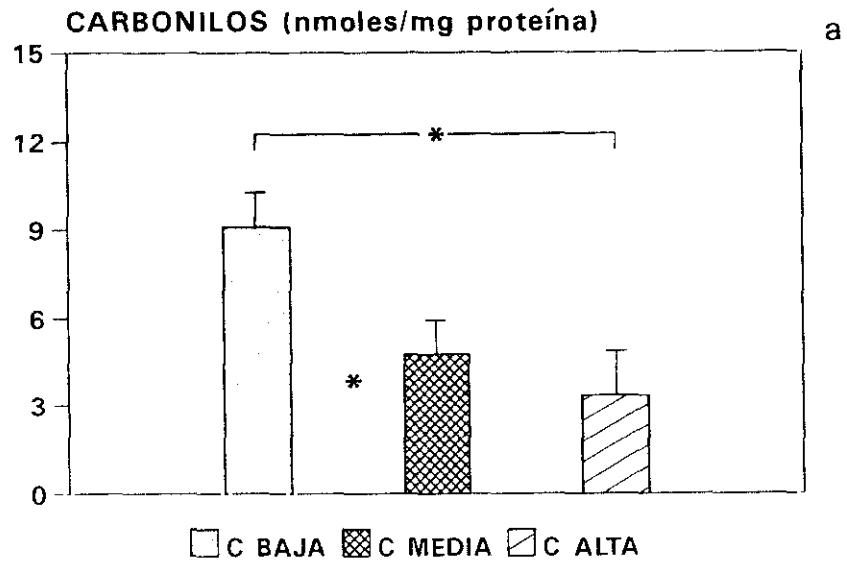


Figura 3. Contenido en carbonilos proteicos (a) y 8-OHdG (b) en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 5. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

TBA (nmoles MDA/g tejido)			
TIEMPO	C BAJA	C MEDIA	C ALTA
0 min	115,3 ± 24,9 (6)	82,6 ± 10,2 (8)	103,5 ± 9,5 (7)
30 min	246,3 ± 122,4 (6)	124,8 ± 48,5 (8)	129,2 ± 24,0 (7)
60 min	432,7 ± 166,3 (6)	184,0 ± 81,6 (8)	156,7 ± 21,1 (7)
90 min	650,3 ± 248,5 (6) ^{b*}	* 203,1 ± 95,4 (8)	266,0 ± 78,6 (7) ^{a*b**c*}

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar. El número de datos de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan: a: diferencias respecto al grupo C BAJA; b: diferencias respecto a tiempo 0 min; c: diferencias respecto a tiempo 30 min; *p < 0,05 y **p < 0,01.

HIGADO

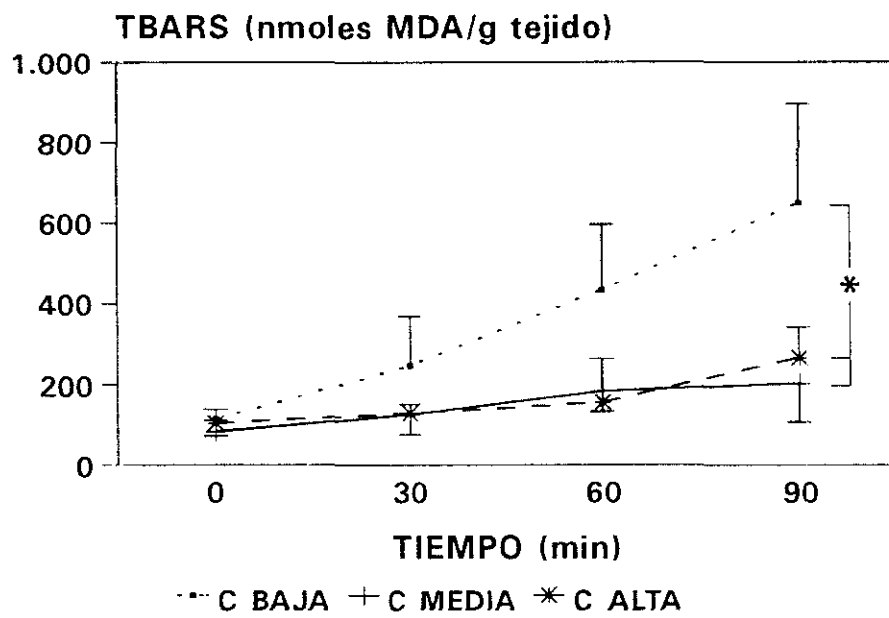


Figura 4. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

G. Composición en ácidos grasos

En la fracción de **fosfatidiletanolamina** la relación de los ácidos grasos insaturados/saturados aumentó significativamente en el grupo C MEDIA respecto a los otros dos grupos (figura 5a y tabla 6). Esto fue debido principalmente, tanto en el grupo C BAJA como en el C ALTA, a un notable incremento en 18:0 y una desaparición total de 18:1. En los grupos C BAJA y C ALTA también disminuyó 16:1. Se encontraron valores más altos de 22:5 en el grupo C BAJA que en los otros dos grupos.

El índice de insaturación, una estimación del número total de dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados, disminuyó significativamente del grupo C MEDIA al C ALTA (figura 5b). El perfil de ácidos grasos de los grupos C BAJA y C ALTA resultó casi idéntico (incluyendo los índices de insaturación) excepto en el caso del valor de 22:5, más bajo en el grupo C ALTA.

Los cambios en la fracción de **fosfatidilcolina** fueron cuantitativamente menores o presentaron una menor significación estadística que los encontrados en las demás fracciones de lípidos de membrana (tabla 7). En el grupo C BAJA, 16:1, 18:1 y la relación insaturados/saturados (figura 6a) disminuyeron y 22:5 aumentó respecto al grupo C MEDIA.

En el grupo C ALTA, 16:0 y 18:1 disminuyeron y 20:4 y 22:6 aumentaron en relación al grupo C MEDIA, aunque no se encontraron cambios en los índices de insaturación (figura 6b). El grupo C ALTA mostró niveles menores de 16:0 y mayores de 22:6 que el grupo C BAJA.

En la fracción de **lisofosfatidilcolina**, se observaron incrementos significativos en 18:0 y una desaparición total de 18:1 en los grupos C BAJA y C ALTA. En este caso, 16:1 también desapareció completamente en estos dos grupos. Como consecuencia, la relación insaturados/saturados y el índice de insaturación (figura 7 y tabla 8) descendieron en los grupos C BAJA y C ALTA respecto al grupo C MEDIA. Se observó un aumento de 18:2 del grupo C MEDIA al grupo C ALTA. En esta fracción lipídica, 16:0 fue menor y los dos índices de insaturación y 18:2 resultaron mayores en el grupo C ALTA que en el grupo C BAJA (tabla 8).

Tabla 6. Composición en ácidos grasos de la fracción de fosfatidiletanolamina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	C BAJA		C MEDIA		C ALTA
16:0	6,44 ± 1,58		7,78 ± 1,06		6,57 ± 0,96
16:1	0,87 ± 0,35	*	1,38 ± 0,30	*	1,03 ± 0,32
18:0	44,55 ± 1,09	**	37,62 ± 4,19	**	44,05 ± 2,22
18:1	0,00 ± 0,00	***	5,03 ± 0,78	***	0,00 ± 0,00
18:2	26,62 ± 2,04		28,34 ± 1,74		28,41 ± 2,88
20:4	17,92 ± 2,94		16,58 ± 2,00		17,61 ± 2,11
22:5	2,13 ± 0,66	***	0,85 ± 0,25		0,66 ± 0,08***
22:6	1,56 ± 0,40		1,39 ± 0,26		1,37 ± 0,43
INSAT/SAT	0,96 ± 0,03	**	1,18 ± 0,12	***	0,97 ± 0,04
ÍNDICE INSAT	2,86 ± 0,23		3,15 ± 0,37	*	2,76 ± 0,17

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 6 (C BAJA), 8 (C MEDIA) y 7 (C ALTA) animales. Ácidos grasos (mol%); insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σmol% ácidos grasos insaturados y Σmol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σmol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/Σmol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

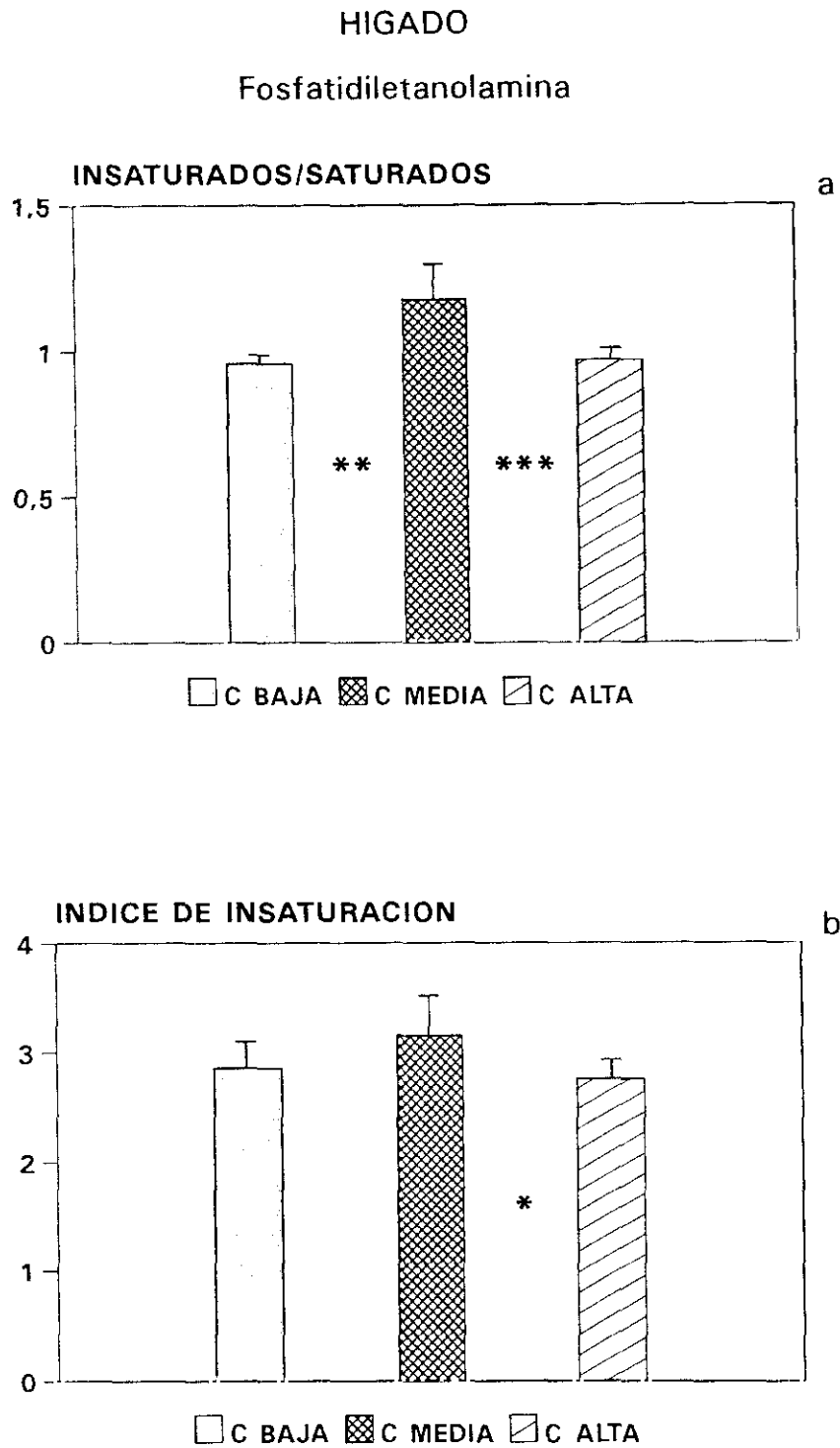


Figura 5. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de fosfatidiletanolamina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Tabla 7. Composición en ácidos grasos de la fracción de fosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	C BAJA		C MEDIA		C ALTA
14:0	0,32 ± 0,10		0,24 ± 0,04		0,34 ± 0,08
16:0	18,54 ± 0,87		18,02 ± 1,18	*	16,52 ± 1,22**
16:1	0,67 ± 0,14	*	0,95 ± 0,20		0,86 ± 0,21
18:0	28,68 ± 0,87		28,18 ± 1,06		29,44 ± 1,58
18:1	9,00 ± 1,40	*	10,81 ± 1,17	***	7,96 ± 0,63
18:2	36,55 ± 2,11		36,92 ± 1,95		36,82 ± 2,12
18:3	0,34 ± 0,13		0,35 ± 0,10		0,40 ± 0,29
20:2	0,35 ± 0,12		0,29 ± 0,06		0,35 ± 0,07
20:3	0,31 ± 0,07		0,32 ± 0,07		0,24 ± 0,06
20:4	4,14 ± 0,90		3,69 ± 0,54	*	5,10 ± 1,26
22:5	0,40 ± 0,14	**	0,22 ± 0,04		0,33 ± 0,10
22:6	0,30 ± 0,06		0,32 ± 0,07	**	0,49 ± 0,11**
INSAT/SAT	1,08 ± 0,04	*	1,15 ± 0,04		1,12 ± 0,04
ÍNDICE INSAT	2,21 ± 0,12		2,28 ± 0,11		2,37 ± 0,14

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 6 (C BAJA), 8 (C MEDIA) y 7 (C ALTA) animales. Ácidos grasos (mol%); insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σmol% ácidos grasos insaturados y Σmol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σmol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/Σmol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

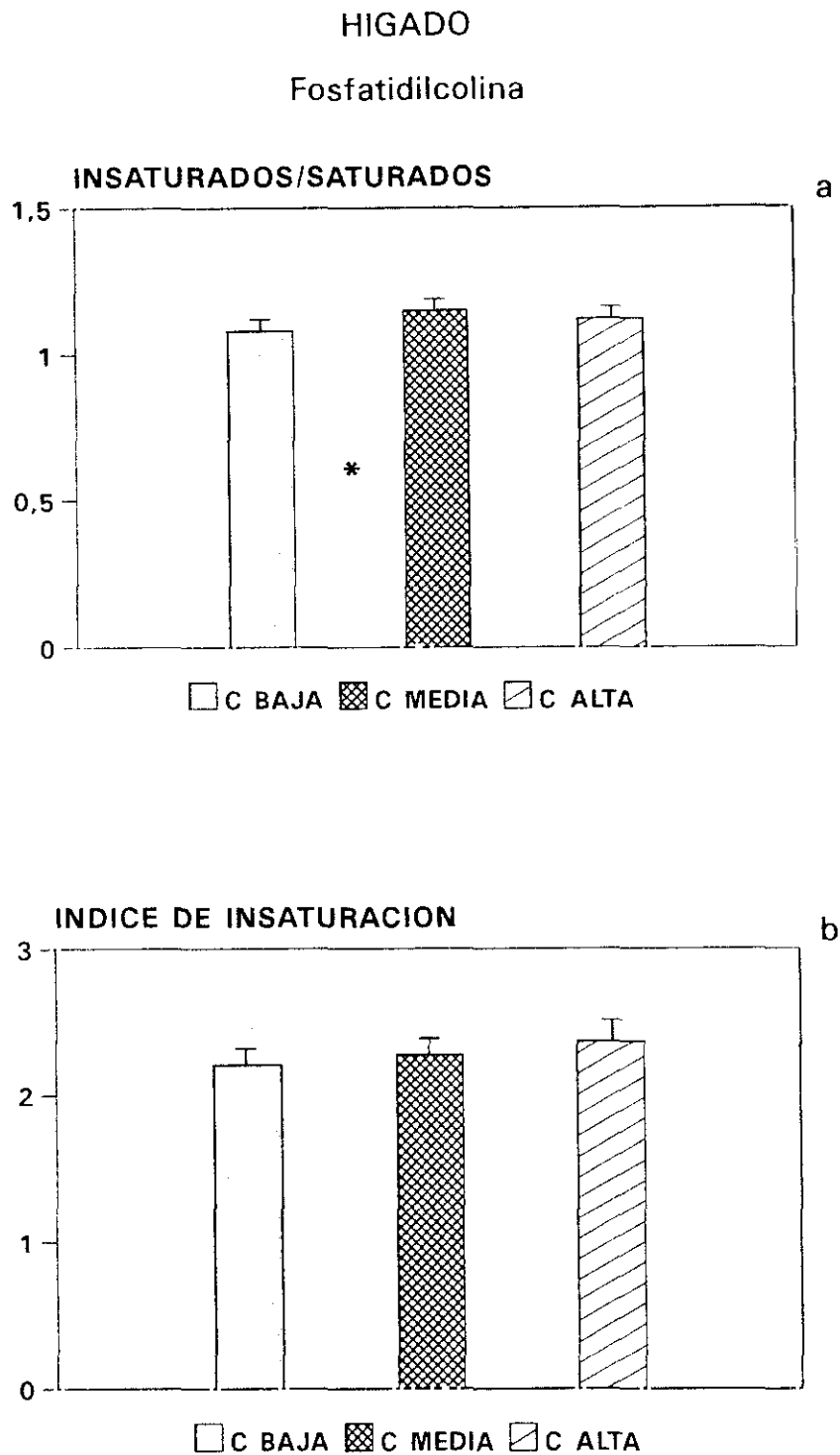


Figura 6. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de fosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 8. Composición en ácidos grasos de la fracción de lisofosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	C BAJA		C MEDIA		C ALTA
16:0	12,73 ± 3,07		10,59 ± 1,39		9,62 ± 0,84*
16:1	0,00 ± 0,00	**	1,27 ± 0,42	**	0,00 ± 0,00
18:0	58,50 ± 5,46	**	44,64 ± 3,36	**	55,35 ± 2,71
18:1	0,00 ± 0,00	**	10,96 ± 3,04	**	0,00 ± 0,00
18:2	18,35 ± 2,16		21,04 ± 3,44	*	24,80 ± 1,78**
20:4	10,25 ± 1,99		11,78 ± 2,26		10,16 ± 1,84
INSAT/SAT	0,40 ± 0,07	**	0,81 ± 0,07	**	0,53 ± 0,04**
ÍNDICE INSAT	1,10 ± 0,21	**	1,84 ± 0,24	**	1,39 ± 0,14*

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 6 (C BAJA), 8 (C MEDIA) y 7 (C ALTA) animales. Ácidos grasos (mol%); insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σ mol% ácidos grasos insaturados y Σ mol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σ mol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/ Σ mol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; *p < 0,05 y **p < 0,01.

HIGADO

Lisofosfatidilcolina

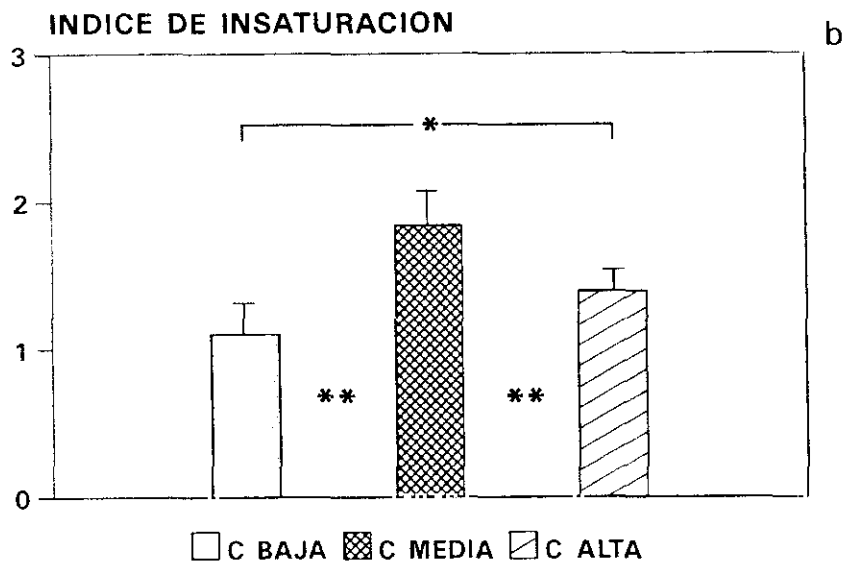
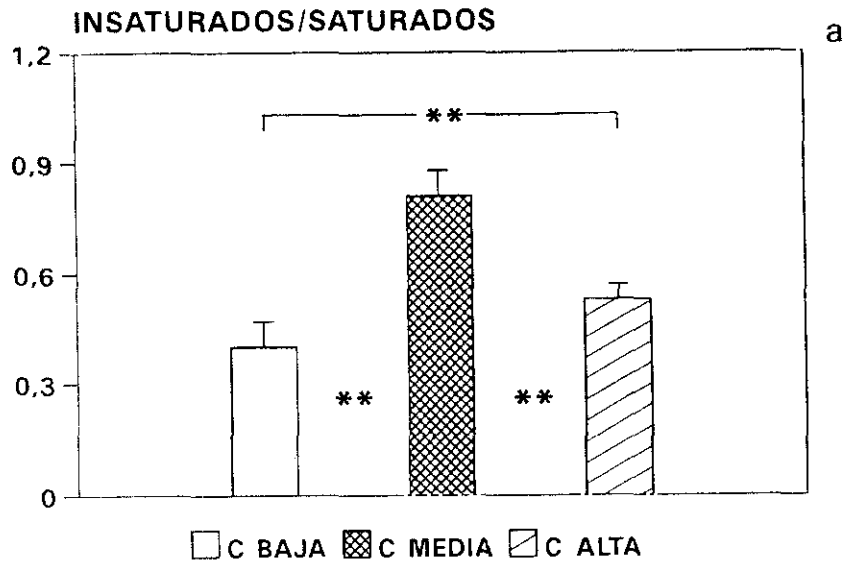


Figura 7. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de lisofosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

En la fracción de **esfingomielina**, análogamente a lo encontrado en la fracción de fosfatidiletanolamina, la relación insaturados/saturados también descendió en los grupos C BAJA y C ALTA respecto al grupo C MEDIA (figura 8a y tabla 9). Esto fue debido, en ambos casos, a un incremento significativo en 18:0 y una desaparición total de 18:1. También se observó un aumento significativo de 20:4 en los grupos C BAJA y C ALTA respecto a C MEDIA.

El grupo C ALTA mostró valores más bajos de 16:0 que los otros dos grupos. Esta fue la única diferencia encontrada entre los grupos C BAJA y C ALTA, ya que el resto de los ácidos grasos y los índices de insaturación (figura 8b) mostraron valores similares en estos dos grupos.

En resumen, en los lípidos de membrana, tanto el déficit como el exceso de vitamina C produce una pérdida de insaturación centrada fundamentalmente en la pérdida de monoinsaturados (18:1 especialmente) compensada, sólo en parte, por ácidos grasos con 4, 5 ó 6 dobles enlaces.

El patrón de ácidos grasos en la fracción de **triglicéridos** resultó similar en los tres grupos, excepto un incremento de 18:0 en los grupos C BAJA y C ALTA respecto al grupo C MEDIA (tabla 10). En este caso, no se encontraron cambios en los índices de insaturación (figura 9).

Tabla 9. Composición en ácidos grasos de la fracción de esfingomielina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	C BAJA		C MEDIA		C ALTA
16:0	17,64 ± 1,23		17,80 ± 2,40	*	14,63 ± 1,75**
18:0	40,05 ± 2,88	***	33,96 ± 1,88	***	41,44 ± 1,35
18:1	0,00 ± 0,00	***	5,46 ± 0,80	***	0,00 ± 0,00
18:2	25,61 ± 1,85		28,81 ± 2,99		28,32 ± 3,18
20:4	14,46 ± 1,81	***	10,76 ± 1,40	*	12,81 ± 1,54
22:0	2,16 ± 0,39		3,16 ± 0,99		2,77 ± 0,72
INSAT/SAT	0,67 ± 0,07	*	0,82 ± 0,13	*	0,70 ± 0,08
ÍNDICE INSAT	1,83 ± 0,22		1,95 ± 0,34		1,84 ± 0,20

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 6 (C BAJA), 8 (C MEDIA) y 7 (C ALTA) animales. Ácidos grasos (mol%); insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σ mol% ácidos grasos insaturados y Σ mol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σ mol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/ Σ mol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

HIGADO
Esfingomielina

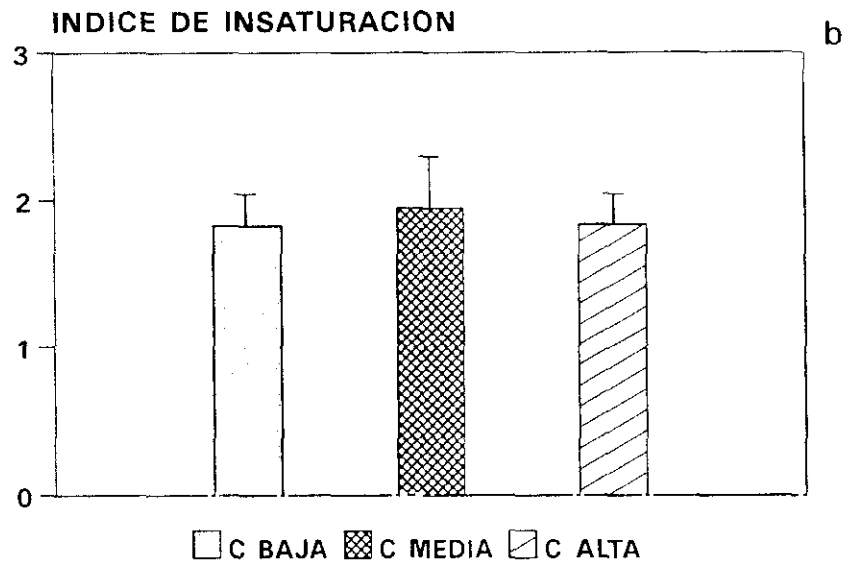
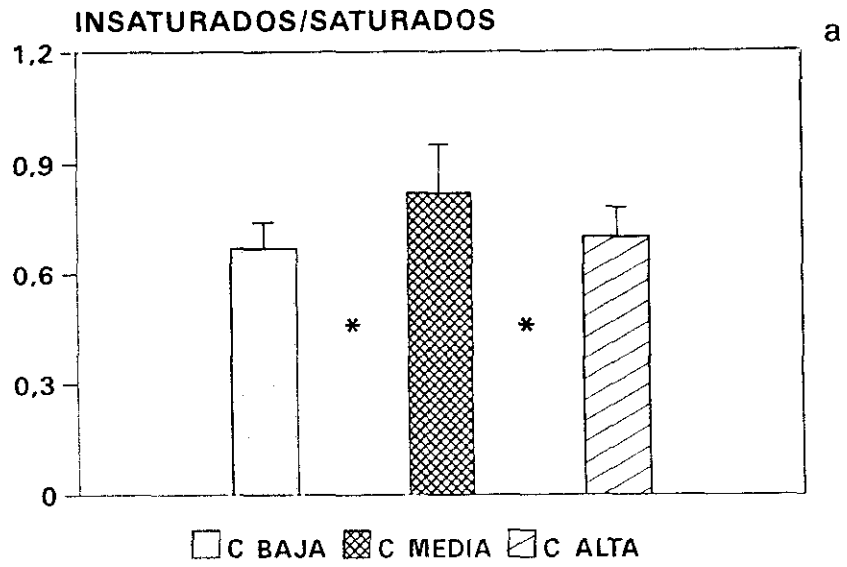


Figura 8. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de esfingomielina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 10. Composición en ácidos grasos de la fracción de triglicéridos de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	C BAJA		C MEDIA		C ALTA
16:0	27,10 ± 2,08		28,36 ± 2,40		27,77 ± 1,96
18:0	8,09 ± 1,87	*	5,87 ± 1,54	*	7,72 ± 1,52
18:1	24,39 ± 1,81		25,64 ± 1,66		24,03 ± 0,69
18:2	38,50 ± 1,96		37,77 ± 3,20		37,62 ± 0,93
18:3	2,04 ± 0,20		2,60 ± 0,86		2,52 ± 0,40
INSAT/SAT	1,84 ± 0,09		1,95 ± 0,30		1,81 ± 0,07
ÍNDICE INSAT	3,05 ± 0,17		3,23 ± 0,57		3,01 ± 0,13

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 6 (C BAJA), 8 (C MEDIA) y 7 (C ALTA) animales. Ácidos grasos (mol%); insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σmol% ácidos grasos insaturados y Σmol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σmol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/Σmol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; *p < 0,05.

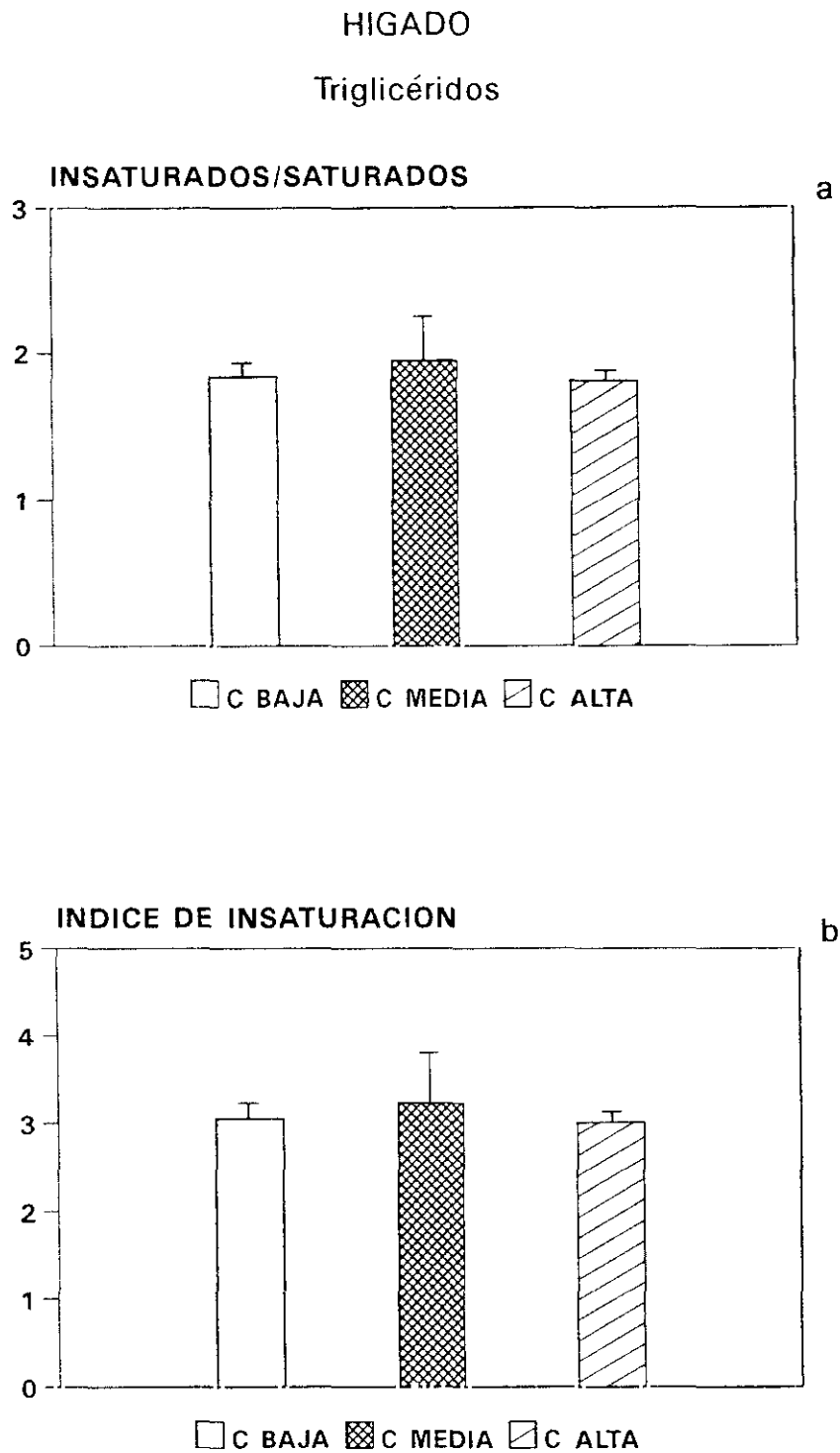


Figura 9. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de triglicéridos de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

3. CORAZÓN

A. Ácido ascórbico y α -tocoferol

Los animales del grupo C BAJA mostraron una carencia total de vitamina C en el corazón. Respecto a este tejido, pueden considerarse animales deficientes en vitamina C a pesar de que durante el período experimental ingirieron 0,5-1,1 mg de vitamina C diarios, cantidad mínima necesaria para evitar el desarrollo de escorbuto en cobayas. El contenido en vitamina C del corazón aumentó significativamente del grupo C BAJA al grupo C MEDIA y de éste al grupo C ALTA (figura 10a y tabla 11).

Aunque no se encontraron diferencias significativas en la concentración de vitamina E del corazón entre los tres grupos, se observó una tendencia a aumentar a medida que aumentaban los niveles de vitamina C (figura 10b y tabla 11).

B. Razón GSH/GSSG

No se observaron diferencia significativas en la razón GSH/GSSG entre los tres grupos de animales (figura 11a y tabla 11).

C. MDA libre

Los niveles de MDA libre (HPLC) fueron menores en el grupo C BAJA que en los otros dos grupos (figura 11b y tabla 12). No se observaron diferencias significativas entre los grupos C MEDIA y C ALTA.

D. Peroxidación lipídica (TBARS)

Los niveles endógenos de peroxidación lipídica (TBARS a 0 min) resultaron similares en los tres grupos experimentales, así como los valores de TBA obtenidos tras la incubación de la muestras *in vitro* con ascorbato- Fe^{2+} (figura 12 y tabla 13).

Tabla 11. Vitamina C, vitamina E y razón GSH/GSSG en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

CORAZÓN

	C BAJA		C MEDIA		C ALTA
VITAMINA C	0,0 ± 0,0 (4)	**	135,5 ± 20,6 (5)	**	264,7 ± 38,0 (5)***
VITAMINA E	10,2 ± 1,2 (5)		11,1 ± 1,0 (7)		11,9 ± 1,3 (7)
GSH/GSSG	2,09 ± 0,99 (6)		1,26 ± 0,33 (8)		1,39 ± 0,32 (7)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (nmoles/g tejido) y vitamina E ($\mu\text{g/g}$ tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

CORAZON

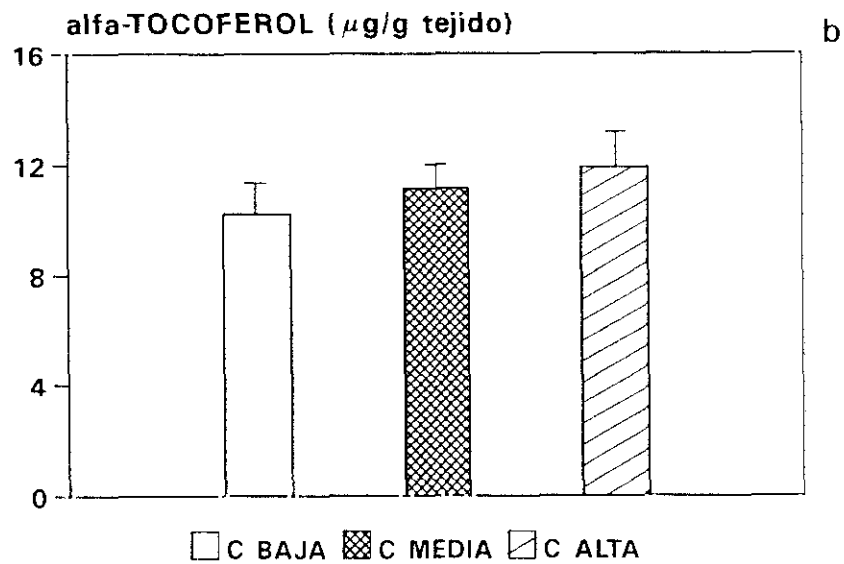
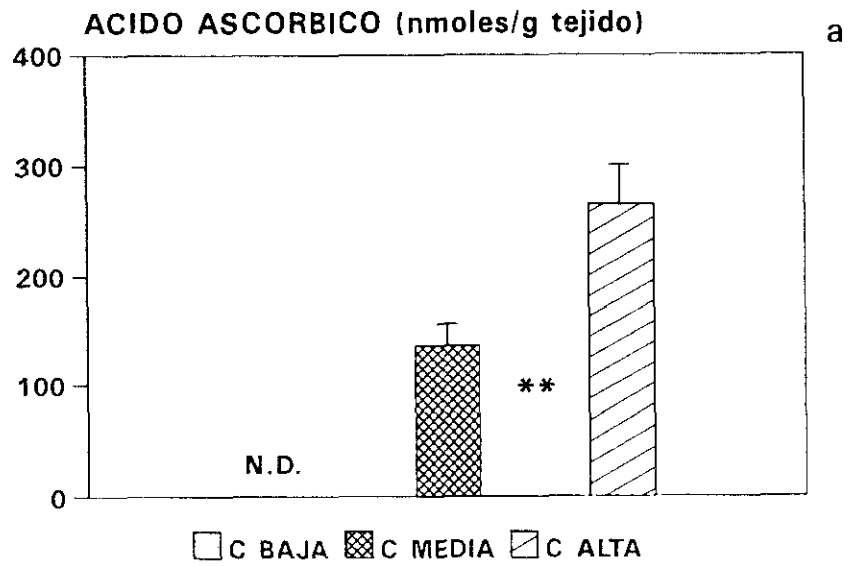


Figura 10. Concentración de ácido ascórbico (a) y α -tocoferol (b) en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. N.D.: no detectado. Diferencias significativas: ** $p < 0,01$.

CORAZON

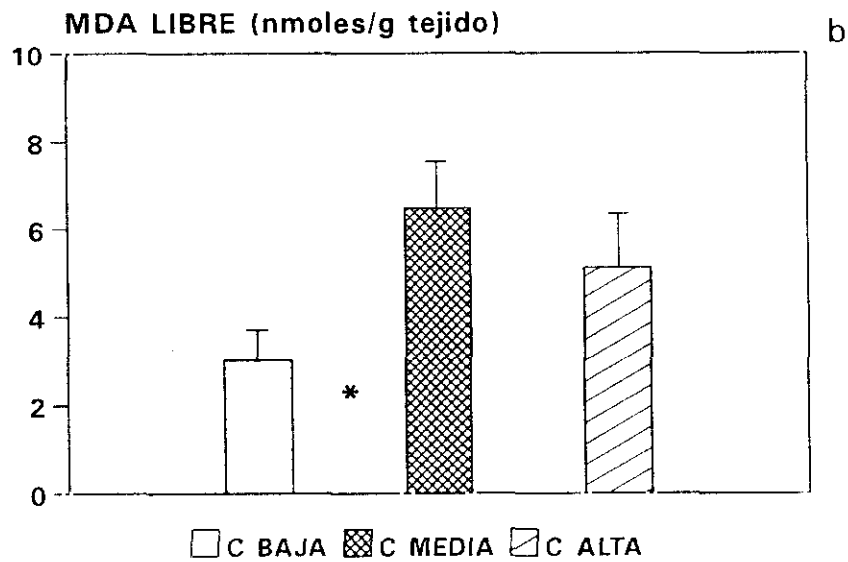
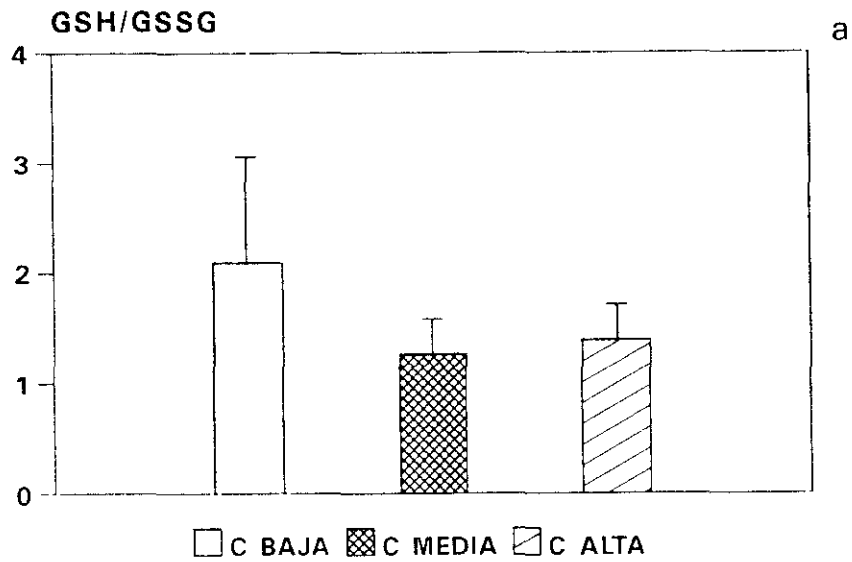


Figura 11. Razón GSH/GSSG (a) y contenido en MDA libre (b) en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 12. Malondialdehído (MDA) libre (HPLC) en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

CORAZÓN			
	C BAJA	C MEDIA	C ALTA
MDA LIBRE	3,04 ± 0,67 (5)	* 6,48 ± 1,11 (7)	5,11 ± 1,29 (5)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. MDA (nmoles/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. El asterisco situado horizontalmente entre dos grupos indica diferencias significativas entre esos dos grupos; *p < 0,05.

Tabla 13. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

CORAZÓN

TBA (nmoles MDA/g tejido)			
TIEMPO	C BAJA	C MEDIA	C ALTA
0 min	58,6 ± 14,2 (5)	51,0 ± 11,0 (8)	52,1 ± 8,7 (7)
30 min	51,0 ± 21,7 (4)	77,2 ± 17,4 (8)	51,8 ± 29,7 (4)
60 min	61,3 ± 31,1 (4)	74,4 ± 22,4 (8)	76,9 ± 36,0 (3)
90 min	64,5 ± 26,3 (4)	61,7 ± 16,2 (8)	50,2 ± 27,5 (4)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de datos de cada grupo aparece entre paréntesis.

CORAZON

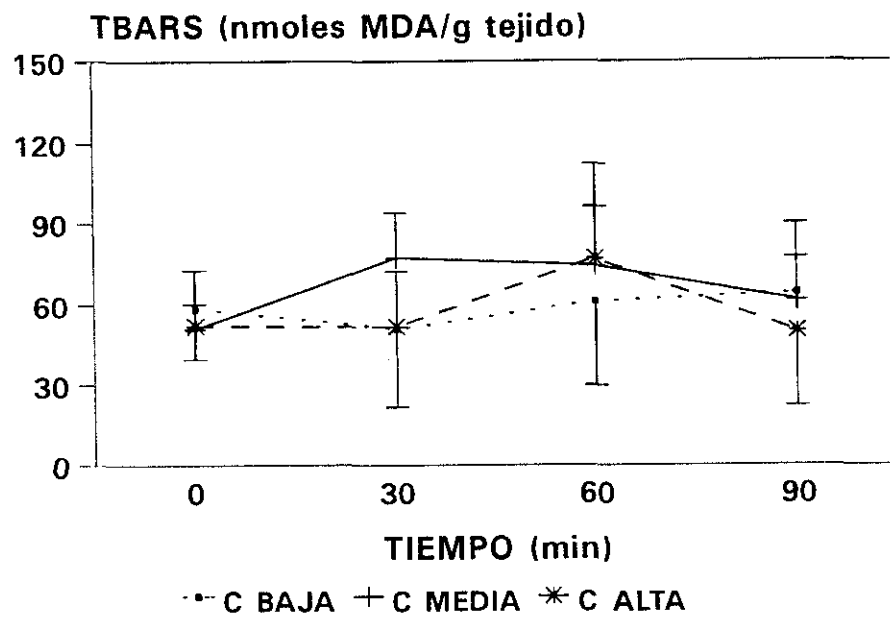


Figura 12. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas.

II. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA DIETA Y DEL 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOL (AT) EN EL HÍGADO DE COBAYA.

Los cobayas tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT) recibieron una inyección intraperitoneal de AT (1 mg/g peso) 3 horas antes de ser sacrificados.

A. Actividad catalasa

El tratamiento con aminotriazol fue muy efectivo, dando lugar a la desaparición casi total (90%) de la catalasa hepática en los dos grupos C BAJA y C ALTA (figura 13 y tabla 14).

B. Ácido ascórbico y α -tocoferol

La concentración de ascorbato en el hígado aumentó significativamente en los grupos C ALTA y C ALTA +AT ($p < 0,001$; figura 14a y tabla 14).

No se observaron diferencias en el nivel de vitamina E entre los cuatro grupos estudiados (figura 14b y tabla 14).

C. Razón GSH/GSSG

La razón GSH/GSSG aumentó significativamente en el grupo C ALTA +AT respecto al los grupos C ALTA y C BAJA +AT (figura 15a y tabla 14).

D. MDA libre

La suplementación con vitamina C disminuyó significativamente los niveles de MDA libre (HPLC); el descenso fue del 66-78% en los grupos C ALTA y C ALTA +AT ($p < 0,01$; figura 15b y tabla 15).

Tabla 14. Actividad catalasa, vitamina C, vitamina E y razón GSH/GSSG en el hígado de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT).

HÍGADO							
	C BAJA		C BAJA +AT		C ALTA		C ALTA +AT
CATALASA	727,3 ± 67,4 (6)	***	98,4 ± 12,9 (5)		678,4 ± 38,5 (7)	***	88,9 ± 10,0 (5)
VITAMINA C	0,034 ± 0,021 (6)		0,014 ± 0,014 (5)		1,99 ± 0,17 (7)***		2,35 ± 0,39 (5)***
VITAMINA E	17,0 ± 5,5 (6)		11,4 ± 0,9 (5)		16,9 ± 2,0 (7)		15,7 ± 2,8 (5)
GSH/GSSG	11,2 ± 1,6 (6)		14,2 ± 0,9 (5)		14,4 ± 1,1 (7)	*	24,6 ± 4,9 (5)*

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (μ moles/g tejido), vitamina E (μ g/g tejido) y catalasa (μ moles H₂O₂/min.mg proteína). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo C BAJA del mismo tratamiento con AT; *p < 0,05 y ***p < 0,001.

HIGADO

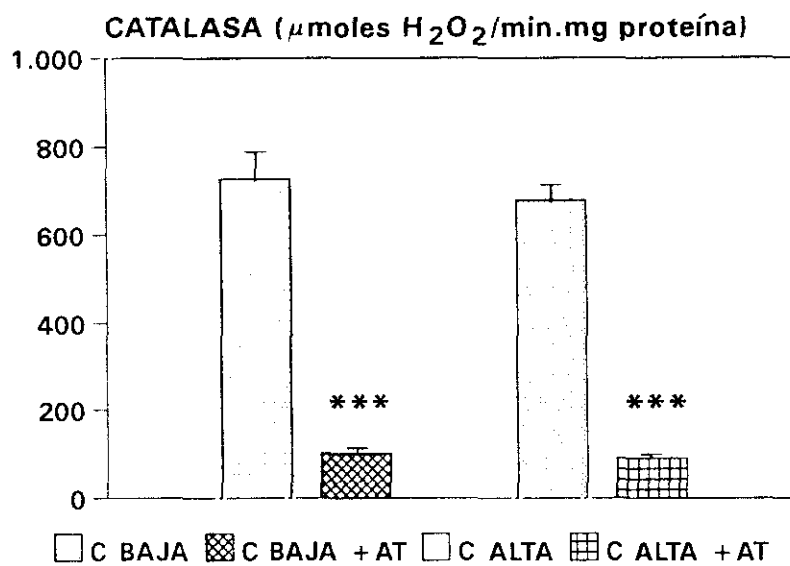


Figura 13. Actividad catalasa en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT). Los asteriscos indican diferencias entre los grupos control y tratados con AT; *** $p < 0,001$.

HIGADO

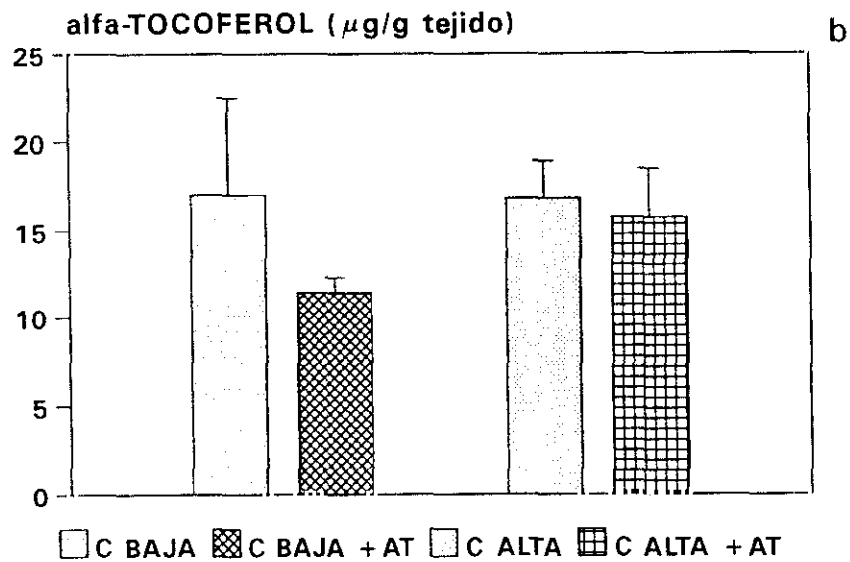
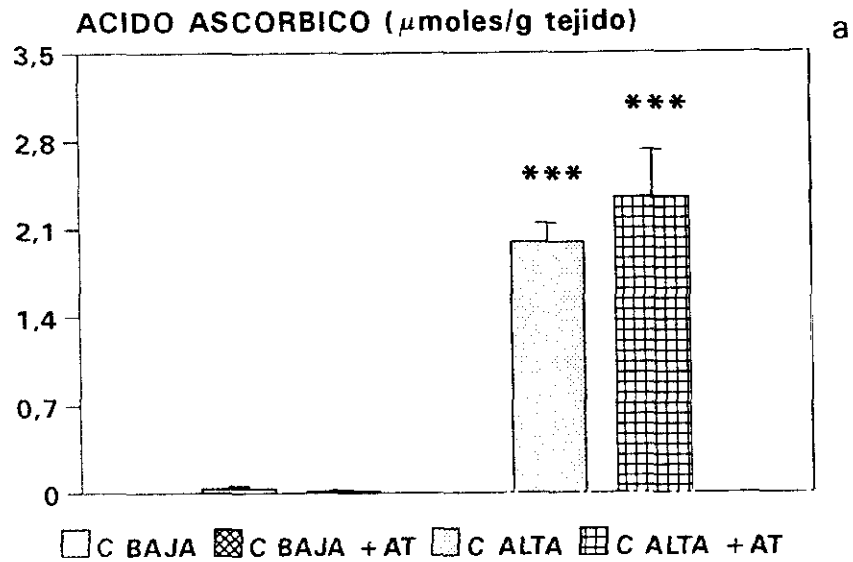


Figura 14. Concentración de ácido ascórbico (a) y α -tocoferol (b) en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT). Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta; *** $p < 0,001$.

HIGADO

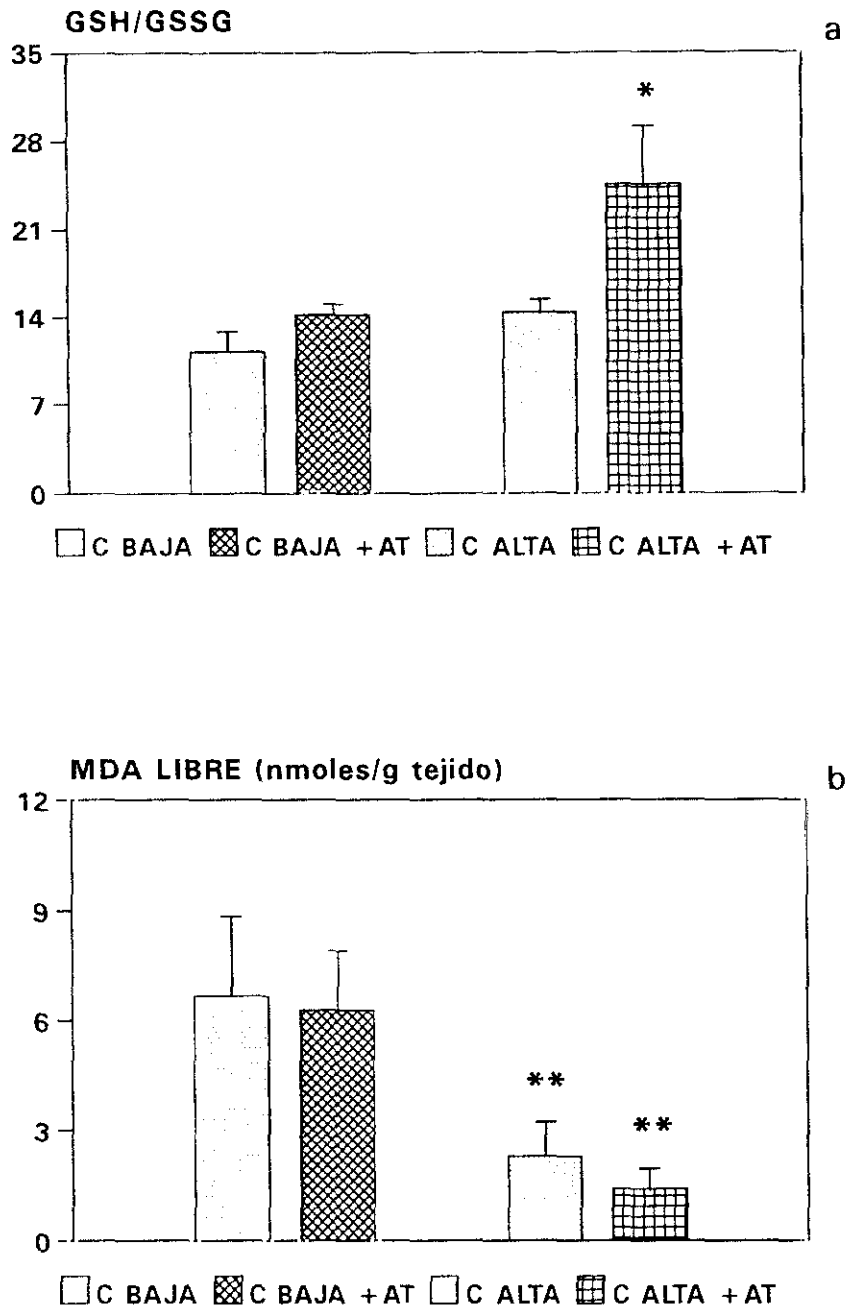


Figura 15. Razón GSH/GSSG (a) y concentración de MDA libre (b) en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT). Los asteriscos indican (a): diferencias significativas con los grupos C BAJA +AT y C ALTA; (b): diferencias entre grupos con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Tabla 15. Malondialdehído (MDA) libre (HPLC) y carbonilos proteicos, estimadores del daño oxidativo a lípidos y proteínas, en el hígado de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT).

HÍGADO				
	C BAJA	C BAJA +AT	C ALTA	C ALTA +AT
MDA LIBRE	6,66 ± 2,26 (6)	6,27 ± 1,68 (5)	2,29 ± 0,96 (7)**	1,40 ± 0,58 (5)**
CARBONILOS	7,78 ± 1,68 (6)	5,24 ± 0,94 (5)	3,33 ± 1,59 (7)*	4,08 ± 1,11 (5)*

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. MDA (nmoles/g tejido) y carbonilos proteicos (nmoles/mg proteína). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los superíndices representan diferencias significativas respecto al grupo C BAJA del mismo tratamiento con AT; *p < 0,05 y **p < 0,01.

E. Daño oxidativo a proteínas

Los carbonilos proteicos también disminuyeron significativamente (57-22%) en los grupos C ALTA y C ALTA +AT ($p < 0,05$; figura 16 y tabla 15).

F. Peroxidación lipídica (TBARS)

El nivel de peroxidación lipídica endógena (TBARS a 0 min) no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales. La incubación con ascorbato- Fe^{2+} (TBA *in vitro*) aumentó los productos de peroxidación lipídica en los cuatro grupos, resultando significativamente mayores los niveles encontrados en el grupo C BAJA que en el C ALTA a los 90 min de incubación (figura 17 y tabla 16).

HIGADO

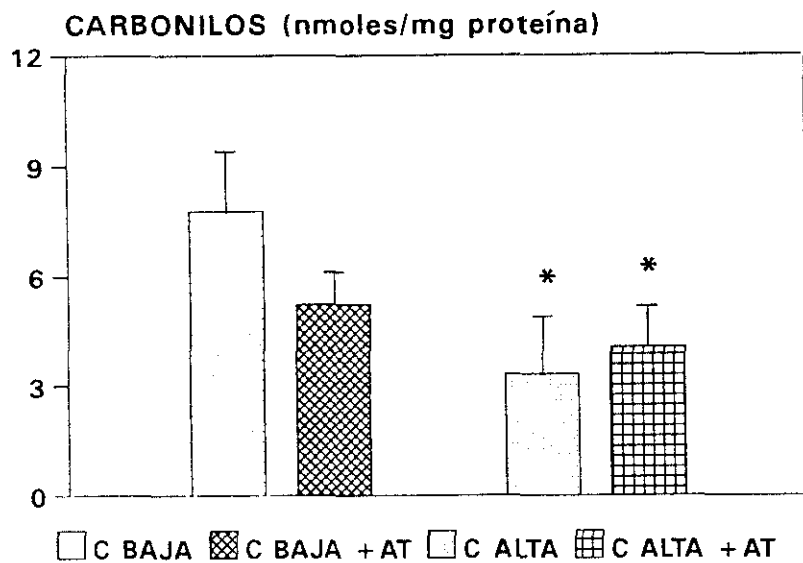


Figura 16. Concentración carbonilos proteicos en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT). Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta; * $p < 0,05$.

Tabla 16. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT).

HÍGADO				
TBA (nmoles MDA/g tejido)				
TIEMPO	C BAJA	C BAJA +AT	C ALTA	C ALTA +AT
0 min	115,3 ± 24,9 (6)	74,8 ± 5,5 (5)	103,5 ± 9,5 (7)	86,6 ± 10,1 (5)
30 min	246,3 ± 122,4 (6)	105,9 ± 28,9 (5)	129,2 ± 24,0 (7)	206,3 ± 96,2 (5)
60 min	432,7 ± 166,3 (6)	233,6 ± 84,6 (5)	156,7 ± 21,1 (7)	321,9 ± 180,4 (5)
90 min	650,3 ± 248,5 (6) ^{b*}	372,1 ± 182,4 (5) ^{b*}	266,0 ± 78,6 (7) ^{a*b*c*}	378,5 ± 239,5 (5)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los superíndices representan: a: diferencias significativas respecto al grupo C BAJA del mismo tratamiento con AT; b: diferencias respecto a tiempo 0 min; c: diferencias respecto a tiempo 30 min; *p < 0,05.

HIGADO

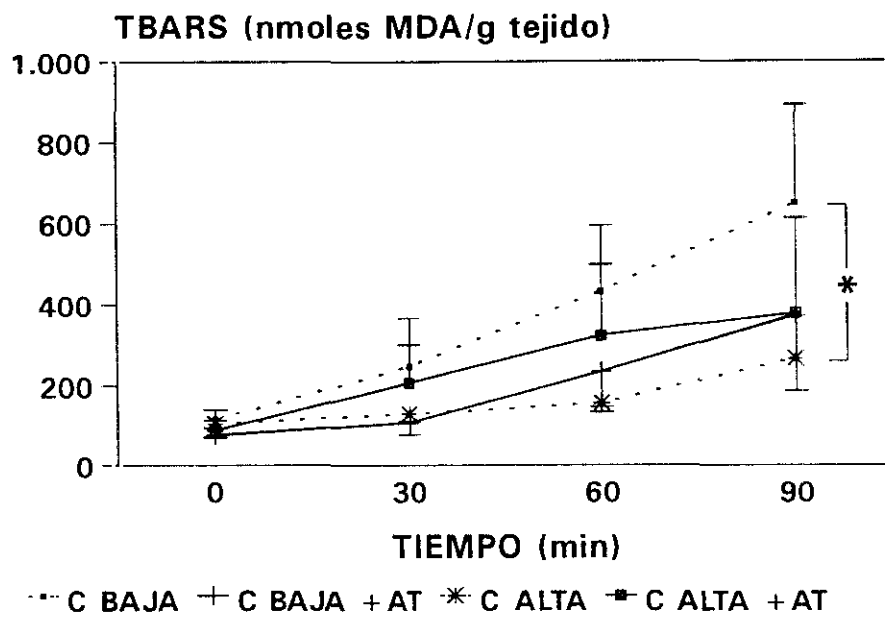


Figura 17. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta durante 5 semanas y tratados con 3-amino-1,2,4-triazol (AT). Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

III. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON α -TOCOFEROL EN LA DIETA EN EL HÍGADO Y EL CORAZÓN DE COBAYA.

En este estudio los cobayas fueron suplementados con <15 (E BAJA), 150 (E MEDIA) ó 1.500 (E ALTA) mg vitamina E/kg dieta, y con 660 mg vitamina C/kg dieta, durante 5 semanas.

1. PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

El peso corporal medio de los animales, que aumentó significativamente durante el período experimental, fue similar en los tres grupos a 1, 3 ó 5 semanas de tratamiento (tabla 17).

La ingesta diaria de alimento aumentó desde la primera hasta la quinta semana de tratamiento, y tampoco mostró diferencias entre los grupos experimentales a 1, 3 ó 5 semanas de tratamiento (tabla 18).

2. HÍGADO

A. Ácido ascórbico y α -tocoferol

Tras cinco semanas de tratamiento con diferentes cantidades de vitamina E en la dieta, los animales de los tres grupos experimentales mostraron niveles hepáticos de vitamina E claramente diferentes (figura 18a y tabla 19). El aumento del contenido en vitamina E en la dieta del grupo E BAJA al E MEDIA dió lugar a un incremento del 125 % en los niveles hepáticos de vitamina E. Se alcanzó un incremento en el contenido de vitamina E del 200 % entre el grupo E MEDIA y el E ALTA.

La concentración de vitamina E encontrada en el hígado del grupo E BAJA (11,9 μ g/g tejido) indica que estos animales no son deficientes en vitamina E.

A pesar de la gran diferencia en la concentración hepática de vitamina E entre los tres grupos, el contenido en vitamina C del hígado no resultó afectado (figura 18b y tabla 19).

Tabla 17. Peso corporal de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

PESO CORPORAL (g)			
	E BAJA	E MEDIA	E ALTA
SEMANA 1	252,8 ± 4,1 ***	251,5 ± 3,3 ***	252,4 ± 5,0 ***
SEMANA 3	400,7 ± 8,9 ***	411,8 ± 13,0 ***	402,6 ± 7,0 ***
SEMANA 5	543,8 ± 10,3***	575,0 ± 27,4***	553,9 ± 13,3***

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de siete animales por grupo. Los asteriscos situados verticalmente indican diferencias significativas respecto al tiempo de tratamiento; los superíndices representan diferencias respecto a la primera semana; ***p < 0,001.

Tabla 18. Ingesta diaria de alimento de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

INGESTA DE ALIMENTO (g/cobaya.día)			
	E BAJA	E MEDIA	E ALTA
SEMANA 1	39,1 ± 4,3 (7)	33,0 ± 0,8 (7)	31,9 ± 0,5 (7)
SEMANA 3	31,2 ± 2,8 (7) **	34,5 ± 2,3 (7) ***	33,6 ± 1,5 (6) ***
SEMANA 5	45,2 ± 2,3 (7)	50,4 ± 3,9 (7)***	53,3 ± 3,7 (7)***

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados verticalmente indican diferencias significativas respecto al tiempo de tratamiento; los superíndices representan diferencias respecto a la primera semana; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

Tabla 19. Vitamina C, vitamina E y razón GSH/GSSG en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	E BAJA		E MEDIA		E ALTA
VITAMINA C	1,35 ± 0,18 (5)		1,13 ± 0,10 (7)		1,16 ± 0,15 (6)
VITAMINA E	11,9 ± 1,9 (7)	*	27,2 ± 3,2 (6)	***	80,4 ± 5,6 (7)***
GSH/GSSG	47,4 ± 7,4 (6)		49,1 ± 11,6 (5)		39,5 ± 2,2 (5)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (μ moles/g tejido) y vitamina E (μ g/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

HIGADO

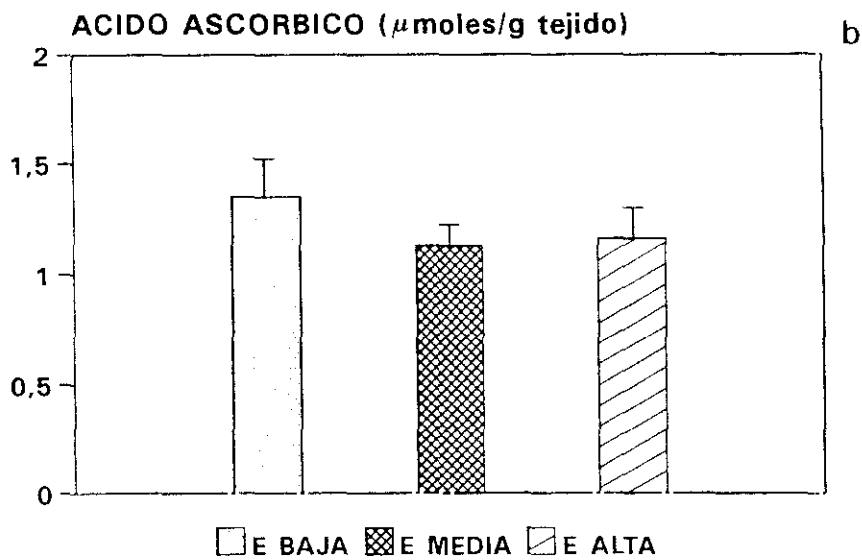
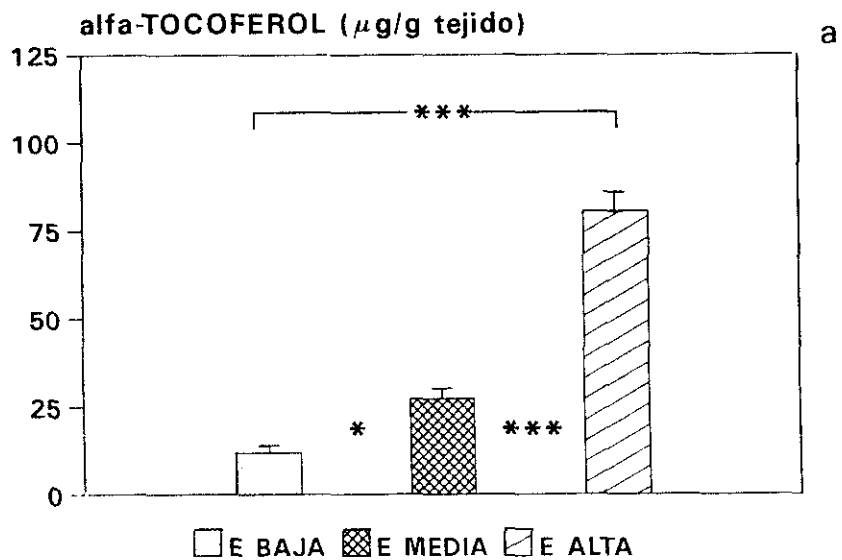


Figura 18. Concentración hepática de α -tocoferol (a) y ácido ascórbico (b) en cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

B. Razón GSH/GSSG

No se observaron cambios significativos en la razón GSH/GSSG en función del contenido hepático en vitamina E (figura 19a y tabla 19).

C. MDA libre

Los niveles de MDA libre (HPLC) resultaron similares en los tres grupos de animales (figura 19b y tabla 20), aunque se observó una tendencia a mostrar valores más bajos en el grupo E ALTA.

D. Daño oxidativo a proteínas

La concentración de carbonilos proteicos en el hígado mostró valores similares en los tres grupos de cobayas, aunque se observó una tendencia no significativa al descenso conforme aumentaban los niveles de vitamina E (figura 20a y tabla 20).

E. Daño oxidativo al ADN

No se encontraron diferencias significativas en la razón 8-OHdG/10⁵ dG en función del contenido en α -tocoferol hepático, aunque también se apreció en este parámetro una tendencia al descenso a medida que aumentaba el contenido hepático de vitamina E (figura 20b y tabla 20).

F. Peroxidación lipídica (TBARS)

De acuerdo con la ausencia de diferencias significativas observada en los niveles de MDA libre, no se encontraron diferencias en la peroxidación lipídica (TBARS a tiempo 0 min) entre los tres grupos de cobayas con diferente concentración hepática de vitamina E.

La incubación en presencia de ascorbato-Fe²⁺ aumentó significativamente la producción de productos de peroxidación lipídica en los tres grupos de animales. Este aumento fue significativamente mayor en el grupo E BAJA que en los otros dos grupos

HIGADO

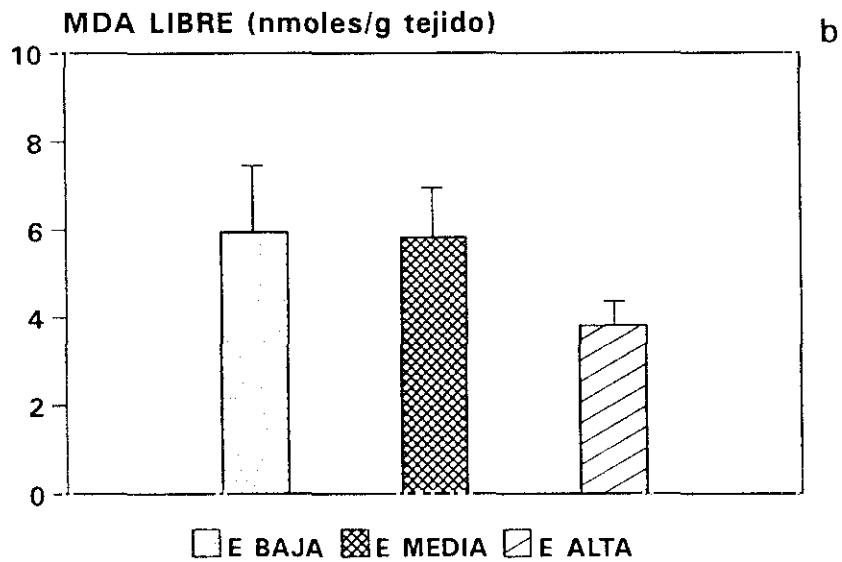
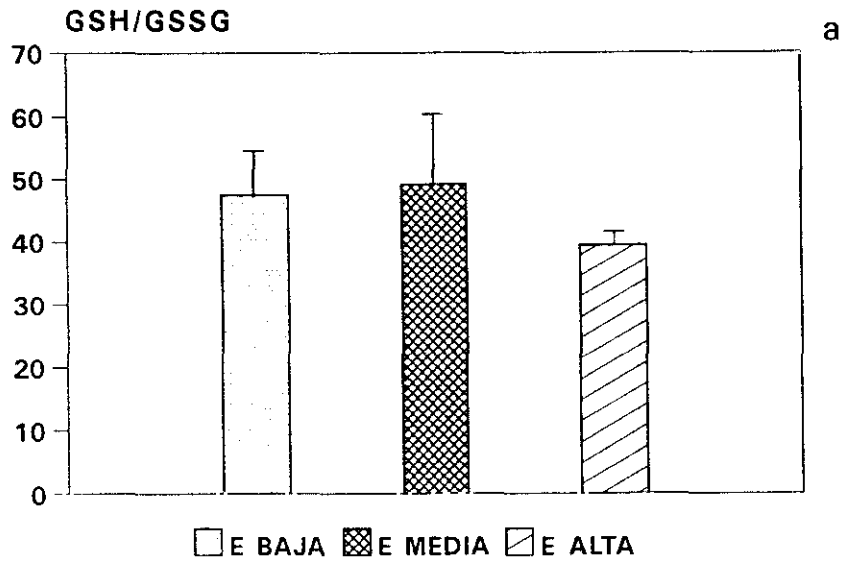


Figura 19. Razón GSH/GSSG (a) y contenido en MDA libre (b) en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

Tabla 20. Malondialdehído (MDA) libre (HPLC), carbonilos proteicos y 8-OHdG, estimadores del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	E BAJA	E MEDIA	E ALTA
MDA LIBRE	5,95 ± 1,54 (7)	5,83 ± 1,15 (7)	3,81 ± 0,59 (6)
CARBONILOS	4,94 ± 1,18 (7)	4,76 ± 1,29 (7)	3,96 ± 1,01 (7)
8-OHdG/10 ⁵ dG	2,85 ± 0,26 (7)	2,74 ± 0,25 (7)	2,61 ± 0,35 (7)

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar. MDA (nmoles/g tejido) y carbonilos proteicos (nmoles/mg proteína). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

HIGADO

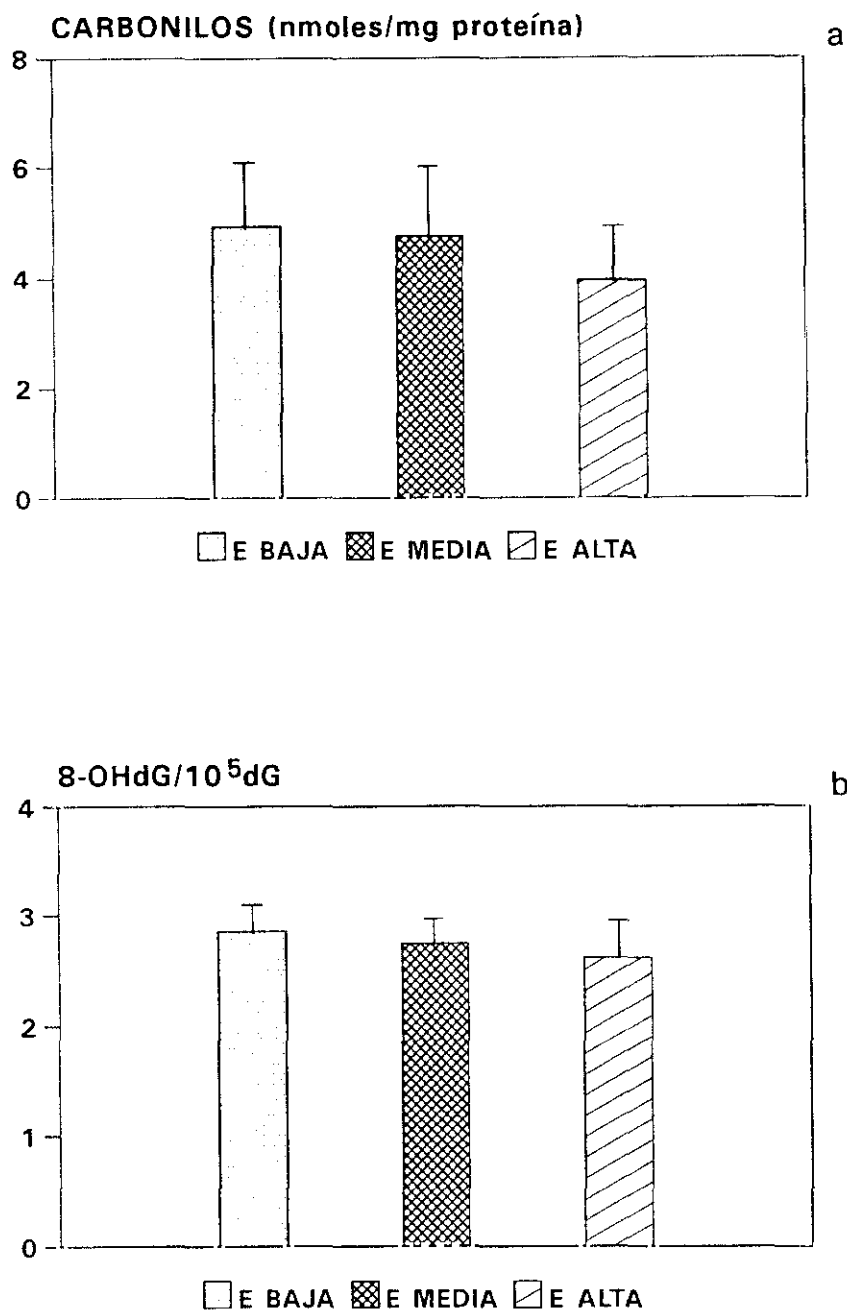


Figura 20. Contenido en carbonilos proteicos (a) y 8-OHdG (b) en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

experimentales (figura 21 y tabla 21). Como consecuencia, los niveles de TBARS a 22 h fueron menores en los grupos E MEDIA y E ALTA que en el E BAJA. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos E MEDIA y E ALTA a ningún tiempo de incubación.

G. Composición en ácidos grasos

En la fracción de **fosfatidiletanolamina** los principales cambios significativos se observaron entre los grupos E MEDIA y E ALTA. En el grupo E ALTA se observó un descenso en la relación insaturados/saturados y en el índice de insaturación respecto al grupo E MEDIA (figura 22 y tabla 22). Esto fue debido principalmente a descensos significativos de los ácidos linolénico (18:3), araquidónico (20:4), PUFA n-6 y PUFA n-3 y a un incremento significativo en 16:0 (tabla 22).

El grupo E BAJA, igual que el E ALTA, mostró un descenso en PUFA n-6 respecto a E MEDIA y no se detectaron cambios significativos en ningún ácido graso en particular (tabla 22). Los dos índices de dobles enlaces descendieron también en el grupo E BAJA, aunque este descenso no alcanzó la significación estadística (figura 22).

La fracción de **fosfatidilcolina** mostró cambios significativos de características similares a los observados en el caso de la fosfatidiletanolamina (tabla 23). Los principales cambios observados ocurrieron de nuevo en el grupo E ALTA. Los PUFA n-3, la relación insaturados/saturados (figura 23a), el índice de insaturación (figura 23b) y el ácido linolénico (18:3) disminuyeron y 12:0 aumentó en el grupo E ALTA respecto al grupo E MEDIA. El ácido 20:2 descendió del grupo E MEDIA al grupo E BAJA. De nuevo los valores más altos de los índices de insaturación se dieron en el grupo E MEDIA (figura 23).

Los cambios más significativos y cuantitativamente mayores se observaron en la fracción de **lisofosfatidilcolina**, en la cual las alteraciones siguieron el mismo patrón que en el resto de las fracciones de fosfolípidos de membrana (tabla 24).

El grupo E ALTA mostró descensos significativos en PUFA n-6, la relación insaturados/saturados (figura 24a), el índice de insaturación (figura 24b) y el ácido

Tabla 21. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

TBA (nmoles MDA/g tejido)			
TIEMPO	E BAJA	E MEDIA	E ALTA
0 min	87,8 ± 6,7 (7)	85,3 ± 4,4 (7)	76,4 ± 7,4 (7)
90 min	101,5 ± 63,8 (7)	97,1 ± 3,2 (7)	86,6 ± 6,3 (7)
180 min	214,3 ± 101,8 (7)	108,4 ± 5,9 (7) ^{b**}	97,6 ± 10,7 (6)
22 h	176,7 ± 79,5 (7)	* 90,2 ± 8,9 (7)	73,9 ± 5,5 (7) ^{a*}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan: a: diferencias respecto al grupo E BAJA; b: diferencias respecto a tiempo 0 min; c: diferencias respecto a tiempo 90 min; *p < 0,05 y **p < 0,01.

HIGADO

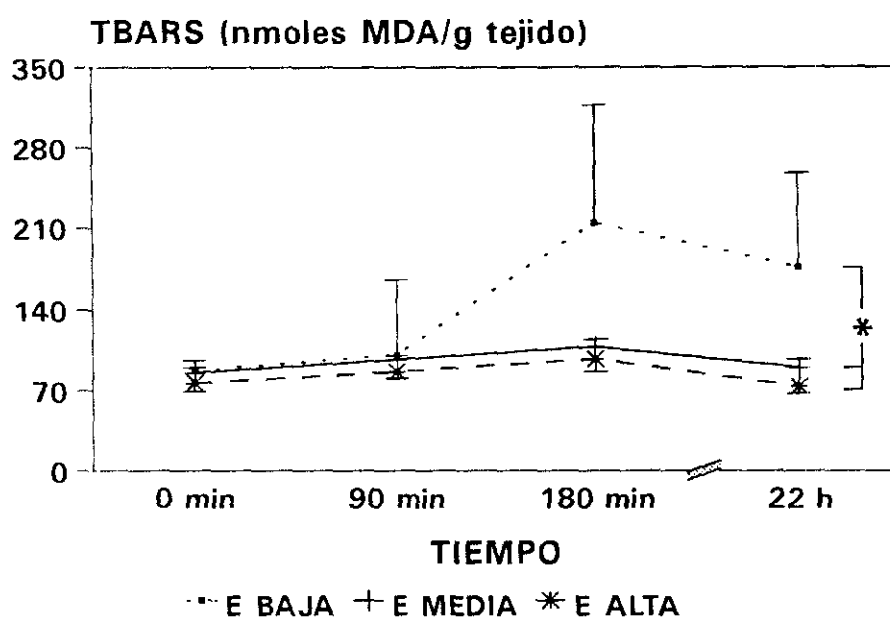


Figura 21. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 22. Composición en ácidos grasos de la fracción de fosfatidiletanolamina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	E BAJA	E MEDIA		E ALTA
16:0	7,99 ± 0,52	7,64 ± 0,34	*	8,81 ± 1,01
16:1	1,02 ± 0,05	1,03 ± 0,17		1,08 ± 0,26
18:0	36,93 ± 1,59	36,08 ± 1,79		36,99 ± 1,52
18:1	5,93 ± 0,58	5,27 ± 0,58		5,48 ± 0,70
18:2	30,08 ± 2,23	31,04 ± 1,06		32,16 ± 1,72
18:3	2,19 ± 0,81	2,93 ± 0,67	*	1,78 ± 0,86
20:3	0,37 ± 0,03	0,41 ± 0,08		0,44 ± 0,22
20:4	13,05 ± 1,13	13,35 ± 1,20	*	11,39 ± 2,13
22:5	1,05 ± 0,12	0,99 ± 0,14		0,95 ± 0,14
22:6	0,88 ± 0,10	0,93 ± 0,18		0,89 ± 0,16
SAT	44,92 ± 1,32	43,73 ± 1,55		45,80 ± 2,31
PUFA n-6	45,70 ± 1,70	* 47,74 ± 1,61	*	45,78 ± 1,63
PUFA n-3	4,13 ± 0,91	4,85 ± 0,61	*	3,63 ± 0,92
MUFA	6,95 ± 0,60	6,31 ± 0,55		6,56 ± 0,83
INSAT/SAT	1,21 ± 0,06	1,28 ± 0,08	*	1,18 ± 0,09
ÍNDICE INSAT	3,06 ± 1,19	3,26 ± 0,24	*	2,92 ± 0,30

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 7 animales por grupo. Ácidos grasos (mol%); ácidos grasos saturados (SAT): Σmol% 16:0 + 18:0; ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFA n-6): Σmol% 18:2 + 18:3 + 20:3 + 20:4; ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA n-3): Σmol% 18:3 + 22:5 + 22:6; ácidos grasos monoinsaturados (MUFA): Σmol% 16:1 + 18:1; ácidos grasos insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σmol% ácidos grasos insaturados y Σmol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σmol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/Σmol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; *p < 0,05.

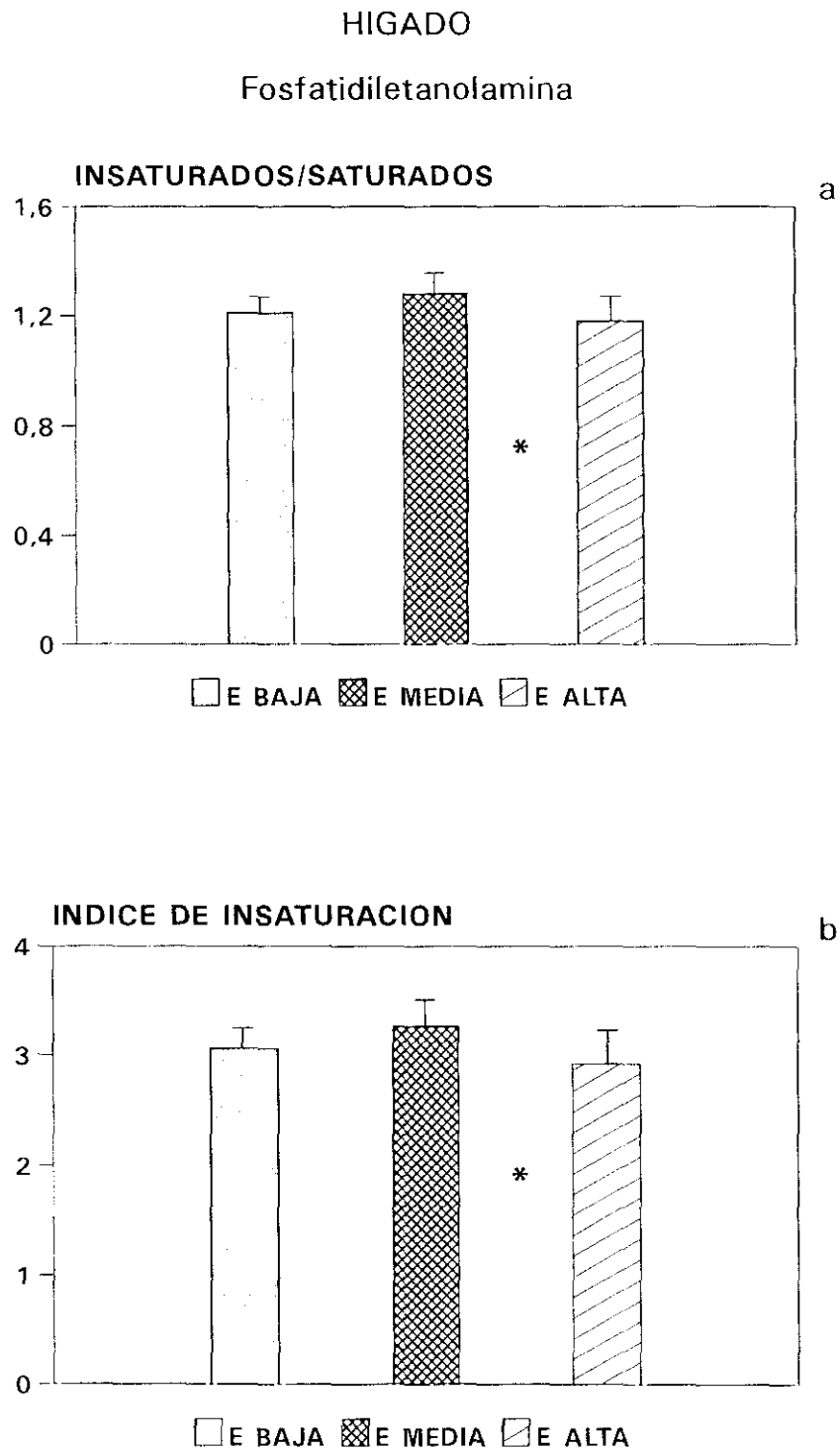


Figura 22. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de fosfatidiletanolamina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 23. Composición en ácidos grasos de la fracción de fosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	E BAJA	E MEDIA		E ALTA
12:0	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	*	0,07 ± 0,01
16:0	15,80 ± 0,56	15,39 ± 0,87		16,44 ± 1,42
16:1	1,15 ± 0,32	0,83 ± 0,23		0,95 ± 0,26
18:0	28,44 ± 0,97	28,79 ± 0,39		29,24 ± 2,03
18:1	12,44 ± 1,11	12,91 ± 1,42		12,02 ± 0,69
18:3	1,08 ± 0,44	2,00 ± 1,15	*	0,87 ± 0,13
20:2	0,43 ± 0,03	0,49 ± 0,04	*	0,47 ± 0,08
20:4	2,82 ± 0,40	2,97 ± 0,32		2,85 ± 0,45
22:4	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,05		0,34 ± 0,03**
22:6	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,03		0,21 ± 0,02
SAT	44,47 ± 1,31	44,39 ± 0,87	*	45,94 ± 1,40
PUFA n-6	40,48 ± 0,41	41,07 ± 1,54		40,03 ± 1,38
PUFA n-3	1,49 ± 0,42	2,40 ± 1,13	*	1,25 ± 0,11
MUFA	13,59 ± 1,26	13,75 ± 1,60		12,97 ± 0,81
INSAT/SAT	1,23 ± 0,06	1,25 ± 0,04	*	1,17 ± 0,06
ÍNDICE INSAT	2,38 ± 0,09	2,44 ± 0,10	*	2,27 ± 0,12

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 7 animales por grupo. Ácidos grasos (mol %); ácidos grasos saturados (SAT): Σmol% 12:0 + 14:0 + 16:0 + 18:0; ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFA n-6): Σmol% 18:2 + 18:3 + 20:3 + 20:4 + 22:4; ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA n-3): Σmol% 18:3 + 22:5 + 22:6; ácidos grasos monoinsaturados (MUFA): Σmol% 16:1 + 18:1; ácidos grasos insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σmol% ácidos grasos insaturados y Σmol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σmol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/Σmol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo E BAJA; *p < 0,05 y **p < 0,01.

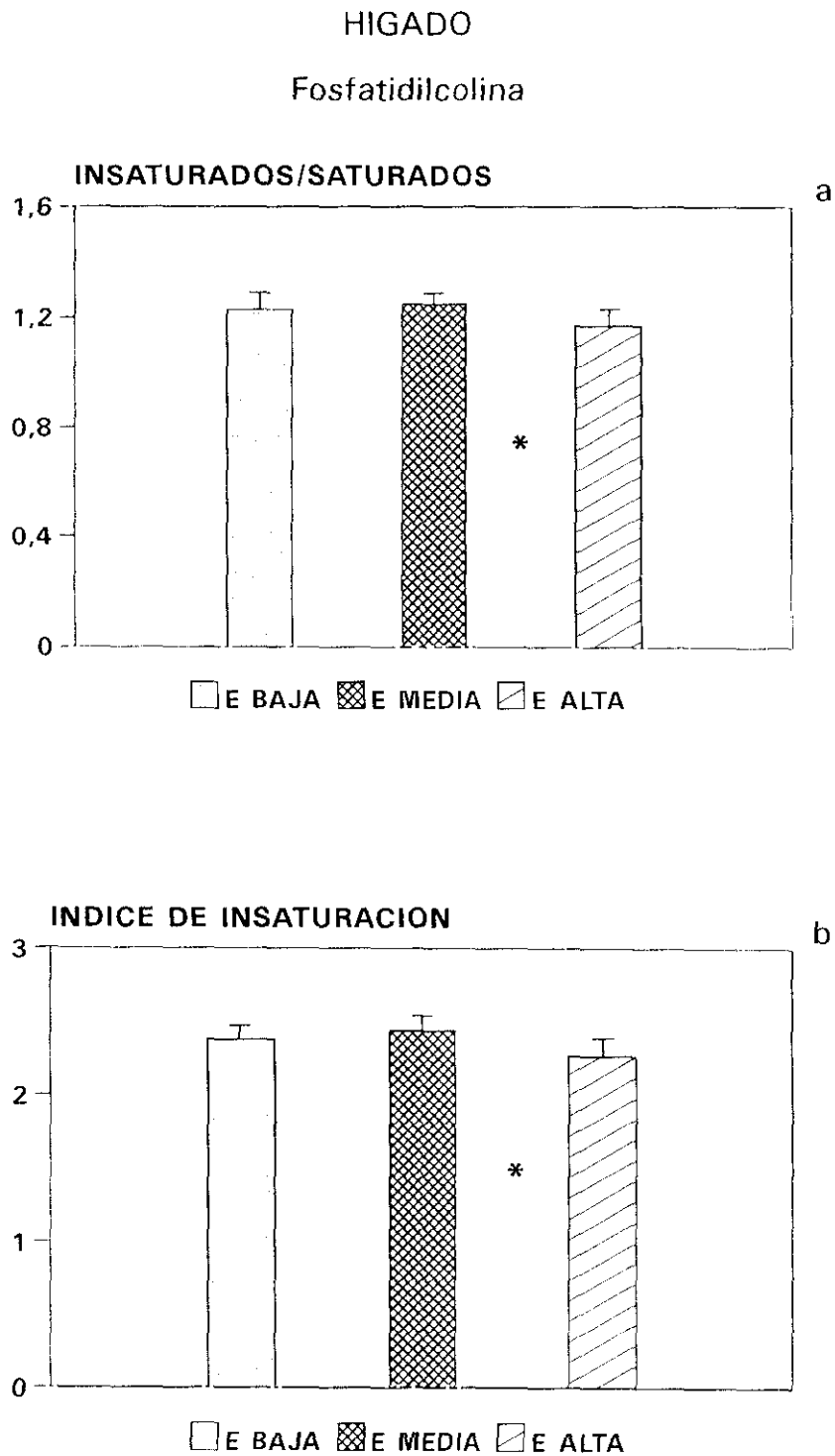


Figura 23. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de fosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 24. Composición en ácidos grasos de la fracción de lisofosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	E BAJA		E MEDIA		E ALTA
16:0	8,80 ± 1,13	*	11,88 ± 1,87	***	7,94 ± 0,76
18:0	53,46 ± 3,04	***	44,96 ± 2,95	***	52,52 ± 1,34
18:1	9,23 ± 0,83		8,92 ± 1,16		9,69 ± 0,91
18:2	21,48 ± 1,95		22,42 ± 1,63		22,55 ± 1,44
20:4	7,07 ± 0,85	***	11,91 ± 1,09	***	7,65 ± 0,35
SAT	62,27 ± 1,94	***	56,85 ± 2,00	*	60,47 ± 1,83**
PUFA n-6	28,56 ± 2,47	***	34,33 ± 1,85	***	30,20 ± 1,46
MUFA	9,23 ± 0,83		8,92 ± 1,16		9,69 ± 0,91
INSAT/SAT	0,60 ± 0,04		0,76 ± 0,04	***	0,66 ± 0,04*
ÍNDICE INSAT	1,29 ± 0,12	***	1,78 ± 0,10	***	1,41 ± 0,07*

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 7 animales por grupo. Ácidos grasos (mol%); ácidos grasos saturados (SAT): Σmol% 16:0 + 18:0; ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFA n-6): Σmol% 18:2 + 20:4; ácidos grasos monoinsaturados (MUFA): Σmol% 18:1; ácidos grasos insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σmol% ácidos grasos insaturados y Σmol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σmol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/Σmol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo E BAJA; *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001.

HIGADO
Lisofosfatidilcolina

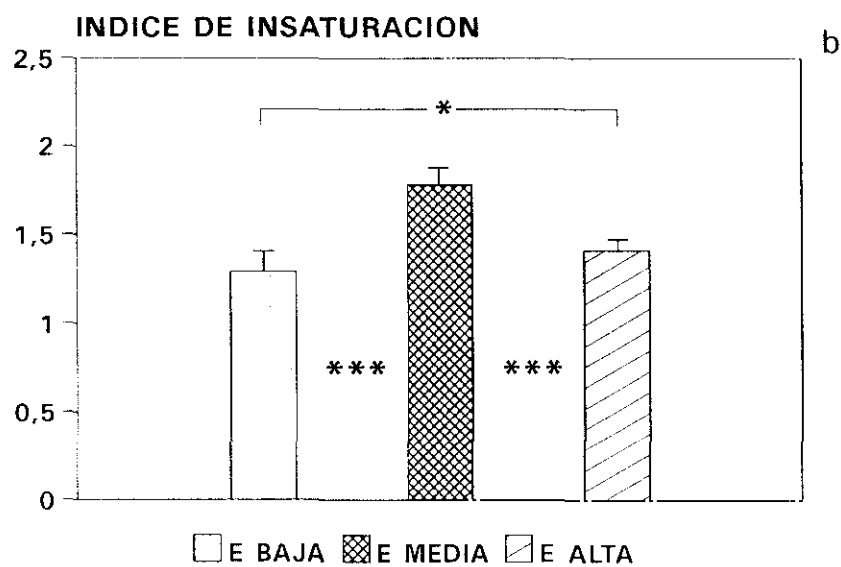
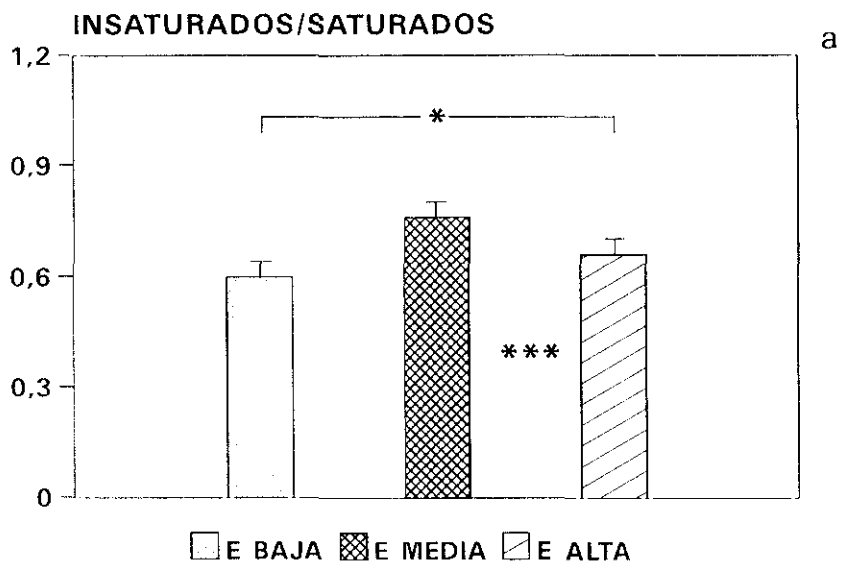


Figura 24. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de lisofosfatidilcolina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

araquidónico (20:4), así como incrementos importantes en 18:0 respecto al grupo E MEDIA. El incremento en 18:0, de la misma manera que se observó en la fracción de esfingomielina, compensó el descenso en 16:0 y en este caso, el incremento en el porcentaje de ácidos grasos saturados alcanzó la significación estadística.

El descenso en vitamina E del grupo E MEDIA al E BAJA dió lugar a descensos significativos en el índice de insaturación, PUFA n-6 y el ácido araquidónico (20:4). También se observó en este grupo un incremento de 18:0, un descenso de 16:0 y un incremento de los ácidos grasos saturados. Es decir, los cambios debidos tanto al déficit como al exceso de vitamina E respecto al grupo E MEDIA fueron esencialmente idénticos y se caracterizan por el descenso en la insaturación de los ácidos grasos.

En la fracción de **esfingomielina**, la relación insaturados/saturados (figura 25a), el índice de insaturación (figura 25b), los PUFA n-6 y los ácidos araquidónico (20:4) y linoléico (18:2) disminuyeron de nuevo en el grupo E ALTA en relación con el grupo E MEDIA (tabla 25). Aunque 16:0 disminuyó en el grupo E ALTA en relación con el grupo E MEDIA, este descenso fue compensado por un aumento en 18:0, y los ácidos grasos saturados no mostraron diferencias entre ambos grupos (tabla 25).

En esta fracción, el grupo E BAJA mostró descensos significativos en PUFA n-6 y en la relación insaturados/saturados (figura 25a). Así, niveles de vitamina E tanto bajos como muy altos causaron pérdidas de insaturación en los ácidos grasos y los cambios fueron más marcados en el grupo E ALTA que en el E BAJA.

Los cambios observados en la fracción de **triglicéridos**, igual que ocurrió en el experimento de suplementación con vitamina C, fueron totalmente diferentes de los encontrados en los fosfolípidos derivados principalmente de fracciones de membrana (tabla 26). El grupo E ALTA mostró incrementos en 14:0 y 16:0 y un descenso en 18:0 respecto al grupo E MEDIA, y un incremento en el porcentaje de ácidos grasos saturados respecto al grupo E BAJA. El grupo E BAJA presentó niveles mayores de 18:2 y PUFA n-6 y menores de 18:0 que E MEDIA. Ni la relación insaturados/saturados ni el índice de insaturación se modificaron en función de los niveles de vitamina E, aunque el grupo E ALTA mostró una tendencia al descenso de insaturación (figura 26).

Tabla 25. Composición en ácidos grasos de la fracción de esfingomielina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	E BAJA		E MEDIA		E ALTA
16:0	12,13 ± 2,71		10,43 ± 1,62	*	8,42 ± 0,97**
16:1	0,73 ± 0,09		0,79 ± 0,10		0,78 ± 0,17
18:0	38,97 ± 4,46		37,96 ± 3,62	*	42,66 ± 3,30
18:1	9,80 ± 1,52		10,29 ± 1,42		10,94 ± 2,18
18:2	21,79 ± 2,85		24,43 ± 4,09	*	21,14 ± 1,34
18:3	2,34 ± 0,50		2,76 ± 0,80		2,55 ± 0,79
20:3	1,79 ± 0,50		1,82 ± 0,68		2,31 ± 0,48
20:4	8,00 ± 1,39		8,74 ± 1,48	*	7,29 ± 1,04
22:0	2,25 ± 0,64		2,36 ± 0,61		2,62 ± 0,38
22:6	1,03 ± 0,42		1,00 ± 0,21		1,10 ± 0,33
SAT	53,37 ± 3,73		50,76 ± 2,62		53,71 ± 3,04
PUFA n-6	33,93 ± 2,51	*	37,76 ± 3,72	*	33,31 ± 1,41
PUFA n-3	2,82 ± 0,70		2,83 ± 0,76		3,41 ± 0,48
MUFA	10,53 ± 1,47		11,08 ± 1,39		11,73 ± 2,15
INSAT/SAT	0,85 ± 0,11	*	0,98 ± 0,10	*	0,86 ± 0,09
ÍNDICE INSAT	1,93 ± 0,24		2,21 ± 0,26	*	1,90 ± 0,16

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 7 animales por grupo. Ácidos grasos (mol%); ácidos grasos saturados (SAT): Σ mol% 16:0 + 18:0 + 22:0; ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFA n-6): Σ mol% 18:2 + 18:3 + 20:3 + 20:4; ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA n-3): Σ mol% 18:3 + 22:6; ácidos grasos monoinsaturados (MUFA): Σ mol% 16:1 + 18:1; ácidos grasos insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σ mol% ácidos grasos insaturados y Σ mol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σ mol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/ Σ mol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo E BAJA; *p < 0,05 y **p < 0,01.

HIGADO
Esfingomielinina

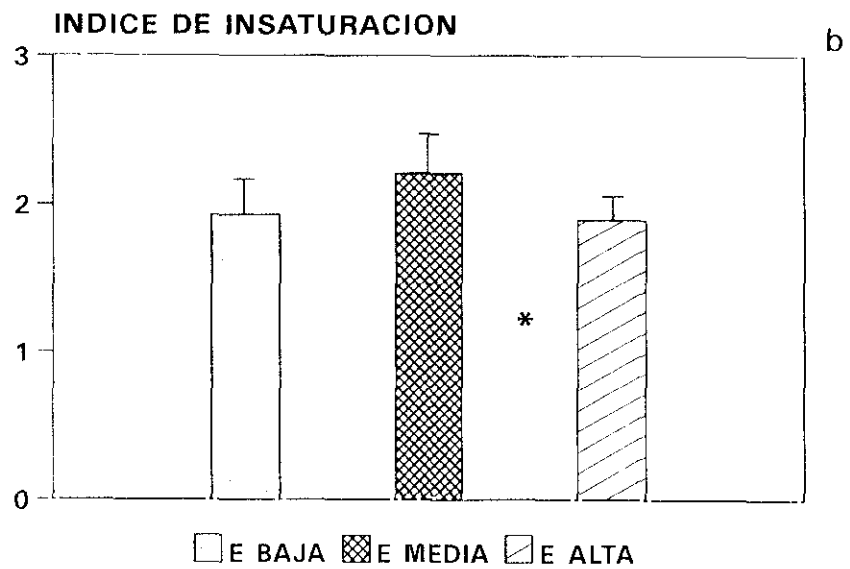
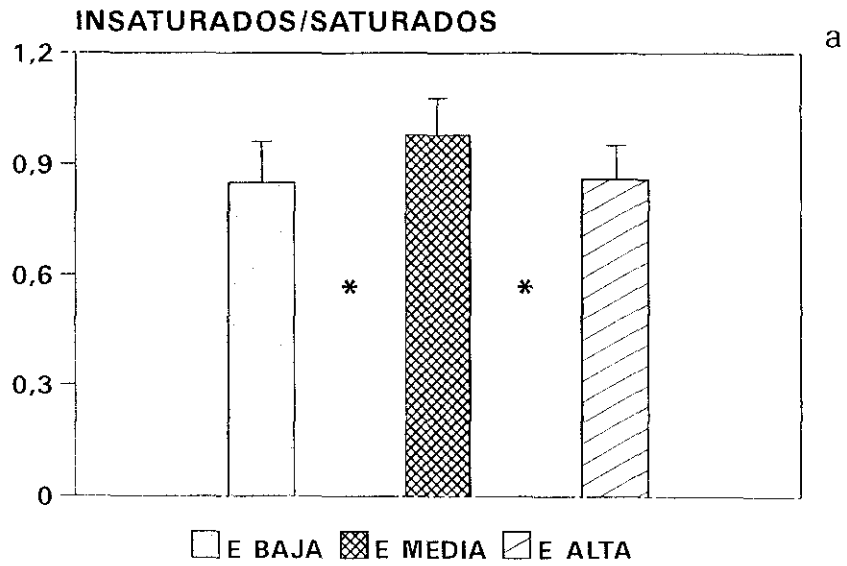


Figura 25. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de esfingomielinina de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 26. Composición en ácidos grasos de la fracción de triglicéridos de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

HÍGADO

	E BAJA		E MEDIA		E ALTA
12:0	0,83 ± 0,20		0,94 ± 0,04		0,88 ± 0,13
14:0	0,34 ± 0,06		0,35 ± 0,04	**	0,43 ± 0,04
16:0	27,68 ± 2,80		26,31 ± 1,75	*	30,98 ± 4,45*
16:1	0,80 ± 0,17		0,95 ± 0,06		0,88 ± 0,10
18:0	8,95 ± 0,44	***	11,79 ± 1,23	**	9,27 ± 1,53
18:1	22,14 ± 0,46		22,14 ± 1,44		21,47 ± 1,76
18:2	30,78 ± 0,90	***	28,91 ± 0,31		29,20 ± 3,40
18:3	4,72 ± 0,77		4,85 ± 0,80		5,20 ± 0,25
20:4	1,46 ± 0,30		1,54 ± 0,11		1,53 ± 0,12
22:6	0,73 ± 0,17		0,68 ± 0,04		0,61 ± 0,09
SAT	37,81 ± 2,42		39,40 ± 2,93		41,57 ± 3,09*
PUFA n-6	36,96 ± 1,07	*	35,30 ± 1,12		35,94 ± 3,65
PUFA n-3	5,46 ± 0,86		5,53 ± 0,77		5,81 ± 0,31
MUFA	22,94 ± 0,64		23,10 ± 1,40		22,35 ± 1,87
INSAT/SAT	1,61 ± 0,12		1,50 ± 0,15		1,43 ± 0,22
ÍNDICE INSAT	2,89 ± 0,23		2,70 ± 0,27		2,58 ± 0,41

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 7 animales por grupo. Ácidos grasos (mol%); ácidos grasos saturados (SAT): Σmol% 12:0 + 14:0 + 16:0 + 18:0; ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFA n-6): Σmol% 18:2 + 18:3 + 20:4; ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA n-3): Σmol% 18:3 + 22:6; ácidos grasos monoinsaturados (MUFA): Σmol% 16:1 + 18:1; ácidos grasos insaturados/saturados (INSAT/SAT): relación entre Σmol% ácidos grasos insaturados y Σmol% ácidos grasos saturados; índice de insaturación (ÍNDICE INSAT): relación (Σmol% ácidos grasos poliinsaturados x número de dobles enlaces de cada ácido graso poliinsaturado)/Σmol% ácidos grasos saturados. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo E BAJA; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

HIGADO
Triglicéridos

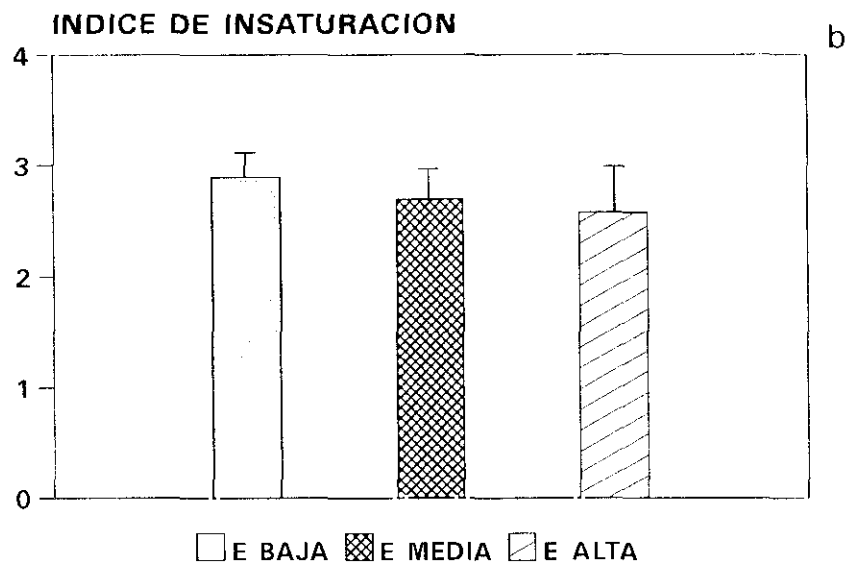
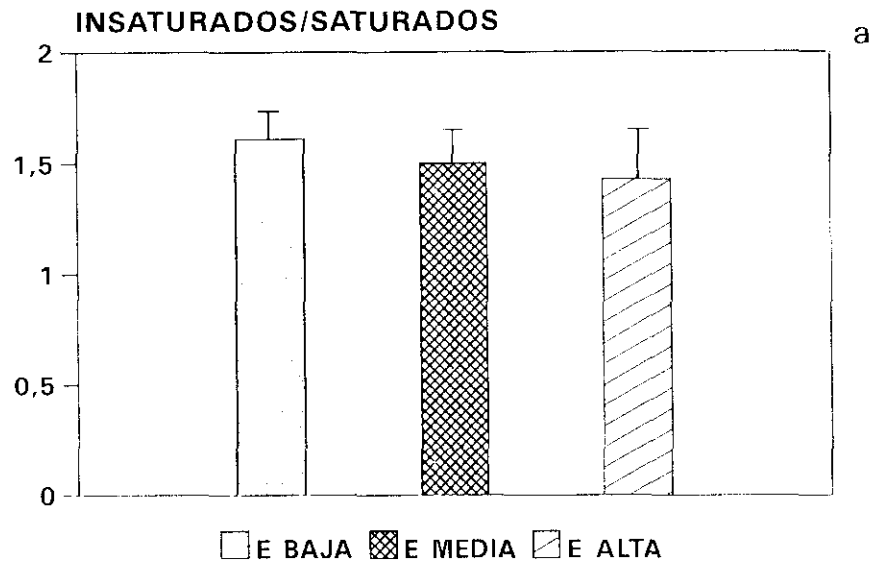


Figura 26. Relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (a) e índice de insaturación (b) en la fracción de triglicéridos de los lípidos hepáticos de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

3. CORAZÓN

A. Ácido ascórbico y α -tocoferol

La concentración de α -tocoferol en el corazón mostró una fuerte dependencia del contenido de vitamina E en la dieta. Los niveles de α -tocoferol en el corazón aumentaron significativamente del grupo E BAJA al E MEDIA y del E MEDIA al E ALTA ($p < 0,001$; figura 27a y tabla 27).

El contenido de ácido ascórbico en el corazón no se alteró como consecuencia del tratamiento con vitamina E (figura 27b y tabla 27).

B. Razón GSH/GSSG

La razón GSH/GSSG resultó significativamente diferente entre los tres grupos de animales. En el grupo E MEDIA aumentó respecto al E BAJA, aunque este aumento no alcanzó la significación estadística. Sin embargo, la razón GSH/GSSG fue significativamente mayor en el grupo E ALTA que en el E BAJA (figura 28a y tabla 27).

C. MDA libre

Los niveles de MDA libre (HPLC) mostraron una tendencia a disminuir (20%) en los grupos E MEDIA y E ALTA respecto al grupo E BAJA, pero esta disminución no alcanzó la significación estadística (figura 28b y tabla 28).

D. Peroxidación lipídica (TBARS)

La incubación en presencia de ascorbato- Fe^{2+} incrementó significativamente los productos de peroxidación lipídica en función del tiempo de incubación en los tres grupos experimentales, pero el incremento observado en el grupo E BAJA fue mucho más intenso que el presentado por los otros dos grupos (figura 29 y tabla 29).

Tabla 27. Vitamina C, vitamina E y razón GSH/GSSG en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

CORAZÓN

	E BAJA		E MEDIA		E ALTA
VITAMINA C	252 ± 23,4 (7)		209 ± 20,9 (7)		240 ± 21,2 (6)
VITAMINA E	7,4 ± 1,2 (7)	***	16,6 ± 1,0 (6)	***	35,1 ± 1,1 (7)***
GSH/GSSG	9,0 ± 2,2 (7)		12,6 ± 2,1 (7)		16,6 ± 3,1 (7)*

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (nmoles/g tejido) y vitamina E (µg/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo E BAJA; *p < 0,05 y ***p < 0,001.

CORAZON

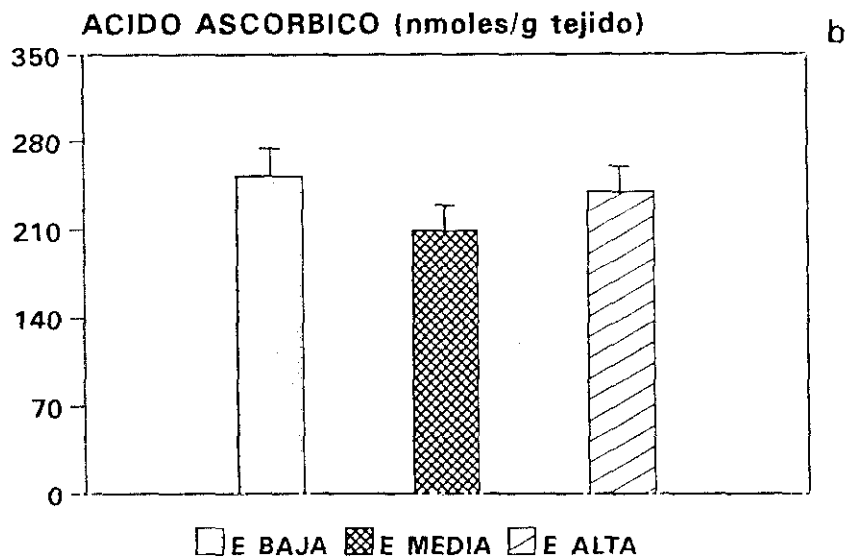
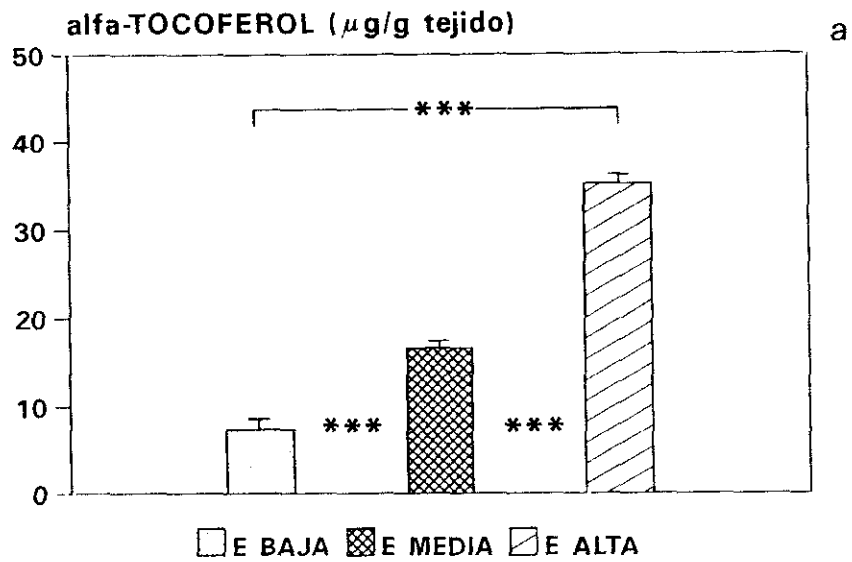


Figura 27. Concentración de α -tocoferol (a) y ácido ascórbico (b) en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: *** $p < 0,001$.

CORAZON

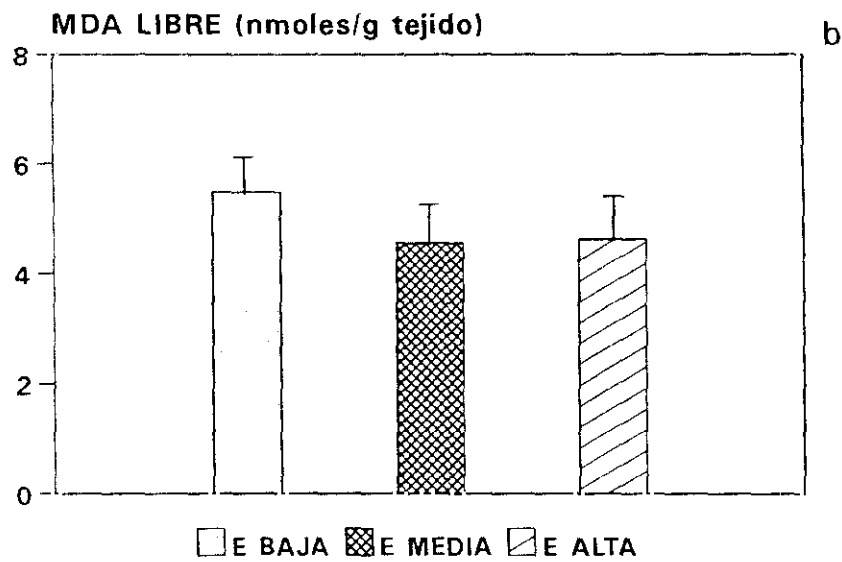
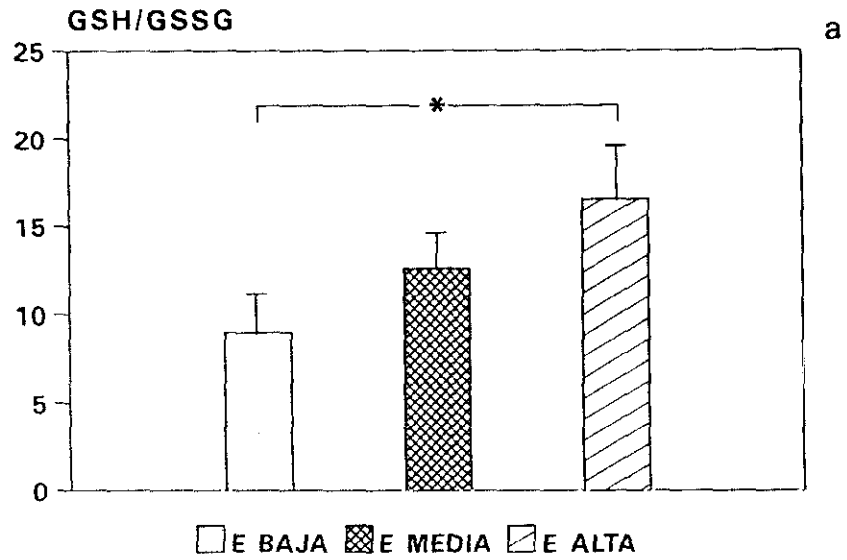


Figura 28. Razón GSH/GSSG (a) y contenido en MDA libre (b) en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

Tabla 28. Malondialdehído (MDA) libre (HPLC) en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

CORAZÓN			
	E BAJA	E MEDIA	E ALTA
MDA LIBRE	5,49 ± 0,65 (7)	4,56 ± 0,72 (7)	4,63 ± 0,80 (7)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. MDA (nmoles/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

Tabla 29. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas.

CORAZÓN

TBA (nmoles MDA/g tejido)			
TIEMPO	E BAJA	E MEDIA	E ALTA
0 min	37,4 ± 6,4	52,1 ± 8,4	49,0 ± 4,7 *
90 min	200,1 ± 84,3	88,0 ± 8,5	86,2 ± 9,8
180 min	328,5 ± 103,9 ^{a*}	* 112,5 ± 17,2 ^{b**}	78,7 ± 9,5 ^{a**} *
22 h	286,3 ± 71,5 ^{b*}	* 147,0 ± 17,9 ^{b****c**}	139,0 ± 17,9 ^{a*b****c**}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de siete animales por grupo. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan a: diferencias respecto al grupo E BAJA; b: diferencias respecto a tiempo 0 min; c: diferencias respecto a tiempo 90 min; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

CORAZON

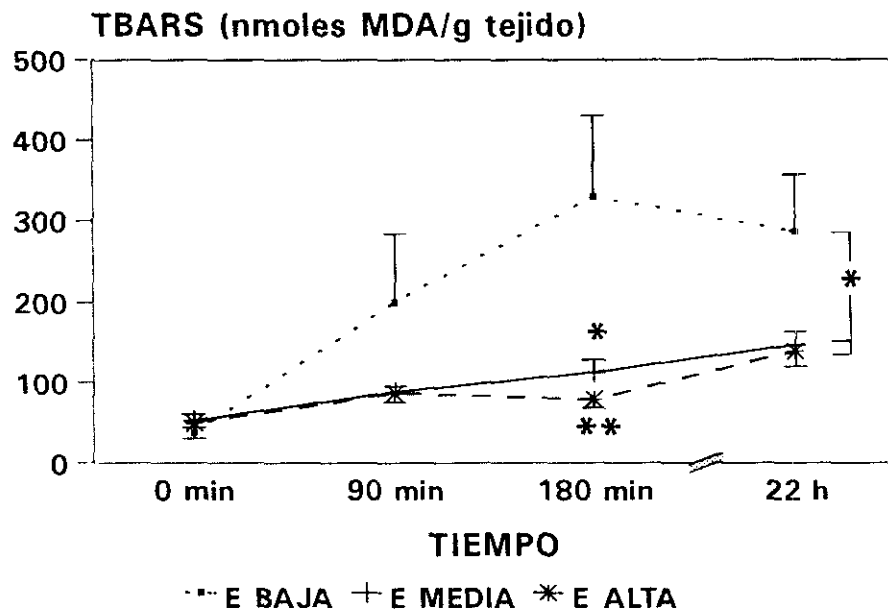


Figura 29. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos E MEDIA y E ALTA a ningún tiempo de incubación, aunque el grupo E ALTA mostró una tendencia a presentar valores menores que el E MEDIA. De nuevo, la peroxidación lipídica resultó mayor en el grupo E BAJA respecto a los otros dos grupos a 90 y 180 min y 22 horas de incubación.

La figura 30 muestra el espectro de emisión de fluorescencia de productos de peroxidación lipídica en una muestra representativa de los valores medios obtenidos en corazón tras 0, 90 y 180 min de incubación en presencia de ascorbato- Fe^{2+} . La fluorescencia aumentó notablemente en función del tiempo de incubación en las muestras de corazón del grupo E BAJA (indicadas en la figura como 0 min, 90 min y 180 min). El espectro obtenido en el corazón es similar al obtenido a partir de estándar de MDA químicamente puro.

Sin embargo, la suplementación con vitamina E en la dieta en el grupo E MEDIA disminuyó la emisión de fluorescencia a 180 min (indicado en la figura como 180 min +E) hasta alcanzar valores incluso menores que los presentados por las muestras del grupo E BAJA tras 90 min de incubación.

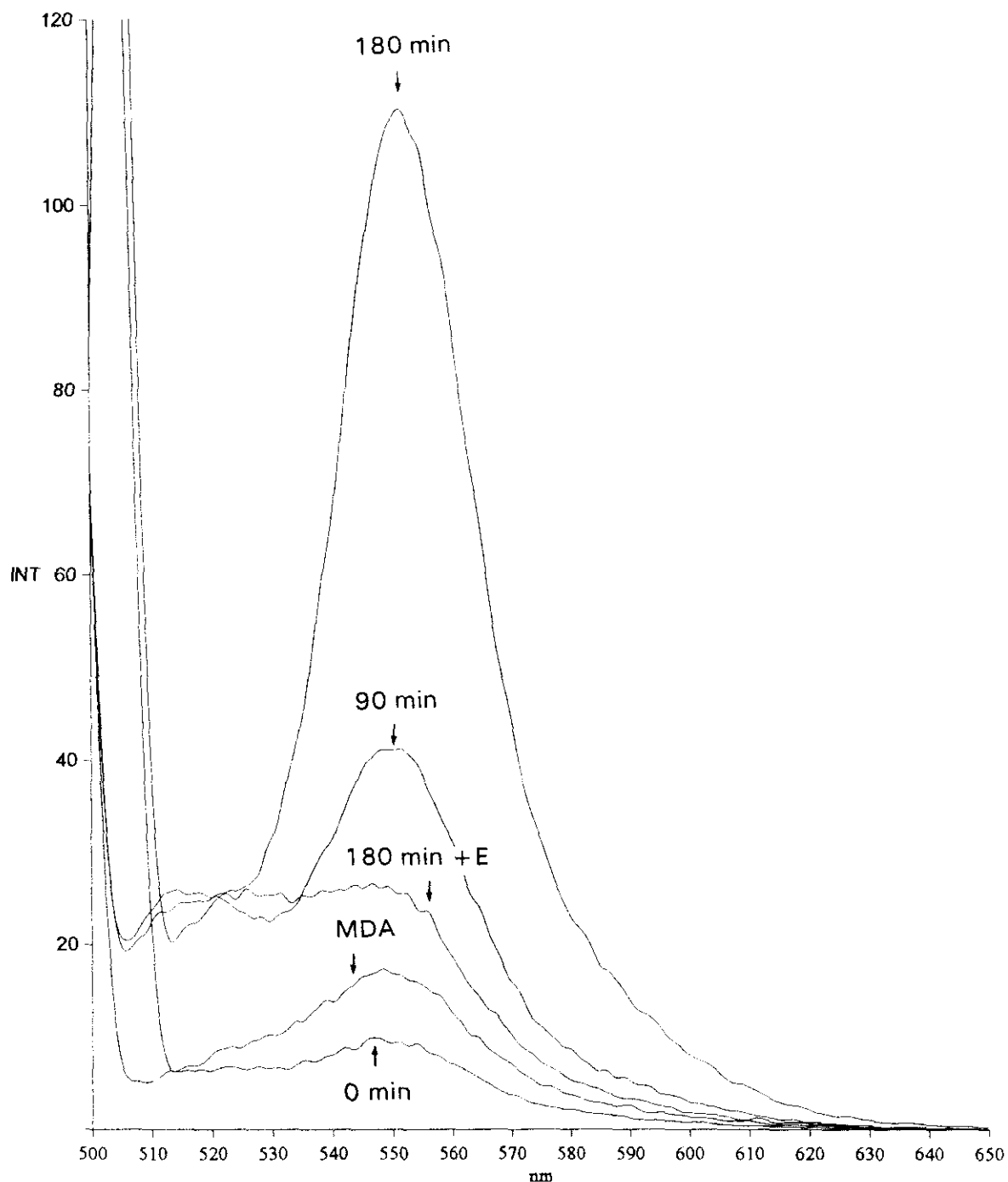


Figura 30. Espectro de emisión de fluorescencia de productos de peroxidación lipídica (TBARS) de muestras de corazón incubadas en presencia de ascorbato 0,4 mM y 0,05 mM FeSO_4 a 37°C. Excitación: 503 nm. 0 min, 90 min y 180 min: emisión de fluorescencia de una muestra del grupo E BAJA en función del tiempo de incubación; 180 min +E: muestra del grupo E MEDIA incubada durante 180 min; MDA: espectro de fluorescencia de un estándar de MDA.

IV. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA EN EL HÍGADO Y EL CORAZÓN DE COBAYAS SOMETIDOS A SHOCK ENDOTÓXICO INDUCIDO POR LIPOPOLISÁCARIDO (LPS) DE *E. coli*.

En este estudio los cobayas fueron suplementados con 33 mg vitamina C y < 15 mg vitamina E/kg dieta (C BAJA E BAJA), 660 mg vitamina C y < 15 mg vitamina E/kg dieta (+LPS +C), 33 mg vitamina C y 150 mg vitamina E/kg dieta (+LPS +E), ó 660 mg vitamina C y 150 mg vitamina E/kg dieta (+LPS +C+E) durante 5 semanas. Los animales tratados con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* recibieron una inyección intraperitoneal de LPS serotipo 0111:B4 (1,6 mg/100 g peso) 4 ó 5 horas antes de ser sacrificados.

1. PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

El peso corporal de los cobayas aumentó significativamente en la tercera semana respecto al inicio del tratamiento. Tras cinco semanas de suplementación, sólo los grupos suplementados con vitamina C aumentaron significativamente su peso corporal (tabla 30).

Al final del período experimental, los dos grupos suplementados con cantidades medias de vitamina C presentaron mayor peso corporal ($p < 0,001$) que los otros dos grupos.

En la tercera semana de tratamiento, la ingesta de alimento aumentó significativamente en el grupo C BAJA E BAJA a diferencia de lo que ocurrió en el resto de los grupos que presentaron valores de ingesta más bajos.

Tras la quinta semana, aumentó la ingesta de los grupos suplementados con vitamina C y disminuyó la de los demás grupos. Los grupos suplementados con vitamina C mostraron una ingesta mayor, de acuerdo con lo observado para el peso corporal (tabla 31).

Tabla 30. Peso corporal de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas.

		PESO CORPORAL (g)			
	C BAJA E BAJA	+LPS +C	+LPS +E	+LPS +C+E	
SEMANA 1	370,2 ± 8,3 (12) ***	353,2 ± 15,9 (6) ***	364,5 ± 14,1 (6) ***	362,6 ± 4,8 (5) ***	
SEMANA 3	491,1 ± 9,5 (12)	484,9 ± 12,4 (6) ***	483,2 ± 17,6 (6)	484,5 ± 23,5 (5) ***	
SEMANA 5	502,8 ± 19,2 (12) ^{b****} ***	632,8 ± 12,6 (6) ^{b****} ***	484,9 ± 37,7 (6) ^{b****} ***	638,8 ± 19,8 (5) ^{a****b****}	

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan: a: diferencias respecto al grupo C BAJA E BAJA; b: diferencias respecto a la primera semana; los asteriscos situados verticalmente indican diferencias respecto al tiempo de tratamiento; ***p < 0,001.

Tabla 31. Ingesta diaria de alimento de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas.

INGESTA DE ALIMENTO (g/cobaya.día)							
	C BAJA E BAJA		+LPS +C		+LPS +E		+LPS +C+E
SEMANA 1	42,5 ± 1,0 (9) *		42,2 ± 0,0 (6)		44,2 ± 0,5 (6)		45,6 ± 0,0 (2)
SEMANA 3	46,2 ± 1,2 (12) **	**	40,8 ± 0,8 (6) ***		41,9 ± 1,2 (6) ^{a*} *		44,5 ± 0,0 (5) ***
SEMANA 5	40,7 ± 1,1 (12)		44,9 ± 0,1 (6) ^{b**}	**	35,2 ± 3,3 (6) ^{a*b**}	***	49,0 ± 0,7 (5) ^{a**b**}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan: a: diferencias respecto al grupo C BAJA E BAJA; b: diferencias respecto a la primera semana; los asteriscos situados verticalmente indican diferencias respecto al tiempo de tratamiento; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

2. HÍGADO

A. Ácido ascórbico y α -tocoferol

Los dos grupos suplementados con vitamina E presentaron valores hepáticos de α -tocoferol significativamente mayores que el resto de los grupos (figura 31a y tabla 32). El grupo suplementado con ambas vitaminas (+LPS +C+E) presentó valores mayores de α -tocoferol que el tratado sólo con vitamina E (+LPS +E), sugiriendo un sinergismo entre ambos antioxidantes, al menos en presencia de LPS.

Los niveles hepáticos de ácido ascórbico, que resultaron detectables sólo en los grupos suplementados con vitamina C, no mostraron diferencias significativas entre estos dos grupos, aunque los valores tendieron a ser más altos en el grupo suplementado con ambas vitaminas (figura 31b y tabla 32).

B. Razón GSH/GSSG

La razón GSH/GSSG no se modificó significativamente debido al tratamiento con LPS o a la suplementación con vitaminas C y E en la dieta (figura 32a y tabla 32). Sin embargo, se observó una tendencia a mostrar valores más altos en los grupos suplementados con una o ambas vitaminas.

C. MDA libre

Los niveles hepáticos de MDA libre (HPLC) no mostraron diferencias significativas entre los cinco grupos de cobayas (figura 32b y tabla 33).

D. Daño oxidativo a proteínas

El tratamiento con LPS aumentó la concentración hepática de carbonilos proteicos respecto al grupo C BAJA E BAJA. Sin embargo, los dos grupos suplementados en la dieta con vitamina C mostraron valores significativamente más bajos (figura 33a y tabla 33).

Tabla 32. Vitamina C, vitamina E y razón GSH/GSSG en el hígado de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

HÍGADO					
	C BAJA E BAJA	+LPS	+LPS +C	+LPS +E	+LPS +C+E
VITAMINA C	0,0 ± 0,0 (5)	0,0 ± 0,0 (6)	1,66 ± 0,15 (4) ^{****}	0,0 ± 0,0 (4)	1,91 ± 0,26 (4) ^{****}
VITAMINA E	30,7 ± 5,5 (5)	32,0 ± 4,8 (5)	35,0 ± 5,9 (4)	49,9 ± 6,6 (4) ^{b*}	74,1 ± 9,0 (4) ^{c****}
GSH/GSSG	34,8 ± 3,2 (4)	38,7 ± 3,7 (6)	46,6 ± 6,9 (4)	45,6 ± 6,9 (4)	47,3 ± 3,0 (4)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (μ moles/g tejido) y vitamina E (μ g/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados horizontalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan: a: diferencias respecto a los grupos C BAJA E BAJA, +LPS y +LPS +E; b: diferencias respecto al grupo C BAJA E BAJA; c: diferencias respecto a los grupos C BAJA E BAJA, +LPS y +LPS +C; * $p < 0,05$ y **** $p < 0,001$.

HIGADO

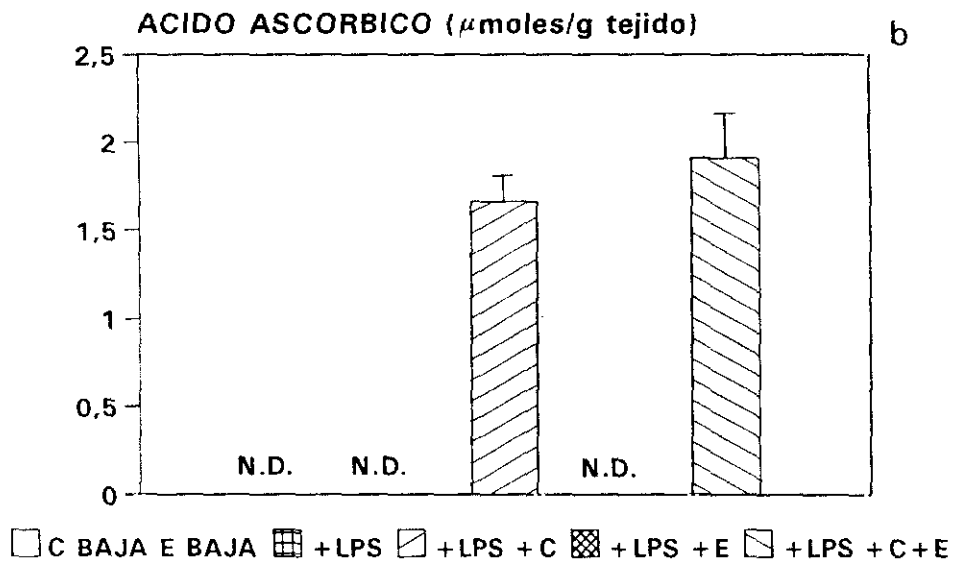
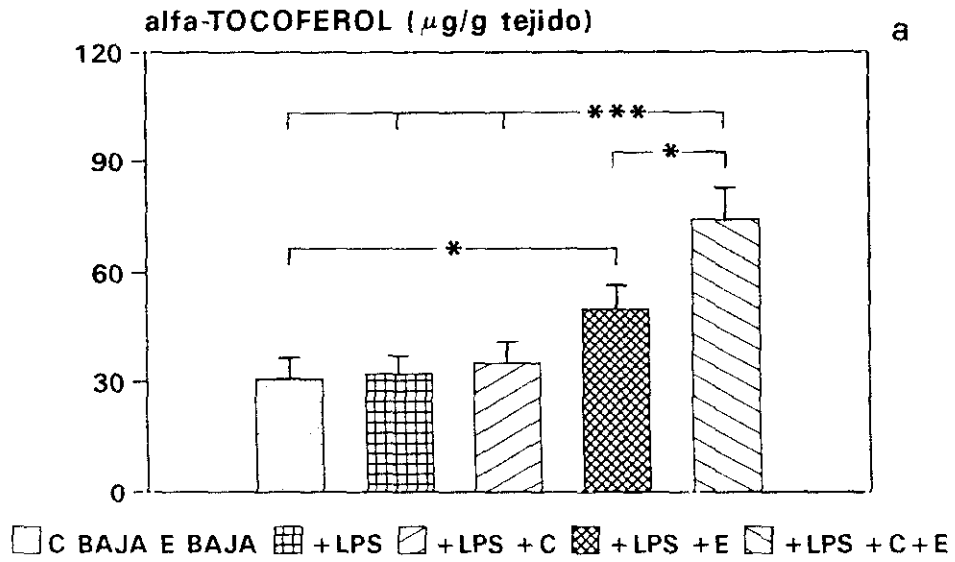


Figura 31. Concentración hepática de α -tocoferol (a) y ácido ascórbico (b) en cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS). N.D.: no detectado. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

HIGADO

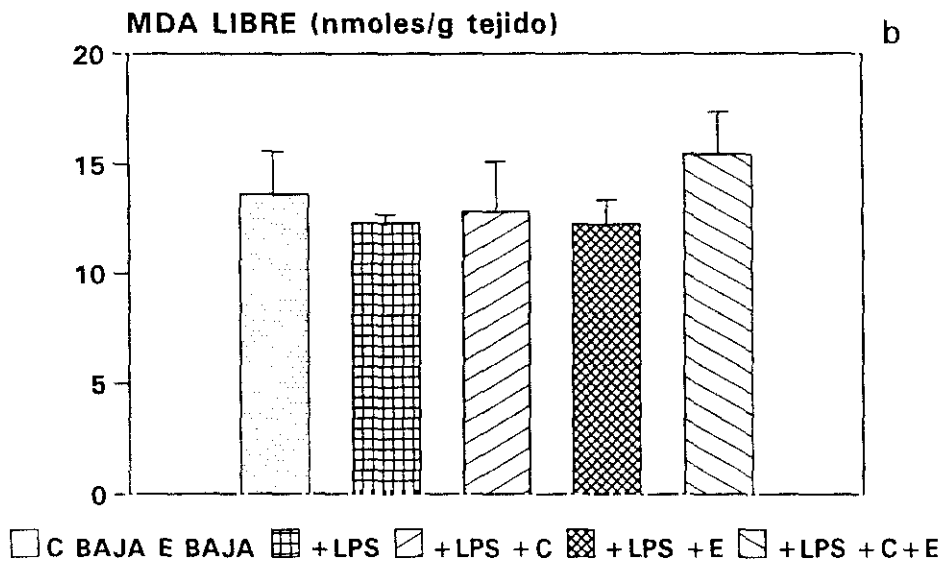
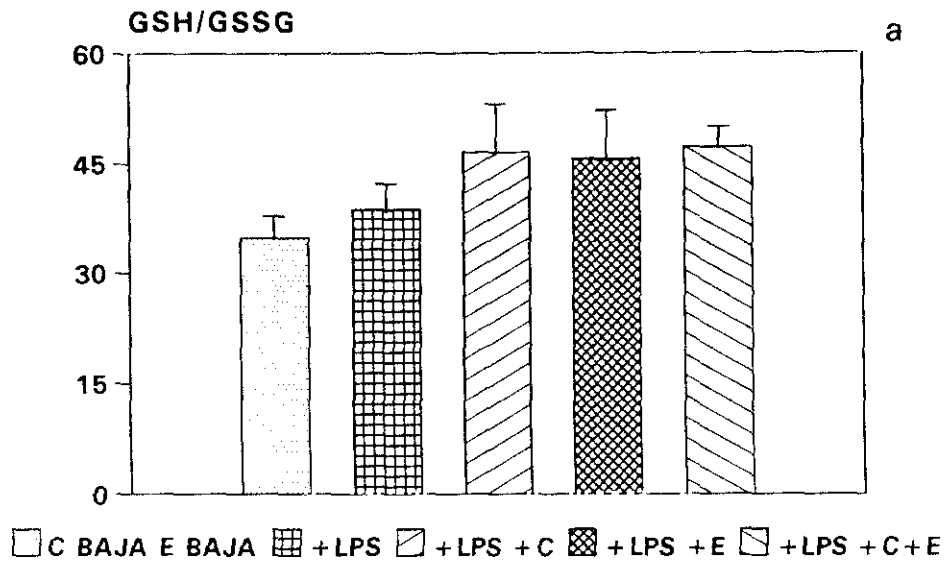


Figura 32. Razón GSH/GSSG (a) y contenido en MDA libre (b) en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

Tabla 33. Malondialdehído (MDA) libre (HPLC), carbonilos proteicos y 8-OHdG, estimadores del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, en el hígado de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

HÍGADO

	C BAJA E BAJA	+LPS	+LPS +C	+LPS +E	+LPS +C+E
MDA LIBRE	13,6 ± 2,1 (5)	12,3 ± 0,5 (5)	12,8 ± 2,3 (4)	12,3 ± 1,1 (3)	15,4 ± 2,0 (4)
CARBONILOS	2,40 ± 0,65 (4) *	6,20 ± 1,58 (5)	2,07 ± 0,51 (3)*	5,68 ± 1,01 (3)	3,94 ± 1,08 (3)*
8-OHdG/10 ⁵ dG	2,32 ± 0,38 (5)	2,60 ± 0,30 (6)	2,32 ± 0,49 (4)	2,20 ± 0,41 (4)	2,18 ± 0,14 (4)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. MDA (nmoles/g tejido) y carbonilos proteicos (nmoles/mg proteína). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los asteriscos situados verticalmente entre dos grupos indican diferencias significativas entre esos dos grupos; los superíndices representan diferencias respecto al grupo +LPS; *p < 0,05.

HIGADO

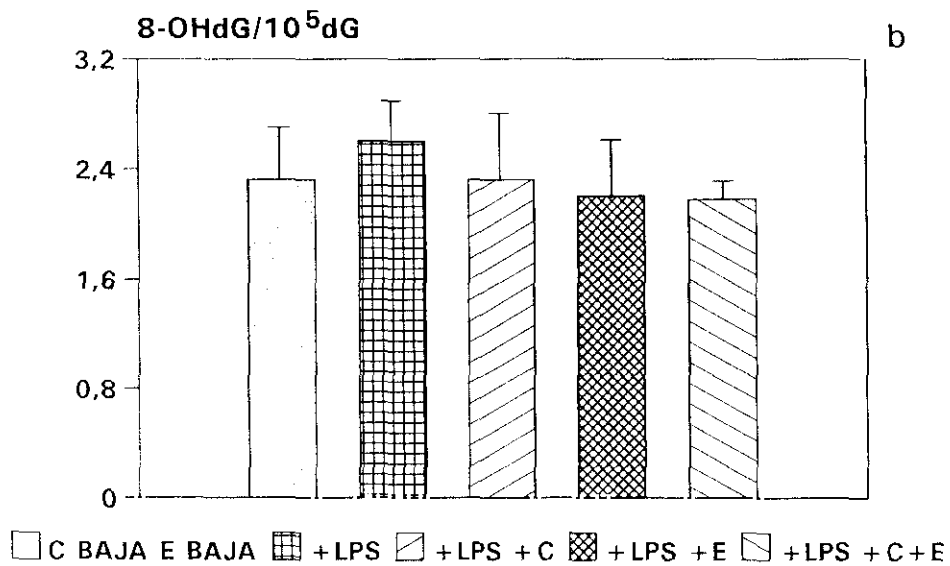
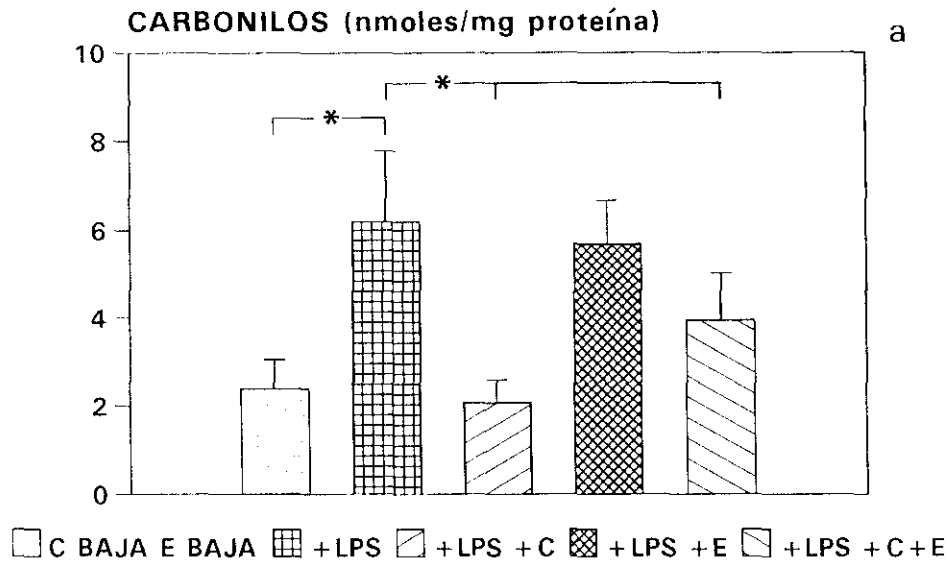


Figura 33. Contenido en carbonilos proteicos (a) y 8-OHdG (b) en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS). Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

E. Daño oxidativo al ADN

La razón 8-OHdG/10⁵ dG no se modificó significativamente en función del tratamiento, aunque se observó un aumento con el tratamiento con LPS, que tendió a remitir en los grupos LPS +C, LPS +E, y especialmente en LPS +C+E (figura 33b y tabla 33).

F. Peroxidación lipídica (TBARS)

La incubación de las muestras en presencia de ascorbato-Fe²⁺ aumentó los productos de peroxidación lipídica *in vitro* en todos los grupos experimentales, aunque este aumento fue mayor en los grupos con cantidades bajas de vitaminas, medio en el grupo +LPS +C y menor en los dos grupos suplementados con vitamina E (figura 34 y tabla 34).

Los tres grupos suplementados con vitaminas presentaron valores de TBA significativamente menores ($p < 0,001$) que los demás grupos a los 90 y 180 min y 22 h de incubación en presencia de ascorbato-Fe²⁺.

Tabla 34. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

HÍGADO

TBA (nmoles MDA/g tejido)					
TIEMPO	C BAJA E BAJA	+LPS	+LPS +C	+LPS +E	+LPS +C+E
0 min	138,9 ± 41,6 **	91,9 ± 7,3 ***	98,5 ± 12,9	90,6 ± 2,5 ***	83,9 ± 13,0
90 min	737,5 ± 95,4	576,5 ± 81,5 **	191,7 ± 22,3 ^{a***}	186,1 ± 7,5 ^{a***}	143,2 ± 15,8 ^{a***}
180 min	939,0 ± 114,7 ^{b**}	935,0 ± 131,4 ^{b***}	308,1 ± 72,0 ^{a***}	192,9 ± 20,9 ^{a***b***}	155,6 ± 15,0 ^{a***}
22 h	838,7 ± 47,0 ^{b**}	796,4 ± 76,0 ^{b***}	354,4 ± 171,2 ^{a***}	153,3 ± 5,4 ^{a***b**}	139,8 ± 29,8 ^{a***}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 5 (C BAJA E BAJA), 6 (+LPS) y 4 (+LPS +C; +LPS +E; +LPS +C+E) animales. Los asteriscos situados verticalmente indican diferencias significativas respecto al tiempo de incubación; los superíndices representan: a: diferencias respecto a los grupos C BAJA E BAJA y +LPS; b: diferencias respecto a tiempo 0 min; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

HIGADO

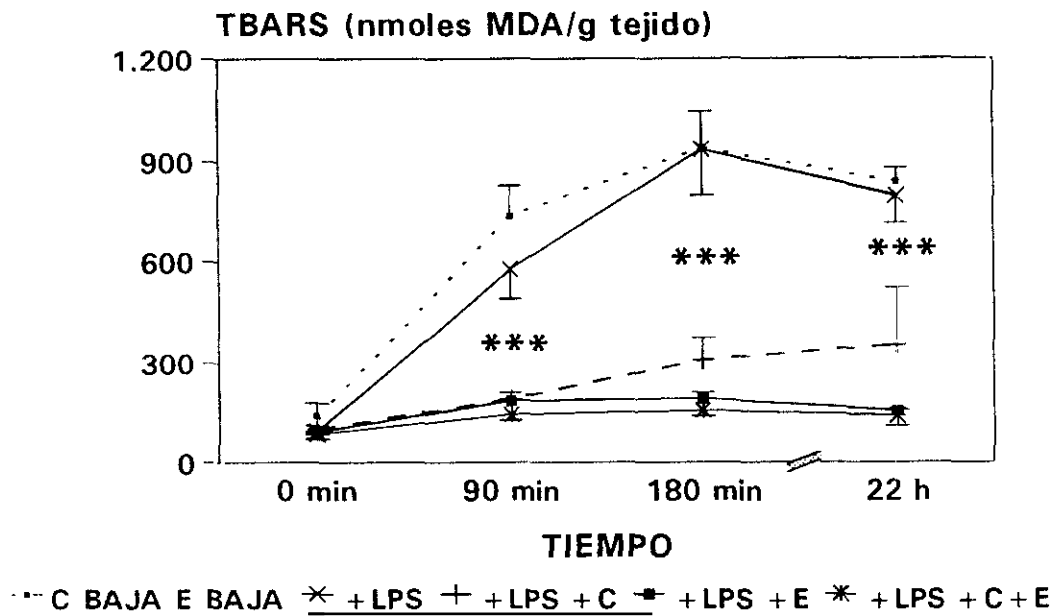


Figura 34. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS). Diferencias significativas entre los grupos C BAJA E BAJA y +LPS y los grupos +LPS +C, +LPS +E y +LPS +C+E; *** $p < 0,001$.

3. CORAZÓN

A. Ácido ascórbico y α -tocoferol

Los niveles de ascorbato en el corazón de cobayas suplementados con dietas deficientes en vitamina C se encontraban por debajo del límite de detección. Tras cuatro horas de tratamiento con LPS, el contenido en ascorbato del corazón desapareció totalmente en los grupos suplementados con vitamina C (tabla 35), ya que con estos niveles sabemos por los experimentos anteriores que la concentración cardíaca de ascorbato es más que detectable.

El contenido en vitamina E aumentó significativamente en los grupos +LPS +E y +LPS +C+E en relación con los grupos no suplementados (figura 35 y tabla 35). El tratamiento con LPS no afectó a los niveles de vitamina E del corazón.

B. Razón GSH/GSSG

La razón GSH/GSSG no se modificó por el tratamiento con LPS ni por la suplementación con vitaminas C y E en la dieta (figura 36 y tabla 35).

C. MDA libre

No se observaron cambios significativos en los niveles de MDA libre (HPLC) tras el tratamiento con LPS ni tras la suplementación con vitaminas C y E en la dieta (tabla 36). Los niveles de MDA en el grupo +LPS +E no fueron detectables.

C. Peroxidación lipídica (TBARS)

Los productos de peroxidación lipídica aumentaron en todos los grupos experimentales en función del tiempo de incubación en presencia de ascorbato-Fe²⁺. Sin embargo, este aumento fue mucho mayor en los tres grupos con niveles bajos de vitamina E que en los grupos suplementados con esta vitamina (figura 37 y tabla 37).

Tabla 35. Vitamina C, vitamina E y razón GSH/GSSG en el corazón de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

CORAZÓN					
	C BAJA E BAJA	+LPS	+LPS +C	+LPS +E	+LPS +C+E
VITAMINA C	0,0 ± 0,0 (5)	0,0 ± 0,0 (6)	0,0 ± 0,0 (4)	0,0 ± 0,0 (4)	0,0 ± 0,0 (4)
VITAMINA E	6,8 ± 1,1 (5)	6,4 ± 0,8 (5)	6,2 ± 1,3 (4)	16,6 ± 3,4 (4)**	16,9 ± 2,9 (4)**
GSH/GSSG	45,7 ± 7,3 (3)	37,8 ± 2,4 (6)	43,3 ± 5,4 (4)	38,5 ± 4,4 (4)	35,4 ± 3,6 (4)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (nmoles/g tejido) y vitamina E (µg/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Los superíndices representan diferencias significativas con los grupos C BAJA E BAJA, +LPS y +LPS +C; **p < 0,01.

CORAZON

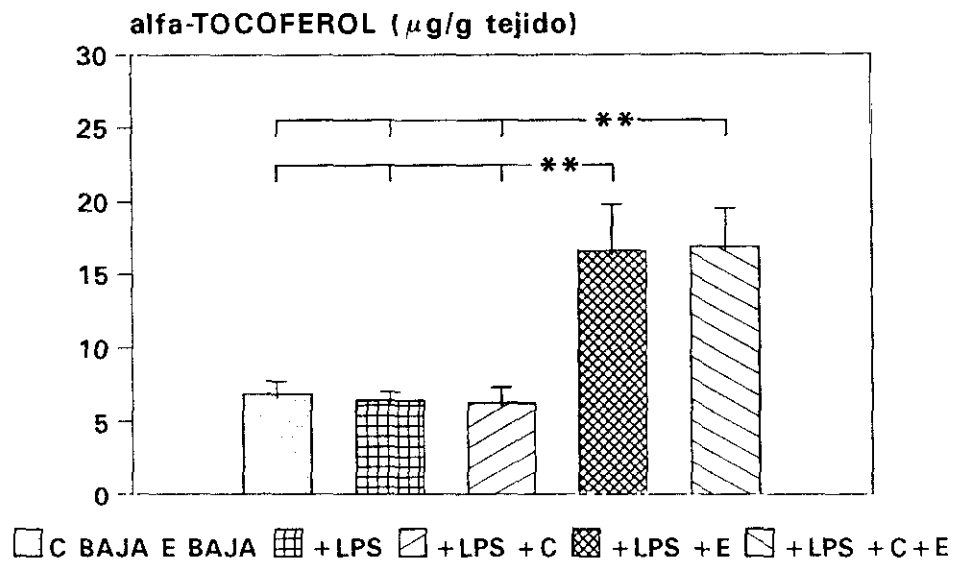


Figura 35. Concentración de α -tocoferol en el corazón de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS). Diferencias significativas: ** $p < 0,01$.

CORAZON

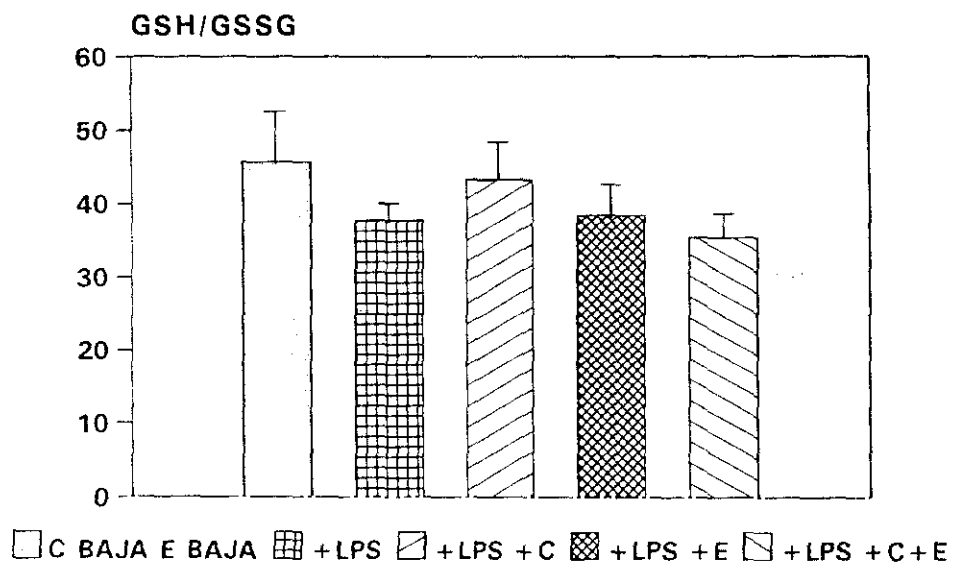


Figura 36. Razón GSH/GSSG en el corazón de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

Tabla 36. Malondialdehído (MDA) libre (HPLC) en el corazón de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

	CORAZÓN				
	C BAJA E BAJA	+LPS	+LPS +C	+LPS +E	+LPS +C+E
MDA LIBRE	2,03 ± 0,63 (5)	3,26 ± 1,04 (5)	1,46 ± 0,56 (3)	0,00 ± 0,00 (4)	2,86 ± 0,77 (4)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. MDA (nmoles/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

Tabla 37. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el corazón de cobayas suplementados con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS).

CORAZÓN

TBA (nmoles MDA/g tejido)					
TIEMPO	C BAJA E BAJA	+LPS	+LPS +C	+LPS +E	+LPS +C+E
0 min	77,9 ± 8,6	74,3 ± 4,3 *	56,7 ± 10,5 ^a	61,3 ± 3,2 *	55,6 ± 6,3 ^a **
90 min	343,5 ± 64,7	445,5 ± 93,2 *	356,6 ± 54,5 *	166,9 ± 9,1 ^{b**}	155,6 ± 14,6 ^{b**}
180 min	639,9 ± 155,5 ^{d**}	778,3 ± 161,7 ^{d***}	776,8 ± 165,1 ^{d***}	190,6 ± 15,3 ^{c*d*}	163,5 ± 7,5 ^{c**d**}
22 h	577,6 ± 154,9 ^{d**}	523,8 ± 99,1 ^{d**}	541,9 ± 137,1 ^{d**}	142,5 ± 21,8 ^{c*}	148,8 ± 28,1 ^{c*d**}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de 5 (C BAJA E BAJA), 6 (+LPS) y 4 (+LPS +C; +LPS +E; +LPS +C+E) animales. Los asteriscos situados verticalmente indican diferencias significativas respecto al tiempo de incubación; los superíndices representan: a: diferencias respecto al grupo C BAJA E BAJA; b: diferencias respecto al grupo +LPS; c: diferencias respecto a los grupos C BAJA E BAJA, +LPS y +LPS +C; d: diferencias respecto a tiempo 0 min; *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001.

CORAZON

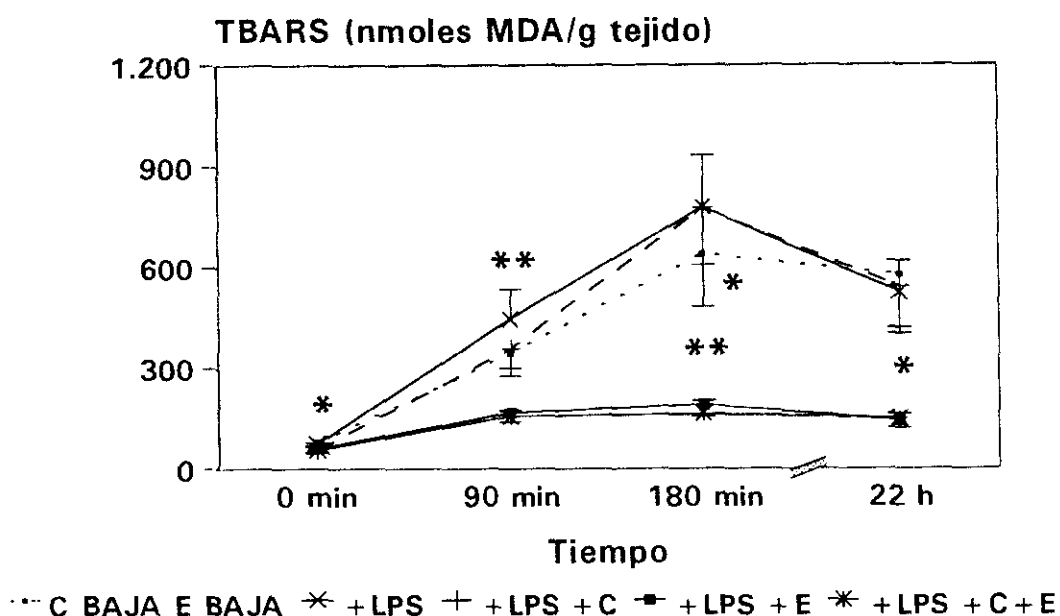


Figura 37. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el corazón de cobayas suplementados con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 5 semanas y tratados con endotoxina (LPS). Diferencias significativas: 0 min: diferencias entre el grupo C BAJA E BAJA y los grupos +LPS +C y +LPS +C+E; 90 min: diferencias entre el grupo +LPS y los grupos +LPS +E y +LPS +C+E; 180 min y 22 h: diferencias entre los grupos C BAJA E BAJA, +LPS y +LPS +C y los grupos +LPS +E y +LPS +C+E; *p<0,05 y **p<0,01.

V. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA SOBRE LOS HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL HÍGADO Y EL PLASMA DE RATAS ODS.

Las ratas ODS utilizadas en este estudio recibieron dietas suplementadas con 5 (E BAJA), 50 (E MEDIA) ó 250 (E ALTA) mg vitamina E/kg dieta, y 150 (C BAJA), 300 (C MEDIA) ó 900 (C ALTA) mg vitamina C/kg dieta, durante 21 días.

1. PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

El tratamiento con nueve dietas con diferente contenido en vitaminas E y C no modificó el incremento de peso corporal (tabla 38) ni la ingesta de alimento de las ratas a 1, 2 ó 3 semanas de suplementación.

2. HÍGADO

A. α -Tocoferol y ácido ascórbico

La suplementación con vitamina E en la dieta dió lugar a niveles de α -tocoferol muy diferentes en el hígado de las ratas ODS (figura 38a y tabla 39). El incremento de vitamina E en la dieta del grupo E BAJA al grupo E MEDIA resultó en un 225% de incremento en los niveles de α -tocoferol hepático y en un incremento del 75% cuando la vitamina E en la dieta aumentó del grupo E MEDIA al grupo E ALTA ($p < 0,001$).

La concentración hepática de α -tocoferol en el grupo E BAJA (4-4,4 $\mu\text{g/g}$) era mayor que la de ratas deficientes en vitamina E.

El contenido en vitamina C de la dieta también modificó la concentración de ácido ascórbico en el hígado (figura 38b y tabla 39). El ácido ascórbico hepático aumentó significativamente del grupo C BAJA al grupo C MEDIA a todos los niveles de vitamina E, mientras que sólo se detectó un incremento significativo del grupo C MEDIA al grupo C ALTA en el grupo E MEDIA. El contenido en vitamina E de la dieta no afectó a los niveles de ácido ascórbico.

Tabla 38. Incremento de peso corporal en ratas ODS suplementadas con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días.

INCREMENTO DE PESO CORPORAL (g)			
	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3
E BAJA C BAJA	36,2 ± 1,4	63,4 ± 2,4	83,4 ± 3,3
E BAJA C MEDIA	36,8 ± 0,9	66,8 ± 1,5	88,0 ± 1,9
E BAJA C ALTA	34,5 ± 0,9	61,6 ± 0,9	81,8 ± 1,7
E MEDIA C BAJA	36,0 ± 1,9	63,4 ± 3,2	84,4 ± 3,8
E MEDIA C MEDIA	34,8 ± 0,1	62,2 ± 2,7	82,8 ± 2,5
E MEDIA C ALTA	36,0 ± 0,4	63,3 ± 1,5	85,4 ± 2,1
E ALTA C BAJA	36,6 ± 1,2	62,8 ± 1,8	83,0 ± 1,3
E ALTA C MEDIA	36,0 ± 1,7	64,4 ± 1,8	86,2 ± 1,8
E ALTA C ALTA	35,4 ± 1,2	62,8 ± 1,5	84,0 ± 1,8

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de cinco animales por grupo.

Tabla 39. Vitaminas C y E en el hígado de ratas ODS suplementadas con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días.

HÍGADO		
	VITAMINA C	VITAMINA E
E BAJA C BAJA	0,50 ± 0,03 (3) ^{A,a}	4,0 ± 0,2 (5) ^{A,a}
E BAJA C MEDIA	0,76 ± 0,06 (3) ^{A,b}	4,2 ± 0,2 (5) ^{A,a}
E BAJA C ALTA	0,79 ± 0,10 (3) ^{A,b}	4,4 ± 0,3 (5) ^{A,a}
E MEDIA C BAJA	0,58 ± 0,08 (3) ^{A,a}	13,7 ± 0,8 (5) ^{B,a}
E MEDIA C MEDIA	0,83 ± 0,04 (3) ^{A,b}	13,8 ± 0,6 (5) ^{B,a}
E MEDIA C ALTA	1,15 ± 0,05 (3) ^{A,c}	13,7 ± 0,7 (5) ^{B,a}
E ALTA C BAJA	0,56 ± 0,08 (3) ^{A,a}	23,3 ± 1,2 (5) ^{C,a}
E ALTA C MEDIA	0,93 ± 0,06 (3) ^{A,b}	23,2 ± 2,3 (5) ^{C,a}
E ALTA C ALTA	1,01 ± 0,14 (3) ^{A,b}	26,4 ± 4,6 (5) ^{C,a}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (μ moles/g tejido) y vitamina E (μ g/g tejido). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes; vitamina C: $p < 0,05$ excepto entre los grupos E MEDIA C BAJA y E MEDIA C ALTA ($p < 0,001$); vitamina E: $p < 0,001$ excepto entre los grupos E MEDIA C ALTA y E ALTA C ALTA ($p < 0,05$).

HIGADO

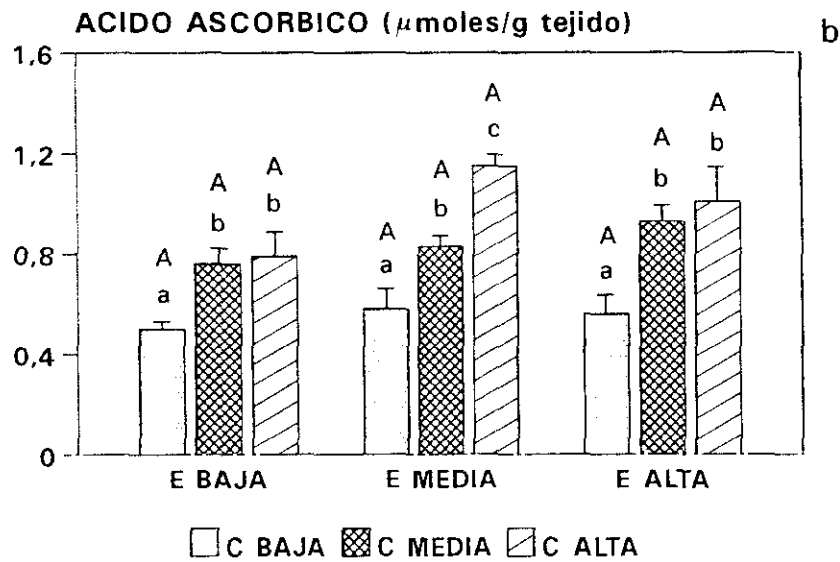
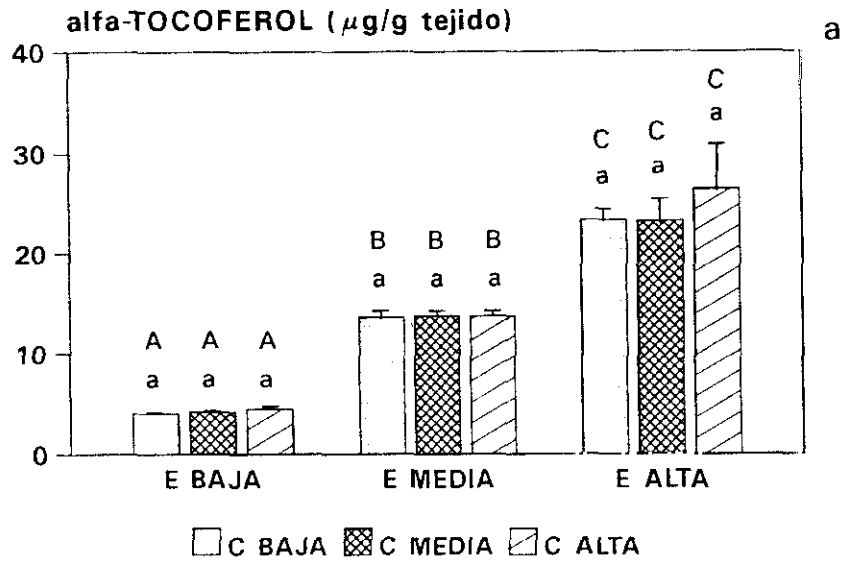


Figura 38. Concentración hepática de α -tocoferol (a) y ácido ascórbico (b) en ratas ODS suplementadas con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes (a): $p < 0,001$ excepto entre los grupos E MEDIA C ALTA y E ALTA C ALTA ($p < 0,05$); (b): $p < 0,05$ excepto entre los grupos E MEDIA C BAJA y E MEDIA C ALTA ($p < 0,001$).

B. Peroxidación lipídica (TBARS)

Los niveles endógenos de peroxidación lipídica en el hígado (TBARS a 0 min) disminuyeron significativamente del grupo E BAJA al grupo E MEDIA en el grupo C BAJA, y del E BAJA al E ALTA en los grupos C BAJA y C MEDIA (figura 39a y tabla 40).

La incubación *in vitro* de los sobrenadantes hepáticos con ascorbato- Fe^{2+} aumentó la peroxidación lipídica (TBARS) por encima de los niveles basales en los nueve grupos de animales (figura 39b y tabla 40). El incremento en la peroxidación lipídica desde 0 hasta 180 minutos de incubación fue especialmente notable en los grupos E BAJA. Los valores de TBA *in vitro* disminuyeron significativamente del grupo E BAJA al grupo E MEDIA en todos los grupos de vitamina C. Los valores de TBA no mostraron diferencias entre los grupos de vitamina C.

C. Hidroperóxidos de lípidos de membrana

Los hidroperóxidos lipídicos de fosfatidilcolina (PCOOH) y fosfatidiletanolamina (PEOOH) no mostraron diferencias significativas entre los grupos de vitamina C en ningún caso, mientras que se observó una tendencia sistemática a mostrar niveles más bajos de hidroperóxidos a medida que aumentaba el contenido en vitamina E en la dieta (figura 40 y tabla 41).

La falta de efecto de la vitamina C permitió agrupar los datos de los tres subgrupos de vitamina C en cada grupo de vitamina E, observándose que los dos hidroperóxidos (PCOOH y PEOOH) disminuyeron significativamente al aumentar el contenido en vitamina E de la dieta (figura 41 y tabla 42). Esta disminución ocurrió entre los grupos E BAJA y E ALTA para PCOOH y fue evidente ya entre E BAJA y E MEDIA para PEOOH.

Tabla 40. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* e *in vitro* en el hígado de ratas ODS suplementadas con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días.

HÍGADO		
TBA (nmoles MDA/g tejido)		
	TIEMPO	
	0 min	180 min
E BAJA C BAJA	145,4 ± 9,1 (5) ^{A,a}	376,3 ± 115,4 (5) ^{A,a}
E BAJA C MEDIA	158,5 ± 19,7 (5) ^{A,a}	428,8 ± 117,0 (4) ^{A,a}
E BAJA C ALTA	150,0 ± 15,0 (5) ^{A,a}	387,7 ± 88,7 (5) ^{A,a}
E MEDIA C BAJA	87,8 ± 8,8 (5) ^{B,a}	114,8 ± 5,8 (4) ^{B,a}
E MEDIA C MEDIA	121,0 ± 6,6 (4) ^{AB,a}	136,7 ± 6,5 (4) ^{B,a}
E MEDIA C ALTA	116,0 ± 17,1 (5) ^{A,a}	118,4 ± 8,6 (5) ^{B,a}
E ALTA C BAJA	106,9 ± 15,0 (5) ^{B,a}	123,4 ± 13,1 (5) ^{B,a}
E ALTA C MEDIA	108,9 ± 10,4 (5) ^{B,a}	123,3 ± 12,4 (5) ^{B,a}
E ALTA C ALTA	111,1 ± 11,4 (5) ^{A,a}	132,1 ± 10,8 (5) ^{B,a}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes; $p < 0,05$ excepto entre los grupos E BAJA C MEDIA y E ALTA C MEDIA, E BAJA C ALTA y E MEDIA C ALTA, y E BAJA C ALTA y E ALTA C ALTA a 180 min de incubación ($p < 0,001$).

HIGADO

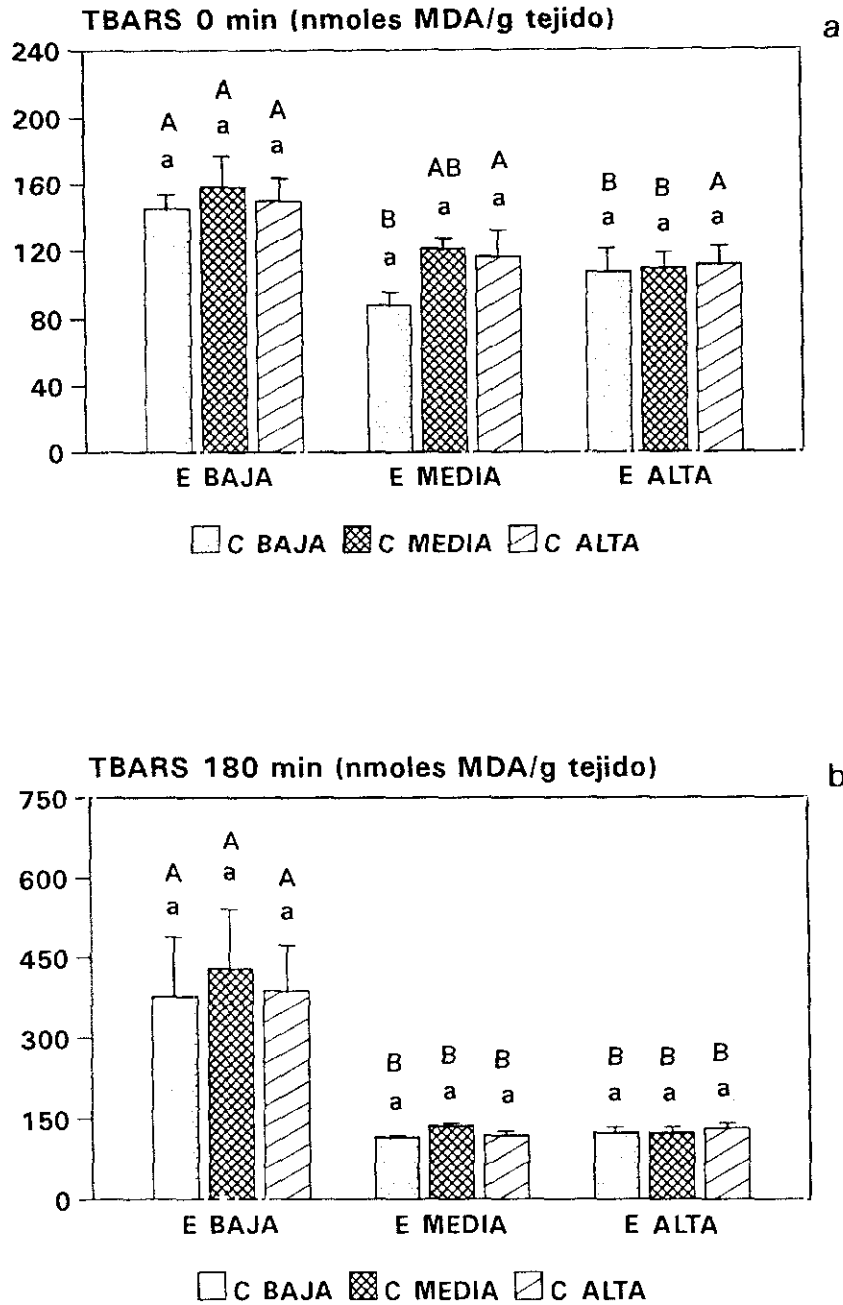


Figura 39. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* (a) e *in vitro* (b) en el hígado de ratas ODS suplementadas con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes, siendo $p < 0,05$ excepto entre los grupos E BAJA C MEDIA y E ALTA C MEDIA, E BAJA C ALTA y E MEDIA C ALTA, y E BAJA C ALTA y E ALTA C ALTA a 180 min de incubación ($p < 0,001$).

Tabla 41. Hidroperóxidos de fosfatidilcolina (PCOOH) y fosfatidiletanolamina (PEOOH) en el hígado de ratas ODS suplementadas con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días.

HÍGADO		
HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (pmoles/μg fósforo)		
	PCOOH	PEOOH
E BAJA C BAJA	4,09 \pm 0,94 (5)	2,36 \pm 0,51 (5)
E BAJA C MEDIA	3,92 \pm 0,89 (5)	2,56 \pm 0,58 (5)
E BAJA C ALTA	3,65 \pm 0,76 (5)	2,06 \pm 0,48 (5)
E MEDIA C BAJA	3,76 \pm 0,74 (5)	1,68 \pm 0,33 (5)
E MEDIA C MEDIA	3,26 \pm 0,79 (5)	1,50 \pm 0,34 (5)
E MEDIA C ALTA	2,93 \pm 0,61 (5)	1,49 \pm 0,32 (5)
E ALTA C BAJA	2,68 \pm 0,24 (5)	1,44 \pm 0,09 (5)
E ALTA C MEDIA	3,00 \pm 0,46 (5)	1,41 \pm 0,19 (5)
E ALTA C ALTA	2,43 \pm 0,64 (4)	1,35 \pm 0,28 (4)

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis.

HIGADO

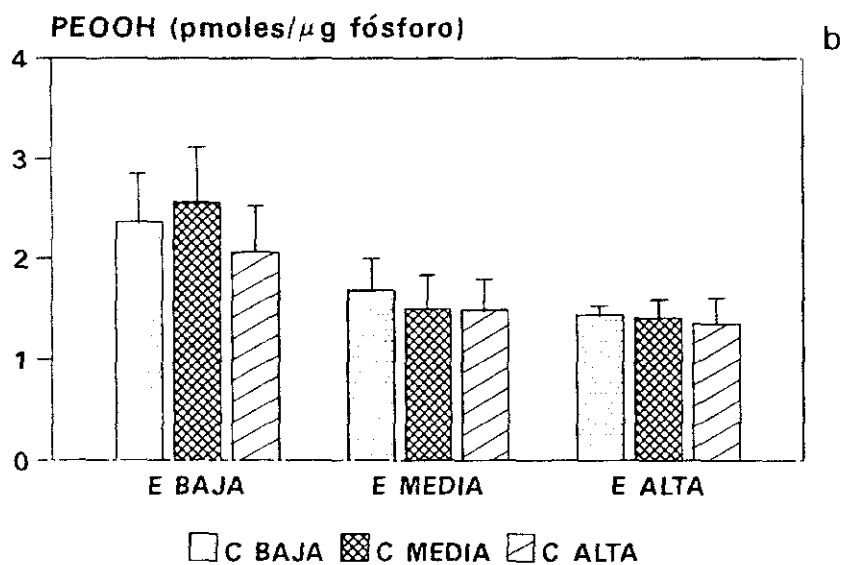
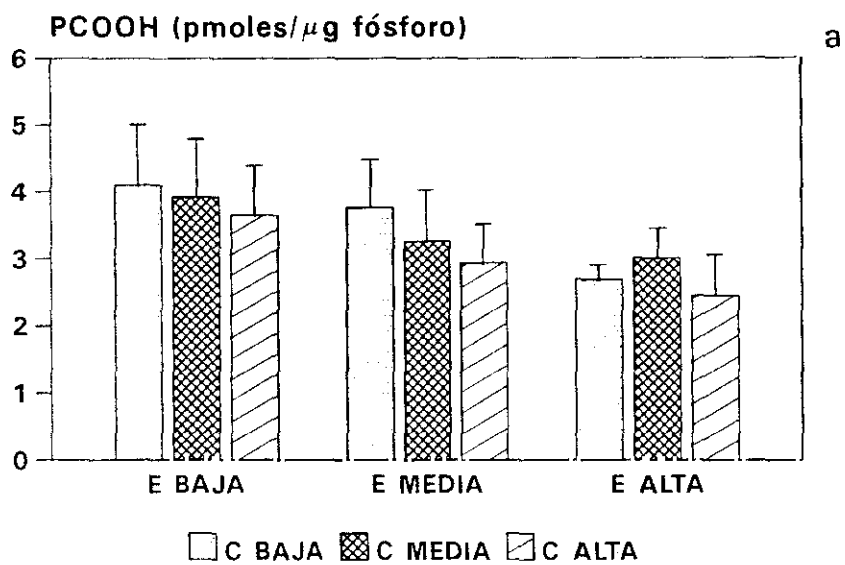


Figura 40. Concentración hepática de hidroperóxidos de fosfatidilcolina (PCOOH) (a) y fosfatidiletanolamina (PEOOH) (b) en ratas ODS suplementadas con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días.

Tabla 42. Hidroperóxidos de fosfatidilcolina (PCOOH) y fosfatidiletanolamina (PEOOH) en el hígado de ratas ODS suplementadas con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 21 días.

HÍGADO		
HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (pmoles/μg fósforo)		
	PCOOH	PEOOH
E BAJA	$3,89 \pm 0,47$ (15) ^A	$2,33 \pm 0,29$ (15) ^A
E MEDIA	$3,32 \pm 0,39$ (15) ^{AB}	$1,56 \pm 0,18$ (15) ^B
E ALTA	$2,72 \pm 0,25$ (14) ^B	$1,40 \pm 0,10$ (14) ^B

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar. El número de datos de cada grupo aparece entre paréntesis. Las medias que no comparten una letra común son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

HIGADO

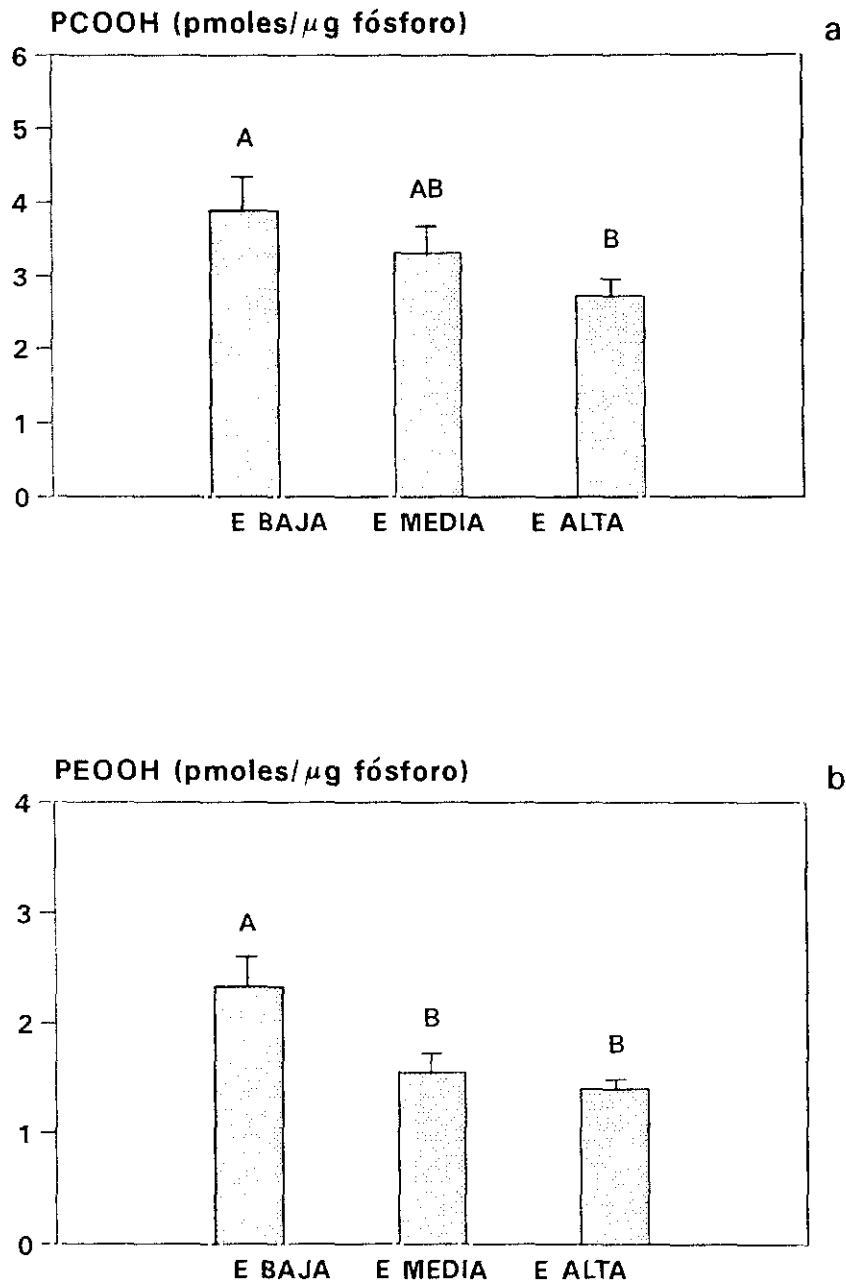


Figura 41. Concentración hepática de hidroperóxidos de fosfatidilcolina (PCOOH) (a) y fosfatidiletanolamina (PEOOH) (b) en ratas ODS suplementadas con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 21 días. Las medias que no comparten una letra común son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3. PLASMA

A. α -Tocoferol y ácido ascórbico

El incremento de vitamina E en la dieta del grupo E BAJA al grupo E MEDIA resultó en un aumento del 190% del α -tocoferol plasmático en todos los grupos de vitamina C (figura 42a y tabla 43). También se observó un incremento del α -tocoferol plasmático entre los grupos E MEDIA y E ALTA, aunque este aumento no alcanzó la significación estadística.

La concentración de α -tocoferol encontrada en el grupo E BAJA (1,1-1,3 $\mu\text{g/ml}$) era mayor que la de ratas deficientes en vitamina E.

La vitamina C aumentó significativamente los niveles de α -tocoferol en el plasma de las ratas ODS suplementadas con niveles bajos de vitamina E en la dieta, es decir, el grupo E BAJA C ALTA presentó niveles plasmáticos de vitamina E más altos que el grupo E BAJA C BAJA ($p < 0,05$).

Se observaron aumentos significativos en los niveles de ácido ascórbico plasmático entre los grupos C BAJA y C ALTA a todos los niveles de vitamina E (figura 42b y tabla 43). También se observaron aumentos significativos en los niveles de ascorbato plasmático entre los grupos C MEDIA y C ALTA en los grupos E MEDIA y E ALTA. El contenido en vitamina E de la dieta no afectó a los niveles de ácido ascórbico.

B. Peroxidación lipídica (TBARS)

Los niveles de TBARS *in vivo* disminuyeron del grupo E BAJA al grupo E MEDIA en todos los grupos de vitamina C (figura 43 y tabla 44). Los valores de TBA no mostraron diferencias entre los grupos de vitamina C, a las dosis estudiadas.

C. Hidroperóxidos de lípidos de membrana

No se detectaron hidroperóxidos lipídicos en el plasma de las ratas OSD.

Tabla 43. Vitaminas C y E en el plasma de ratas ODS suplementadas con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días.

PLASMA		
	VITAMINA C	VITAMINA E
E BAJA C BAJA	31,6 ± 1,3 (3) ^{A,a}	1,09 ± 0,07 (5) ^{A,a}
E BAJA C MEDIA	37,5 ± 1,6 (3) ^{A,ab}	1,16 ± 0,06 (5) ^{A,ab}
E BAJA C ALTA	45,8 ± 5,5 (3) ^{A,b}	1,30 ± 0,08 (5) ^{A,b}
E MEDIA C BAJA	36,6 ± 0,9 (3) ^{A,a}	3,42 ± 0,35 (4) ^{B,a}
E MEDIA C MEDIA	42,1 ± 1,0 (3) ^{A,a}	3,44 ± 0,10 (4) ^{B,a}
E MEDIA C ALTA	49,1 ± 2,6 (3) ^{A,b}	3,44 ± 0,45 (5) ^{B,a}
E ALTA C BAJA	34,0 ± 2,2 (3) ^{A,a}	3,97 ± 0,57 (5) ^{B,a}
E ALTA C MEDIA	37,2 ± 2,5 (3) ^{A,a}	4,24 ± 0,39 (5) ^{B,a}
E ALTA C ALTA	46,1 ± 1,0 (3) ^{A,b}	4,50 ± 0,48 (5) ^{B,a}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. Vitamina C (nmoles/ml plasma) y vitamina E (µg/ml plasma). El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes; vitamina C: $p < 0,05$; vitamina E: $p < 0,001$ excepto entre los grupos E BAJA C BAJA y E BAJA C ALTA ($p < 0,05$).

PLASMA

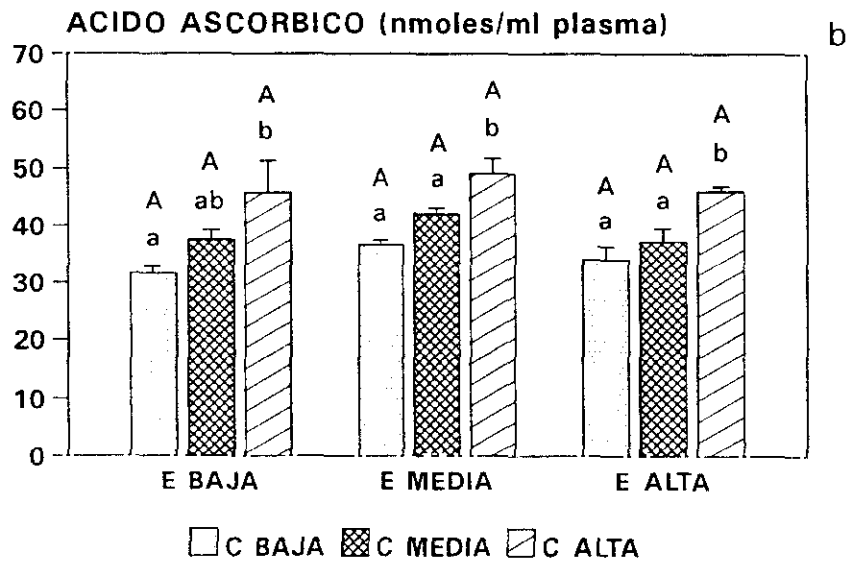
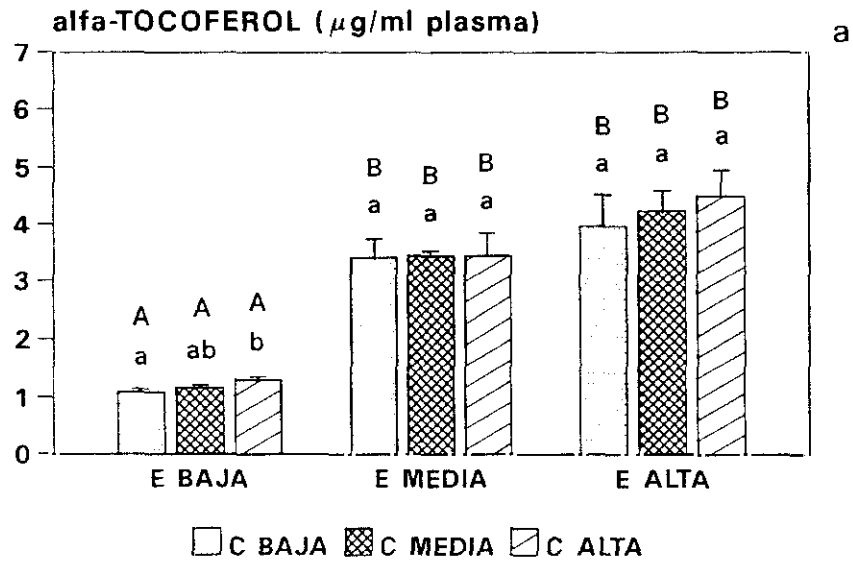


Figura 42. Concentración plasmática de α -tocoferol (a) y ácido ascórbico (b) en ratas ODS suplementadas con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes (a): $p < 0,001$ excepto entre los grupos E BAJA C BAJA y E BAJA C ALTA ($p < 0,05$); (b): $p < 0,05$.

Tabla 44. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* en el plasma de ratas ODS suplementadas con cantidades diferentes de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días.

PLASMA	
TBA (nmoles MDA/ml plasma)	
	TIEMPO (0 min)
E BAJA C BAJA	6,55 ± 0,99 (5) ^{A,a}
E BAJA C MEDIA	6,14 ± 1,12 (3) ^{A,a}
E BAJA C ALTA	6,89 ± 1,21 (3) ^{A,a}
E MEDIA C BAJA	3,44 ± 0,77 (5) ^{B,a}
E MEDIA C MEDIA	3,26 ± 0,27 (5) ^{B,a}
E MEDIA C ALTA	3,35 ± 0,59 (5) ^{B,a}
E ALTA C BAJA	2,96 ± 0,30 (5) ^{B,a}
E ALTA C MEDIA	2,58 ± 0,19 (5) ^{B,a}
E ALTA C ALTA	3,57 ± 0,47 (4) ^{B,a}

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de animales de cada grupo aparece entre paréntesis. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

PLASMA

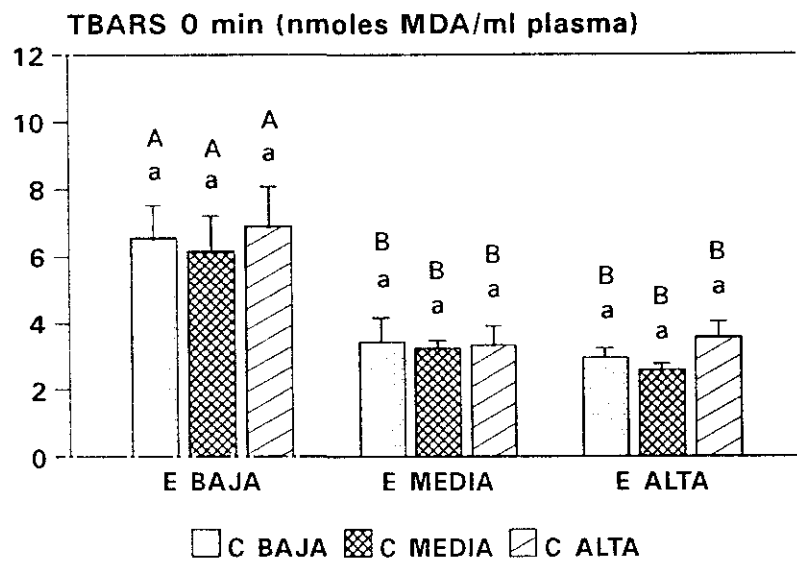


Figura 43. Peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* en el plasma de ratas ODS suplementadas con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta durante 21 días. Las medias que no comparten una letra mayúscula (efecto de la vitamina E) o minúscula (efecto de la vitamina C) común son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

VI. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL EN LA DIETA SOBRE LOS PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA ORINA HUMANA.

Los productos de peroxidación lipídica en la orina de varones jóvenes controles o suplementados con 1 g de vitamina C ó 100 mg de vitamina E diarios, durante 0, 15 y 30 días, determinados mediante la medida espectrofotométrica de TBARS *in vivo* a 532 nm, se muestran en la tabla 45.

Tanto en el caso del GRUPO C como en el del GRUPO E los valores de TBA, referidos a la concentración de creatinina en orina, mostraron una tendencia continua a disminuir en función del tiempo de experimentación. Esta tendencia no se presentó en el grupo CONTROL (figura 44).

Las sustancias reactivas al TBA también fueron estudiadas por fluorimetría. La figura 45 muestra un espectro de emisión de fluorescencia desde 500 hasta 600 nm de muestras de orina representativas de los valores medios obtenidos (tabla 46) y de MDA puro tras reaccionar con el TBA, después de la excitación a 503 nm.

Las longitudes de onda óptimas se obtuvieron como resultado de estudios previos en muestras de orina utilizando la función de prebarrido del software del fluorímetro LS50B (Perkin Elmer).

El pico de la izquierda corresponde a la señal del pico de excitación. Se observa un pico de emisión a 548 nm con una forma similar en el estándar de MDA y en la orina de un individuo del GRUPO E que presentó valores altos de TBARS antes de iniciar la suplementación con vitaminas (orina día 0).

La figura también muestra el espectro del mismo individuo obtenido tras 30 días de suplementación con 100 mg de vitamina E tras la comida del mediodía (orina día 30). El pico de fluorescencia MDA-TBA, típico del estándar y del individuo al inicio del estudio, desapareció casi completamente tras 30 días de suplementación con vitamina E.

Tabla 45. Productos de peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* en la orina de varones jóvenes suplementados diariamente con 1 g de vitamina C, 100 mg de vitamina E o controles durante 0, 15 y 30 días, determinados mediante espectrofotometría.

TBARS (nmoles MDA/mg creatinina)			
	CONTROL	GRUPO C	GRUPO E
DIA 0	3,54 ± 0,17 (7)	4,03 ± 0,26 (7)	3,92 ± 0,47 (6)
DIA 15	4,30 ± 0,51 (7)	3,49 ± 0,28 (7)	3,51 ± 0,62 (6)
DIA 30	4,16 ± 0,71 (6)	3,25 ± 0,25 (6)	3,29 ± 0,46 (5)

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar. El número de datos de cada grupo aparece entre paréntesis.

ORINA HUMANA
Espectrofotometría

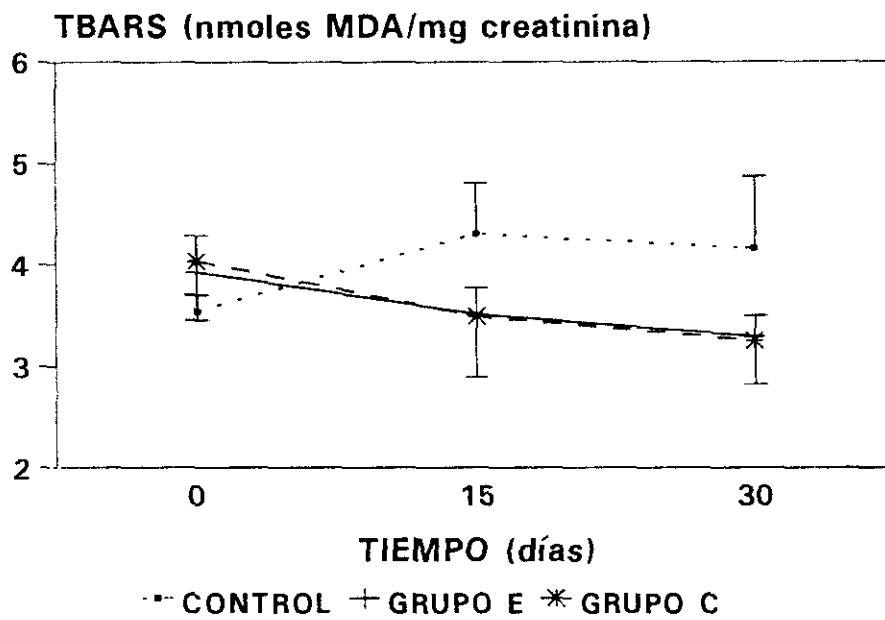


Figura 44. Productos de peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* en la orina de varones jóvenes suplementados diariamente con 100 mg de vitamina E, 1 g de vitamina C o controles durante 0, 15 y 30 días, determinados mediante espectrofotometría.

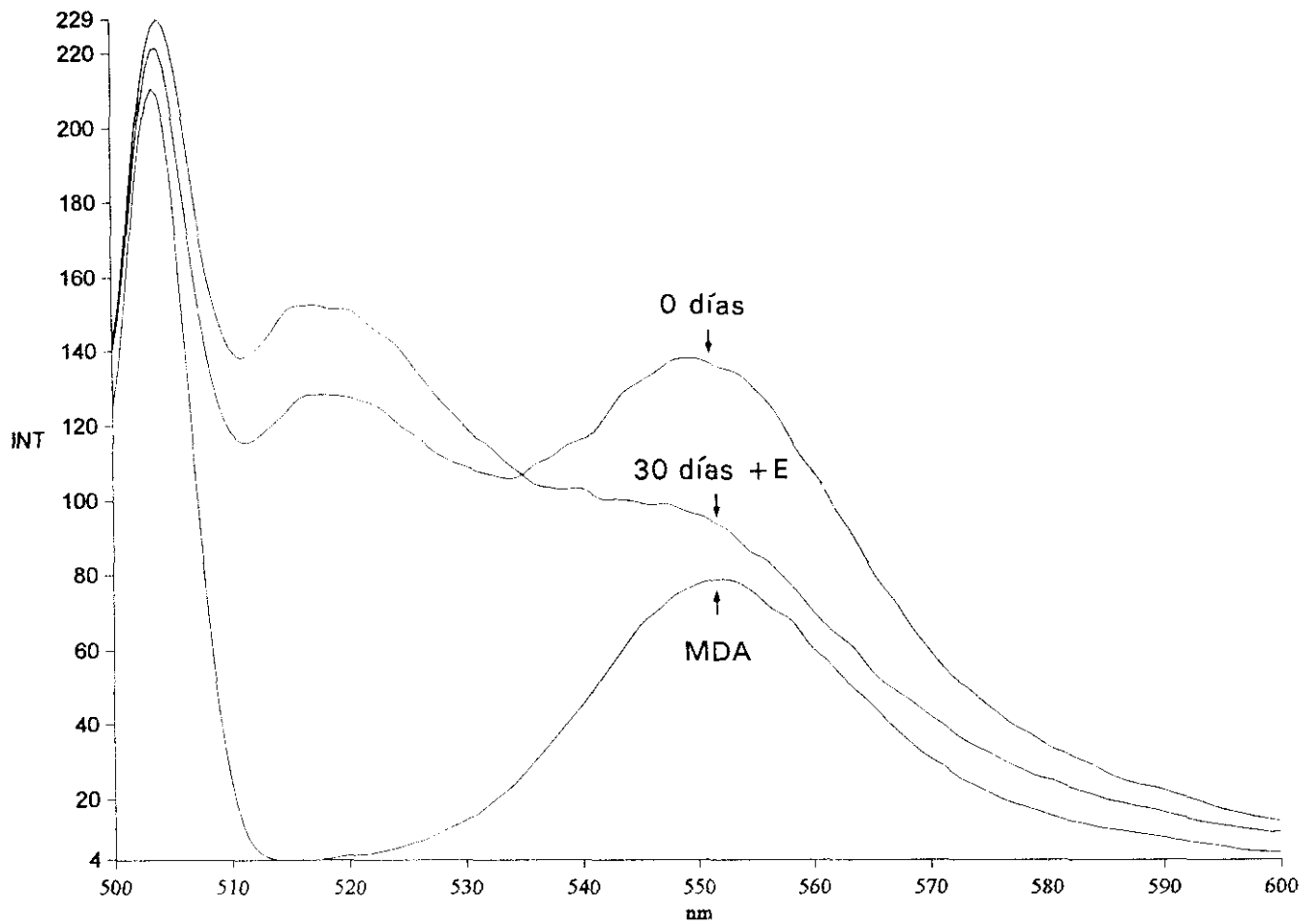


Figura 45. Espectro de emisión de fluorescencia de estándar de MDA y de orina de un individuo representativo de los valores medios obtenidos (tabla 46), antes (0 días) y después de 30 días de suplementación diaria con 100 mg de dl- α -tocoferol (30 días +E) tras la reacción del MDA y la orina con TBA. Excitación: 503 nm; emisión: 548 nm.

Los resultados obtenidos tras la medida fluorimétrica de las muestras de orina utilizando las longitudes de onda óptimas de excitación (503 nm) y emisión (548 nm) se muestran en la tabla 46. En el GRUPO C y el GRUPO E se observa de nuevo una tendencia a la disminución progresiva de los productos de peroxidación lipídica en función del tiempo de suplementación, a diferencia del grupo CONTROL en el que esto no ocurre (figura 46).

Mediante este método, los productos de peroxidación lipídica de la orina mostraron una disminución progresiva estadísticamente significativa respecto al grupo CONTROL a los 30 días de suplementación con vitamina E. Este descenso alcanza un 27% del valor obtenido al inicio del estudio. Las tendencias observadas en el GRUPO C no alcanzaron la significación estadística, ni se encontraron diferencias en el grupo CONTROL en función del tiempo de suplementación.

Tabla 46. Productos de peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* en la orina de varones jóvenes suplementados diariamente con 1 g de vitamina C, 100 mg de vitamina E o controles durante 0, 15 y 30 días, determinados mediante fluorimetría (excitación: 503 nm; emisión: 548 nm).

TBARS (nmoles MDA/mg creatinina)			
	CONTROL	GRUPO C	GRUPO E
DIA 0	3,86 ± 0,46 (7)	4,13 ± 0,51 (7)	3,70 ± 0,38 (6)
DIA 15	4,82 ± 0,56 (7)	3,71 ± 0,30 (7)	3,47 ± 0,64 (6)
DIA 30	4,39 ± 0,70 (6)	3,63 ± 0,31 (6)	2,73 ± 0,49 (5)*

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar. El número de datos de cada grupo aparece entre paréntesis. El superíndice representa diferencias significativas con el grupo CONTROL; *p < 0,05.

ORINA HUMANA
Fluorimetría

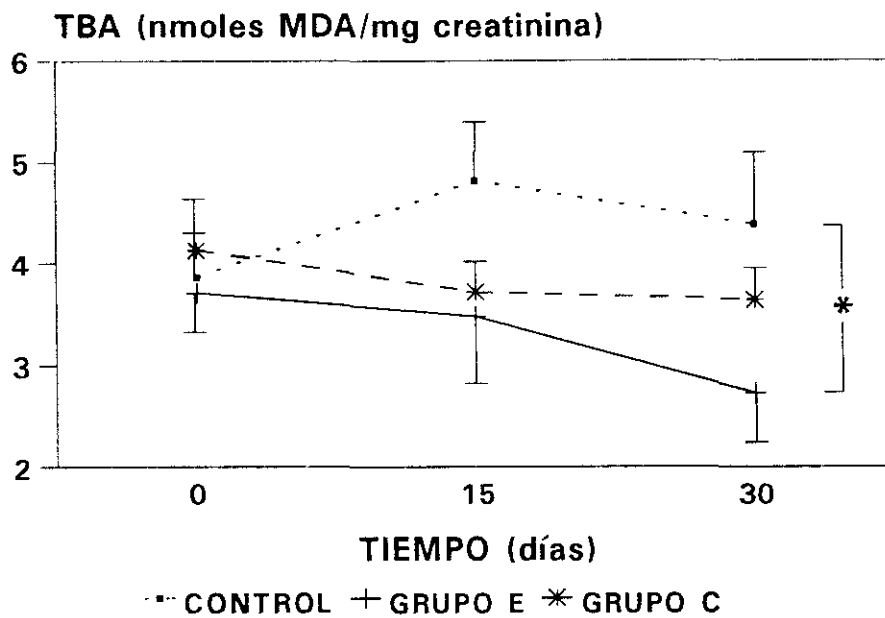


Figura 46. Productos de peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vivo* en la orina de varones jóvenes suplementados diariamente con 100 mg de vitamina E, 1 g de vitamina C o controles durante 0, 15 y 30 días, determinados mediante fluorimetría (excitación: 503 nm; emisión: 548 nm). Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

En el primer experimento de esta tesis estudiamos el efecto de la suplementación con ácido ascórbico en la dieta en el hígado y el corazón de cobaya.

El cobaya es el animal de laboratorio ideal para realizar estudios de este tipo ya que carece de la enzima L-gulonolactona oxidasa (E.C. 1.1.3.2.4.8), que cataliza el último paso de la síntesis del ácido ascórbico. Por lo tanto, en el cobaya el contenido de vitamina C en los tejidos es estrictamente dependiente de la dieta.

Los tres niveles de vitamina C utilizados en este experimento fueron seleccionados con el fin de obtener diferentes clases de animales suplementados con esta vitamina. Los cobayas deben recibir 0,5 mg de vitamina C diarios para evitar el desarrollo de escorbuto (National Research Council, 1978). Los animales que recibían 33 mg vitamina C/kg dieta (C BAJA) ingerían 0,54-1,1 mg de ascorbato diarios, por lo que pueden ser considerados animales no escorbúticos, sometidos a una deficiencia marginal en la ingesta de vitamina C.

La cantidad de 660 mg vitamina C/kg dieta (C MEDIA) puede considerarse óptima para el estado de salud general de los animales, ya que es similar a la utilizada en las dietas estándar comerciales para cobayas, las cuales son óptimas para el crecimiento, la reproducción, y el mantenimiento a largo plazo de esta especie.

El grupo que recibió 13.200 mg vitamina C/kg dieta (C ALTA) se seleccionó con el objeto de estudiar el efecto de la suplementación en la dieta con cantidades de vitamina C mucho más altas (20 veces) que las de la dieta estándar, sobre la oxidación de macromoléculas y la composición en ácidos grasos en hígado y corazón de cobaya.

La suplementación con vitamina C resultó muy efectiva ya que los niveles hepáticos de esta vitamina fueron casi 50 veces mayores en el grupo C MEDIA que en el C BAJA. El grupo C MEDIA presentó un mayor incremento de peso corporal e ingesta de alimento que el grupo C BAJA. Anteriormente se ha descrito un incremento menor de peso corporal en cobayas alimentados con una dieta deficiente en vitamina C en relación con los que recibían 600 mg vitamina C/kg dieta (Saito y Yamaguchi, 1988).

Estudios previos han demostrado que la vitamina C disminuye los niveles de productos de peroxidación lipídica (TBARS) *in vitro* en LDL y plasma humanos (Frei, 1991) y que el ascorbato 1,2 mM disminuye TBARS *in vitro* en hígado de rata (Antonenkov y Sies, 1992). El ascorbato puede actuar como antioxidante o prooxidante sobre la oxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1989b) y proteínas (Stadtman, 1991) *in vitro*, dependiendo de varias condiciones que incluyen la concentración de ascorbato y de iones hierro o cobre (Kadiiska *et al.*, 1992).

En cerebro de rata, concentraciones bajas de ascorbato (micromolar) estimulan la peroxidación lipídica (TBARS) *in vitro*, mientras que concentraciones más altas (milimolar) la inhiben (Halliwell y Gutteridge, 1989b). En hepatocitos de rata aislados se ha descrito un incremento de TBARS *in vitro* por incubación con ascorbato desde 0 hasta 250 μM (Chen, 1988).

Se ha sugerido que concentraciones bajas de ascorbato incrementarían la peroxidación mediante la reducción del hierro, mientras que concentraciones elevadas de ascorbato podrían reducir los radicales peroxilo directamente a hidroperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1989b).

En este experimento, los niveles hepáticos de TBARS *in vitro* (ascorbato- Fe^{2+}) resultaron significativamente menores en los grupos C MEDIA y C ALTA que en el grupo C BAJA. Debemos tener en cuenta que en los trabajos citados anteriormente, el efecto protector se obtuvo mediante la adición directa del ascorbato al sistema de peroxidación *in vitro*. En nuestro caso, la suplementación con ascorbato se realizó en la dieta, por lo que nuestros resultados muestran que un aumento en los niveles de ascorbato *in vivo*, en el hígado de cobaya disminuye la susceptibilidad del tejido a la peroxidación lipídica *in vitro*.

La peroxidación de lípidos a una tasa fija de generación de radicales libres depende de dos factores principales: la concentración de antioxidantes y la cantidad de sustratos oxidables presentes inicialmente en la muestra. La proporción de ácidos grasos insaturados disminuyó en el grupo C BAJA en relación con el grupo C MEDIA en todos los lípidos de membrana analizados. Así, el fuerte aumento de la peroxidación lipídica *in vitro* observada en el grupo C BAJA no puede ser debido a un aumento de sustratos oxidables sino que probablemente se debe a los bajos niveles del antioxidante vitamina C.

Por otra parte, el descenso en los niveles de insaturación de los ácidos grasos ocurrió en las cuatro fracciones de origen de membrana, pero no en la de triglicéridos. Esto sugiere que los ácidos grasos en la membrana de los hepatocitos son más susceptibles al daño oxidativo *in vivo* que los depósitos de lípidos intracelulares.

El descenso (72-66%) en los niveles de MDA libre (medido por HPLC) en los grupos C MEDIA y C ALTA en relación con el grupo C BAJA, muestra que el ascorbato también reduce la peroxidación lipídica *in vivo* en el hígado de cobayas no sometidos a condiciones de estrés. Este resultado coincide con un trabajo en el que se observó un incremento del 30% en los niveles de TBARS *in vivo*, en el hígado de cobayas que recibieron una dieta deficiente en vitamina C durante 3 semanas (Mori *et al.*, 1992).

El fuerte efecto de la vitamina C sobre los niveles endógenos de MDA libre encontrado en este trabajo se debe probablemente a la medida directa del MDA por HPLC, mientras que el método del TBA sufre de un alto nivel de interferencias con otras sustancias cuando se realizan medidas *in vivo* (peroxidación lipídica endógena). También se ha descrito en ratas que no sintetizan ascorbato (ratas ODS) un aumento en TBARS en hígado, plasma y LDL en relación con ratas controles (Kimura *et al.*, 1992).

En el grupo C BAJA, de acuerdo con el incremento en los valores de MDA libre, los índices de insaturación de todas las fracciones de lípidos de membrana disminuyeron en relación con el grupo C MEDIA. Los cambios principales responsables del descenso de insaturación fueron el descenso en 18:1 y el incremento en 18:0 (excepto en la fracción de fosfatidilcolina) en el grupo C BAJA.

Los resultados obtenidos muestran que la suplementación con vitamina C en la dieta reduce notablemente (47-64% de reducción) el contenido en carbonilos proteicos en el hígado *in vivo*. Algunos autores han observado que el nivel de carbonilos proteicos aumenta con la edad (Sohal *et al.*, 1993) y que la restricción calórica, la única manipulación experimental capaz de incrementar la vida máxima, disminuye los carbonilos proteicos en hígado de ratón (Youngman *et al.*, 1992).

Se ha descrito la capacidad del glutatión de inhibir la formación de TBARS y de

carbonilos proteicos cuando es añadido a un sistema de peroxidación *in vitro* de microsomas de hígado de rata (Palamanda y Kehrer, 1992). Los resultados obtenidos en este experimento extienden la capacidad de inhibir la oxidación de lípidos y proteínas a la vitamina C *in vivo* en el hígado de cobayas en condiciones basales.

La vitamina C inhibe la formación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en timo de ternera *in vitro* (Fischer-Nielsen *et al.*, 1992) y en esperma humano *in vivo* (Fraga *et al.*, 1991). Otros autores, sin embargo, no han observado efectos inhibitorios de la vitamina C sobre la formación de 8-OHdG en ADN nuclear de hígado de rata (Takagi *et al.*, 1995). En nuestro experimento tampoco se observaron diferencias en los niveles de 8-OHdG a las dosis de vitamina C estudiadas.

El grupo suplementado con niveles altos de vitamina C (C ALTA) mostró la misma capacidad que el grupo C MEDIA de disminuir la oxidación de lípidos y proteínas en relación al grupo C BAJA. Sin embargo, los animales de este grupo presentaron un incremento menor de peso corporal que el grupo C MEDIA. Se ha descrito un menor crecimiento en crías de cobaya suplementadas con 5 g vitamina C/kg dieta (Bates *et al.*, 1988).

Los índices de insaturación de los ácidos grasos descendieron en el grupo C ALTA en relación con el grupo C MEDIA en tres de las fracciones lipídicas analizadas. La fracción de fosfatidilcolina no mostró cambios en la insaturación, y el descenso de insaturación en la fracción de lisofosfatidilcolina fue menor en el grupo C ALTA que en el C BAJA. Esto puede explicar, en parte, porqué los niveles de MDA no aumentaron en el grupo C ALTA.

Nuestros resultados muestran que el incremento en la ingestión de vitamina C en el cobaya desde 660 hasta 13.200 mg/kg dieta no aumenta la protección de los lípidos y las proteínas frente al daño oxidativo, aumenta mínimamente los niveles hepáticos de vitamina C, disminuye la ganancia de peso corporal y la insaturación de los ácidos grasos en las fracciones de fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina y esfingomiélin. Así, 13.200 mg/kg dieta puede considerarse una cantidad excesiva ya que es superflua o incluso perjudicial, según el parámetro analizado.

Algunos cambios son similares en animales suplementados con cantidades de vitamina C muy altas y muy bajas: descenso del peso corporal y en la insaturación de los ácidos grasos (incremento en 18:0 y descenso en 18:1 y, en algunas fracciones, 16:1).

La cantidad de 660 mg vitamina C/kg dieta es la dosis óptima, desde el punto de vista de los radicales libres, entre los tres niveles estudiados. Esta cantidad es similar a la dosis de vitamina C seleccionada por los criadores de cobayas siguiendo criterios como el crecimiento, la reproducción y el mantenimiento a largo plazo. Esto sugiere un paralelismo entre los niveles tisulares de daño oxidativo y antioxidantes por una parte, y el estado general de salud de los animales por otra parte.

La capacidad de la vitamina C de disminuir la oxidación de lípidos y proteínas *in vivo* apoya la hipótesis de que una adecuada protección antioxidante es esencial en el mantenimiento de la integridad de los lípidos y proteínas hepáticos en condiciones basales. La cantidad de 20 mg/animal.día es 40 veces mayor que el requerimiento diario para evitar el escorbuto (0,5 mg/animal.día).

Los efectos positivos de la vitamina C observados en este trabajo se obtuvieron en animales intactos, en ausencia de un estrés oxidativo adicional interno o externo. Esto sugiere que existe un intervalo amplio y seguro de suplementación con vitamina C entre la deficiencia y la protección óptima frente al daño oxidativo en los animales en condiciones basales. Es posible que esto se relacione con los resultados de numerosos estudios, la mayoría de los cuales indican que la vitamina C en la dieta protege frente al desarrollo de diversas enfermedades degenerativas, como las enfermedades cardiovasculares (Gaziano *et al.*, 1992; Gey, 1990; Simon, 1992) y el cáncer (Ames, 1989a; Block, 1991; Byers y Perry, 1992).

Las dosis y el tiempo de suplementación elegidos también fueron efectivos en el caso del corazón, ya que los niveles cardíacos de vitamina C aumentaron gradualmente desde el grupo C BAJA hasta el C ALTA. Por tanto, la concentración cardíaca de vitamina C en el cobaya depende del contenido de esta vitamina en la dieta.

Los niveles de vitamina E tendieron a aumentar a medida que la concentración de

vitamina C incrementaba. Esto apoya la propuesta de un sinergismo *in vivo* entre las vitaminas C y E, que ya ha sido demostrado *in vitro* (Packer *et al.*, 1979).

La vitamina E es el principal antioxidante liposoluble en las membranas celulares, donde puede actuar reduciendo radicales peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) y alcoxilo ($\text{LO}\cdot$) de los ácidos grasos a sus correspondientes productos, los hidroperóxidos (LOOH) y los hidróxidos (LOH) lipídicos. Durante este proceso, la vitamina E es oxidada produciendo el radical tocoferilo, el cual no puede continuar su función antioxidante. Los niveles de vitamina E en las membranas biológicas son tres órdenes de magnitud menores que los de ácidos grasos, por lo que la función antioxidante de la vitamina E necesita la reducción continua del radical tocoferilo a vitamina E, lo que puede realizarse por dos antioxidantes, la vitamina C y el glutatión.

La tendencia observada a aumentar los niveles de vitamina E al aumentar los de vitamina C puede ser debida a este sinergismo entre ambas vitaminas actuando *in vivo*. Los niveles relativamente bajos de estrés oxidativo de los animales en estado basal, puede evitar el consumo total de vitamina E en los animales deficientes en vitamina C, lo que explicaría la falta de significación en las diferencias en vitamina E entre los tres grupos.

Los valores mayores de peroxidación lipídica obtenidos mediante el test del TBA que a través de la determinación directa de MDA libre por HPLC indican que, de acuerdo con datos de hígado, pulmón y cerebro de siete especies de vertebrados (López-Torres *et al.*, 1993a), el test del TBA detecta otras sustancias además del MDA en el tejido cardíaco.

El hecho de que la comparación de TBARS entre los tres grupos y de MDA libre entre los grupos C MEDIA y C ALTA no mostrara diferencias significativas indica que la suplementación con vitamina C no modifica la peroxidación lipídica en el corazón de cobayas en condiciones aerobias basales.

Los niveles menores de MDA libre observados en el grupo C BAJA no implican la presencia de una menor peroxidación lipídica en este grupo, ya que este resultado no fue confirmado por la medida de TBARS. La peroxidación lipídica es un proceso complejo que da lugar a la formación de otras sustancias, detectadas mediante el test del TBA, además de

MDA libre. Estos productos de peroxidación lipídica adicionales son mucho más abundantes que el MDA libre en varios modelos de peroxidación (Halliwell y Gutteridge, 1989b). Además, el MDA libre es metabolizado en la mitocondria de una manera todavía poco conocida. Es posible que la deficiencia en vitamina C modificara el metabolismo del MDA sin afectar a la peroxidación lipídica.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la peroxidación lipídica, la razón GSH/GSSG, un estimador del estrés oxidativo celular, no se modificó significativamente en los tres grupos de cobayas.

La ausencia de cambios en la peroxidación lipídica no descarta la posibilidad de que la suplementación con vitamina C sea protectora frente a cualquier estrés oxidativo adicional en diversas situaciones fisiológicas o patológicas. Nuestro experimento ha sido realizado en animales intactos bajo condiciones aerobias basales. En este estado basal, es posible que los demás componentes del sistema antioxidante que no son la vitamina C, sean suficientes para eliminar las pequeñas cantidades de radicales libres que se generan en el tejido cardíaco.

La suplementación en la dieta con vitamina C aumenta la capacidad antioxidante del corazón de cobaya, ya que da lugar a niveles mayores de vitamina C en este tejido, que pueden ser esenciales en presencia de un estrés oxidativo adicional.

Los efectos de la suplementación con vitamina C en la dieta fueron estudiados bajo condiciones aerobias basales y también en animales sometidos a un estrés oxidativo adicional. Para ello utilizamos un inhibidor de la actividad catalasa, el 3-amino-1,2,4-triazol (AT). En el cobaya esta enzima está localizada no sólo en los peroxisomas, sino también en el citoplasma y en la matriz nuclear (Geerts y Roels, 1982; Yamamoto *et al.*, 1988).

El tratamiento con AT fue muy efectivo, ya que provocó una desaparición casi total (90%) de la catalasa hepática en los dos grupos C BAJA +AT y C ALTA +AT. Dosis similares de AT *in vivo* a las utilizadas en este experimento han sido descritas previamente en el cobaya (Geerts y Roels, 1982) y en otras especies (Allen *et al.*, 1983; Aragón *et al.*, 1991; Barja de Quiroga *et al.*, 1989; Jones y Neill, 1982; Yusa *et al.*, 1987) y también en hepatocitos de rata cultivados en presencia de AT (Starke y Farber, 1985).

En el cobaya, del 56% al 87% de la catalasa hepática está localizada en el citoplasma (Yamamoto *et al.*, 1988). En condiciones fisiológicas, esta catalasa citoplasmática está provista con sustrato (Geerts y Roels, 1982), por lo que la inhibición de la catalasa mediante el tratamiento con AT conduce a un incremento en los niveles de H₂O₂ celulares y por tanto a un estrés oxidativo adicional. De hecho, se ha observado un aumento en la concentración tisular de H₂O₂ en moscas suplementadas con 2mM AT en el agua de bebida (Allen *et al.*, 1983).

El aumento de vitamina C en la dieta dió lugar a un descenso en los niveles de MDA libre, medido directamente por HPLC, en el hígado de cobaya. Estos resultados muestran que el ascorbato es capaz de disminuir la peroxidación lipídica *in vivo* no sólo en condiciones normales sino también en animales en los que la catalasa ha sido inhibida.

El grupo C ALTA +AT presentó niveles más altos de la razón GSH/GSSG y además tanto en este grupo como en el grupo C BAJA +AT, no aumentaron los niveles de TBARS, a diferencia de lo que ocurrió en el grupo C BAJA. Esto sugiere que, de alguna manera, el AT protege frente al daño oxidativo.

En estudios previos se ha demostrado que los antioxidantes endógenos están sujetos a un control homeostático. La exposición a un estrés oxidativo *in vivo* puede producir inducciones compensatorias de los antioxidantes endógenos (López-Torres *et al.*, 1993b; Sohal *et al.*, 1984). Sin embargo, el tratamiento con AT a corto plazo, no produce la inducción de otros antioxidantes (Pérez-Campo *et al.*, 1990). En nuestro experimento, lo que posiblemente protege son otras enzimas o proteínas inducidas por H₂O₂, ya que es sabido que el H₂O₂ induce la expresión génica de un gran número de proteínas con carácter defensivo (Rushmore *et al.*, 1991; Storz *et al.*, 1990).

Los resultados obtenidos muestran un paralelismo en el efecto de la suplementación con vitamina C sobre la oxidación de lípidos y proteínas *in vivo*. La vitamina C dió lugar a una disminución (25-60%) en los niveles de carbonilos proteicos en el hígado de cobayas en condiciones basales y en animales sometidos a un estrés oxidativo adicional.

En resumen, la capacidad de la vitamina C de disminuir la oxidación de lípidos y

proteínas tisulares *in vivo* indica que una protección antioxidante adecuada es esencial para mantener la integridad de los lípidos y proteínas en el hígado de cobaya. Esta capacidad puede ser de gran importancia en la prevención de enfermedades degenerativas como las enfermedades cardiovasculares (Gaziano *et al.*, 1992; Gey, 1990) y el cáncer (Ames, 1989a; Block, 1991; Byers y Perry, 1992).

En el segundo experimento de esta tesis estudiamos el efecto de la suplementación con vitamina E en la dieta sobre el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, y la composición en ácidos grasos en hígado y corazón de cobaya, utilizando la concentración de vitamina C óptima encontrada en el experimento anterior (660 mg vitamina C/kg dieta).

Como consecuencia del carácter liposoluble de la vitamina E y de su metabolismo, los cambios en la concentración tisular del α -tocoferol tras la suplementación en la dieta son relativamente lentos en comparación con otros antioxidantes hidrosolubles como el ácido ascórbico. Por lo tanto, es importante el desarrollo de diseños experimentales apropiados respecto al tiempo y dosis de suplementación con vitamina E, que permitan obtener animales con diferentes concentraciones tisulares de vitamina E.

Los cobayas utilizados en este estudio, mostraron diferentes concentraciones hepáticas de vitamina E tras la suplementación con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Los cobayas del grupo E BAJA (15 mg vitamina E/Kg dieta) ingerían 0,6-0,75 mg de vitamina E diarios. Esta cantidad es similar al requerimiento mínimo de vitamina E para cobayas en crecimiento, 1 mg diario (Shimotori *et al.*, 1939; National Research Council, 1978). Los animales de este grupo mostraron un crecimiento, ingesta de alimento y comportamiento normales. Aunque sus niveles hepáticos de vitamina E eran bajos, alcanzaban 12 μ g vitamina E/g tejido. En los cobayas, se requiere una dieta totalmente deficiente en vitamina E, administrada durante 8 semanas, para observar pérdida de peso corporal, degeneración del músculo esquelético y atrofia de los testículos (National Research Council, 1978). Por consiguiente, los animales del grupo C BAJA no son deficientes en vitamina E, sino que presentan niveles bajos de esta vitamina.

El grupo E MEDIA (150 mg vitamina E/kg dieta) ingirieron cantidades de vitamina E 6 veces mayores que el requerimiento mínimo diario. Esta cantidad es similar a la utilizada

para el mantenimiento normal de cobayas. El grupo E ALTA (1.500 mg vitamina E/kg dieta) fue diseñado para clarificar si niveles de vitamina E 64 veces mayores que el requerimiento mínimo diario tendrían efectos beneficiosos o perjudiciales sobre la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, y la insaturación de ácidos grasos.

Los tres niveles de vitamina E utilizados no afectaron al peso corporal ni a la ingesta de alimento de los animales, y fueron muy efectivos al producir diferentes concentraciones hepáticas de α -tocoferol. Entre los grupos E BAJA y E MEDIA, y E MEDIA y E ALTA encontramos una diferencia de 2,5 a 3 veces en el contenido hepático de vitamina E. Así, la vitamina E hepática en cobayas responde a los niveles de vitamina E en la dieta de manera similar a lo observado previamente en ratas (Vatassery *et al.*, 1988; Ueda e Igarashi, 1990).

A pesar de la presencia de concentraciones hepáticas de α -tocoferol ampliamente diferentes, no se observaron variaciones en la razón GSG/GSSG, el MDA libre ni en el contenido en carbonilos proteicos. El glutatión reducido y oxidado, y el MDA libre se encuentran en el compartimento hidrofílico y lo mismo sucede en la mayoría de las proteínas tisulares. Estos resultados son compatibles con la función de la vitamina E como un antioxidante importante en las membranas pero no en el compartimento celular hidrofílico.

El MDA es un producto de peroxidación lipídica que se metaboliza en las células, principalmente en las mitocondrias. En condiciones basales no se acumula en el compartimento acuoso, lo que sí puede ocurrir en animales sometidos a un fuerte estrés oxidativo que genere una pérdida de homeostasis. Además, la ausencia de diferencias en la peroxidación lipídica a tiempo 0 min, determinada mediante el test del TBA, apoya la falta de diferencias en los niveles de MDA libre.

Los niveles de 8-OHdG no se modificaron por la suplementación con vitamina E en la dieta. Otros autores han observado en hígado de rata una inhibición en la formación de 8-OHdG por efecto de la vitamina E (Takagi *et al.*, 1995). Las diferencias con nuestros resultados pueden ser debidas a que en este experimento las ratas habían sido tratadas previamente con el hepatocarcinógeno 2-nitropropano, mientras que nosotros utilizamos animales intactos.

A diferencia de la ausencia de efecto en el compartimento hidrofílico, el incremento en los niveles hepáticos de α -tocoferol del grupo E BAJA al E MEDIA inhibió fuertemente la peroxidación lipídica no enzimática (ascorbato- Fe^{2+}). Esto refleja el importante papel antioxidante de la vitamina E en las membranas biológicas. El aumento de α -tocoferol en el grupo E ALTA no dió lugar a una protección adicional.

Algunos trabajos previos han obtenido resultados similares para roedores de laboratorio. Una dieta con 180 mg vitamina E/kg dieta disminuyó la peroxidación lipídica respecto a una dieta con 86 mg/kg en hígado de rata tras un mes de suplementación, mientras que 1.400 mg/kg no aumentó el nivel de protección (Günther *et al.*, 1992). La suplementación con vitamina E en la dieta también disminuyó la susceptibilidad a la peroxidación lipídica en hígado de rata (Thompson y Lee, 1993; Williams *et al.*, 1992), y la peroxidación de microsomas de hígado de rata inducida por ascorbato y Fe^{2+} (Palamanda y Kehrer, 1993). En ratones tratados durante 7 semanas con 200 mg vitamina E/kg dieta, no se apreció un descenso en la peroxidación hepática frente a ratones deficientes en esta vitamina, aunque en este trabajo no se determinaron los niveles tisulares de vitamina E (Sutphin y Buckman, 1991).

En el experimento anterior observamos que la suplementación con vitamina C también reduce los niveles de peroxidación lipídica no enzimática en el hígado de cobayas mantenidos en las mismas condiciones experimentales (figura D.1a). El nivel óptimo de vitamina C en la dieta (660 mg/kg) encontrado en ese estudio, es el utilizado en el presente experimento en todos los grupos de vitamina E. En ambos experimentos observamos niveles similares de peroxidación lipídica en el grupo C MEDIA E BAJA (figura D.1: segunda barra en D.1a y primera barra en D.1b).

A pesar de que en el grupo E BAJA utilizamos niveles óptimos de vitamina C, este grupo mostró valores de peroxidación lipídica mayores que los grupos E MEDIA y E ALTA (figura D.1b). Así, la protección óptima frente a la peroxidación lipídica hepática en el cobaya requiere la suplementación simultánea con vitaminas C y E a niveles medios. Este resultado apoya la supuesta colaboración entre ambas vitaminas *in vivo*, en la que la vitamina C reduce al radical tocoferilo a vitamina E (Buettner, 1993; Niki, 1991).

HIGADO

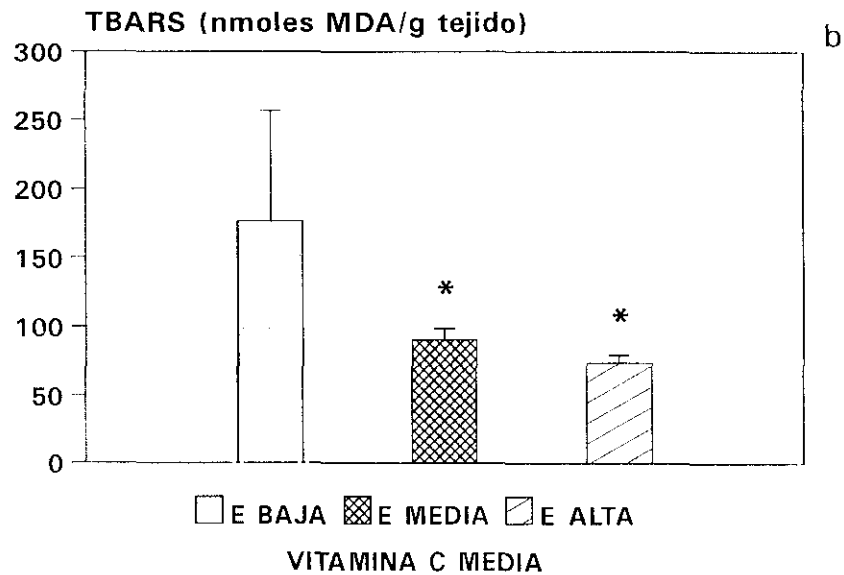
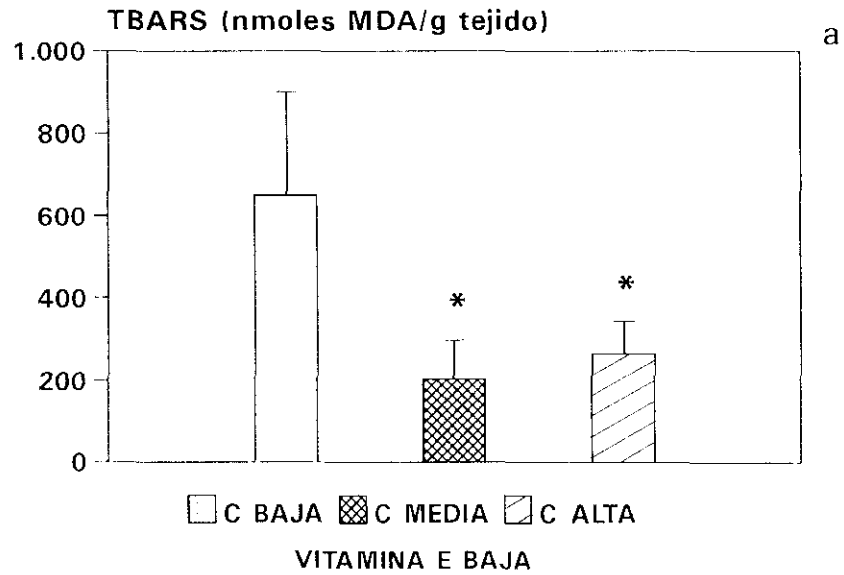


Figura D.1. Comparación entre los niveles de productos de peroxidación lipídica (sustancias TBA positivas) *in vitro* en el hígado de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina C (a) o vitamina E (b) en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas respecto a los grupos C BAJA o E BAJA; * $p < 0,05$.

Los ácidos grasos insaturados son las moléculas más sensibles al daño causado por los radicales libres en las células. Esta sensibilidad aumenta en función del número de dobles enlaces de cada ácido graso concreto (North *et al.*, 1994). Se han realizado algunos trabajos sobre el efecto de la suplementación en la dieta con vitamina E sobre la composición en ácidos grasos de los tejidos, aunque ninguno de ellos se ha llevado a cabo en cobayas.

Se ha descrito un descenso en la insaturación de ácidos grasos en microsomas hepáticos de crías de rata mantenidas con una dieta deficiente en vitamina E durante 9 meses (Clement y Bourre, 1993). En este trabajo el contenido hepático de vitamina E descendió mucho más que en nuestro trabajo ($0,8 \mu\text{g/g}$ tejido) y en el grupo deficiente en vitamina E se observaron descensos en los ácidos grasos insaturados 16:1, 18:1, 18:2, 20:3 e incrementos en 18:0 y en los ácidos grasos saturados totales. Este estudio no incluyó un grupo suplementado con dosis excesivamente altas de vitamina E.

Otros autores también han encontrado descensos en la insaturación en microsomas y mitocondrias de hígado de ratas deficientes en vitamina E (Buttriss y Diplock, 1988). Por otra parte, se ha descrito un descenso en el índice de insaturación, 20:4 y 22:6 y un incremento en 18:2 en el hígado de ratas hipertensas SHR suplementadas con 2.000 mg vitamina E/kg dieta durante 6 semanas (Koba *et al.*, 1992). En este trabajo no se incluyó un grupo con niveles bajos de vitamina E, sólo se estudió la fracción de fosfatidilcolina, y no se valoraron los ácidos grasos saturados.

Algunos autores no encontraron cambios en la insaturación de los ácidos grasos en varios tejidos de rata tras la administración de dietas con niveles bajos de vitamina E (Lee y Barnes, 1969). Ciertos problemas en el diseño experimental pueden explicar estos datos negativos. Por ejemplo, no se detectaron cambios en los ácidos grasos poliinsaturados hepáticos de ratones Swiss alimentados con dietas que contenían 0, 50 ó 150 mg vitamina E/kg dieta, pero tampoco se encontraron cambios en la concentración hepática de esta vitamina (Tangney *et al.*, 1988).

En nuestro estudio hemos observado que niveles bajos y altos de vitamina E en la dieta, y por consiguiente en el hígado, disminuyen significativamente la insaturación de los ácidos grasos, y que la insaturación máxima tiene lugar a niveles intermedios de vitamina E.

El efecto de la dosis baja de vitamina E ocurre incluso en animales que no son deficientes en esta vitamina. Los efectos observados son cuantitativamente mayores en el grupo E ALTA que en el E BAJA, debido probablemente a que el grupo E BAJA fue diseñado con el fin de evitar la deficiencia en esta vitamina.

Los cambios significativos ocurren en la misma dirección en todas las fracciones lipídicas, excepto en la de triglicéridos, lo que indica que el papel protector antioxidante de la vitamina E a niveles medios tiene lugar principalmente en los lípidos de origen de membrana. Los triglicéridos se depositan en las células hepáticas rodeados de otras moléculas como fosfolípidos y colesterol. Esto puede protegerlos frente al estrés oxidativo, lo que explicaría la ausencia de modificaciones encontrada en relación con las de los fosfolípidos. Los cambios encontrados en los fosfolípidos ocurren siempre en la misma dirección del grupo E MEDIA a los otros dos grupos: descensos en la insaturación de los ácidos grasos.

El descenso en la insaturación de los ácidos grasos a niveles bajos de vitamina E es lógico teniendo en cuenta el papel antioxidante de esta vitamina en las membranas lipídicas. Respecto a la pérdida de insaturación a niveles altos de vitamina E, se ha demostrado que el α -tocoferol puede tener un efecto prooxidante en sistemas químicos (Mukai *et al.*, 1993) y en LDL (Bowry *et al.*, 1992) *in vitro*. El efecto prooxidante se ha atribuido a la reacción del radical tocoferilo con los lípidos insaturados y los hidroperóxidos lipídicos, generando radicales alcoxilo y peroxilo (Mukai *et al.*, 1993). Esta acción prooxidante no tiene lugar si en el sistema *in vitro* están presentes concentraciones suficientemente altas de antioxidantes como la vitamina C, que reduce al radical tocoferilo regenerando la vitamina E (Bowry *et al.*, 1992).

Este efecto de la vitamina E podría explicar nuestros resultados, ya que la cantidad de vitamina E en el grupo E ALTA (1.500 mg/kg dieta) sobrepasaba a la de vitamina C (660 mg/kg dieta) en este trabajo. Tampoco puede ser descartado un efecto adicional de la vitamina E sobre la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, puesto que se ha demostrado que la actividad delta9- desaturasa desciende en microsomas hepáticos de ratas alimentadas con dietas deficientes o suplementadas con vitamina E (Okayasu *et al.*, 1977) y que concentraciones elevadas de vitamina E (20 veces superiores a los niveles del control) disminuye la delta6- desaturasa en hígado de rata (Despret *et al.*, 1992).

En cualquier caso, los resultados de este experimento muestran los efectos prooxidantes de la vitamina E a dosis muy bajas o muy altas, sobre los ácidos grasos de membrana en el hígado *in vivo*. El efecto prooxidante de dosis excesivamente altas de vitamina E se pueden relacionar con sus efectos deletéreos observados en ratas (Takahashi, 1995) y en otros mamíferos. Se han encontrado acumulaciones masivas de vitamina E en el bazo (15.000 $\mu\text{g/g}$) y en el hígado (853 $\mu\text{g/g}$) de ratas recién nacidas tratados diariamente con 50 mg de vitamina E/kg peso corporal durante 7 días (Hale *et al.*, 1995). Hay que señalar que las concentraciones de vitamina E encontradas en este experimento son un orden de magnitud mayores que las observadas en nuestro estudio en el hígado de los animales del grupo E ALTA.

En nuestro experimento de suplementación con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta, observamos un descenso en la insaturación de los ácidos grasos hepáticos a concentraciones de vitamina C muy bajas (33 mg/kg) o muy altas (13.200 mg/kg), utilizando el mismo modelo animal, y los niveles de insaturación más altos se observaron a concentraciones intermedias de vitamina C en la dieta (660 mg/kg). Esta concentración de vitamina C resultó suficiente para prevenir la peroxidación lipídica.

Para ambas vitaminas antioxidantes C y E existe un nivel intermedio de suplementación en la dieta, con el que se alcanza una protección óptima frente a la peroxidación lipídica y la pérdida de insaturación de los ácidos grasos en el hígado. Este nivel es 40 (vitamina C) ó 6 (vitamina E) veces mayor que el requerimiento mínimo diario para evitar los síndromes carenciales. Esto sugiere que los niveles óptimos de vitaminas C y E en la dieta son mayores que la administración diaria recomendada (RDA), mientras que las dosis excesivamente altas pueden presentar efectos perjudiciales a nivel molecular, incluso a dosis no letales y aparentemente no deletéreas. Estas dosis excesivamente altas de vitaminas antioxidante deben ser evitadas por su potencial efecto nocivo, especialmente en el caso de la vitamina E durante la suplementación a largo plazo.

La concentración de α -tocoferol encontrada en el corazón de los cobayas del grupo E BAJA (7,4 $\mu\text{g/g}$) indica que estos animales poseen niveles bajos de vitamina E en este tejido, pero no son deficientes en esta vitamina.

La concentración molar de α -tocoferol presente normalmente en las membranas biológicas es tres órdenes de magnitud menor que la de las principales moléculas que protege, los ácidos grasos poliinsaturados. El papel antioxidante de la vitamina E, especialmente cuando está presente a concentraciones bajas, depende del rápido reciclado del radical α -tocoferilo (formado cuando la vitamina E reduce a los radicales peroxilo de los fosfolípidos). Esto ocurre mediante la reducción del radical tocoferilo por la vitamina C (Buettner, 1993; McCay, 1985; Niki, 1991; Packer *et al.*, 1979) o por el glutatión. En este último caso, el GSH se oxida a GSSG. La importancia relativa de estos dos reductores del radical tocoferilo, vitamina C y glutatión, en las células se desconoce, aunque ambos pueden trabajar sinérgicamente. Recientemente se han detectado (Wells y Xu, 1994) o purificado (Maellaro *et al.*, 1994) enzimas dependientes de GSH responsables de la reducción del radical dehidroascorbato a ascorbato.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la relevancia del sistema cardíaco del glutatión en relación con la vitamina E. Mientras que los niveles de ascorbato no se modificaron por efecto de la suplementación con vitamina E, la razón GSH/GSSG, un indicador del estrés oxidativo celular, aumentó en función de la dosis de vitamina E. El perfil de las curvas obtenidas para el α -tocoferol y la razón GSH/GSSG en relación con la dosis de vitamina E en la dieta resultaron muy similares (figura D.2), lo que sugiere una relación causa-efecto entre estos dos factores. Estos resultados indican que la vitamina E regenera el glutatión cardíaco, lo cual no había sido descrito previamente *in vivo* en corazón de cobayas ni de otros mamíferos.

Los resultados de este experimento muestran que el incremento en la concentración del α -tocoferol cardíaco protege contra la peroxidación lipídica no enzimática, a pesar de que las tres dietas utilizadas contenían la dosis óptima de vitamina C encontrada en el estudio anterior de suplementación con vitamina C. Estos resultados fueron confirmados mediante la medida de mayor sensibilidad y especificidad del espectro de fluorescencia de TBARS, que produce un pico similar al que se obtiene por la medida del producto de reacción de un estándar de MDA puro con TBA.

Se han descrito descensos en la peroxidación lipídica en el corazón de ratas deficientes en vitamina E respecto a las controles (Günther *et al.*, 1992; Günther *et al.*, 1994; Melin *et*

CORAZON

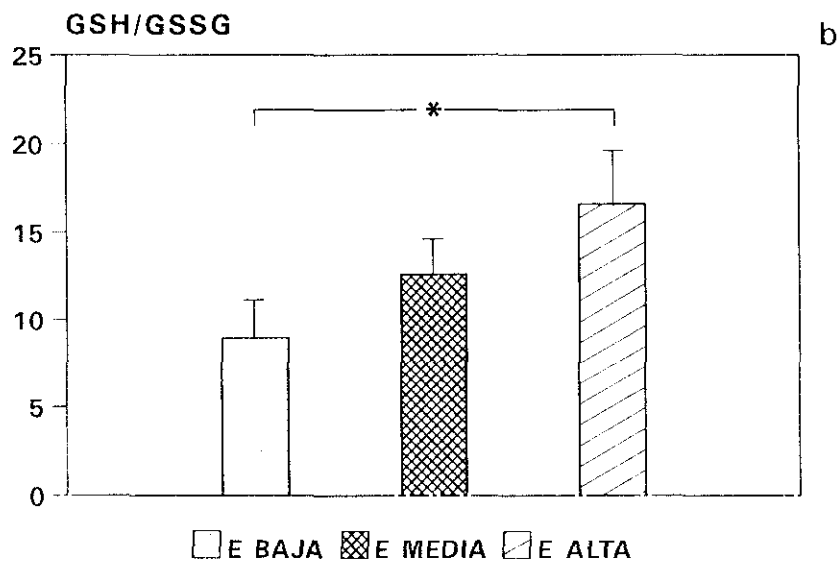
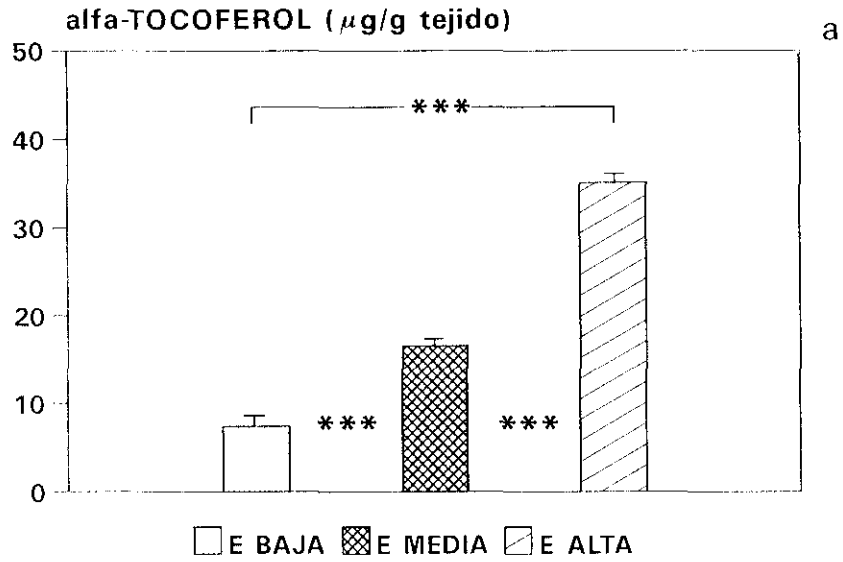


Figura D.2. Concentración de α -tocoferol (a) y razón GSH/GSSG (b) en el corazón de cobayas suplementados con tres cantidades diferentes de vitamina E en la dieta durante 5 semanas. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$.

al., 1995; Schimke *et al.*, 1987; Tiidus y Houston, 1993). Algunos autores no encontraron diferencias en la peroxidación lipídica cardíaca entre ratas que recibían 180 ó 1.400 mg vitamina E/kg dieta durante 24 días (Günther *et al.*, 1992). Nuestros resultados muestran que el incremento de vitamina E desde niveles bajos, aunque no deficientes (E BAJA), a niveles intermedios (E MEDIA) seis veces mayores que el requerimiento mínimo diario, también aumenta la protección frente a la peroxidación lipídica. Sin embargo, no se obtiene una protección adicional al aumentar los niveles de vitamina E desde E MEDIA hasta E ALTA.

Numerosos estudios realizados en poblaciones humanas sugieren la capacidad de la vitamina E para reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Estudios epidemiológicos realizados con 1.954 individuos de 16 poblaciones europeas mostraron que la concentración de α -tocoferol en el suero es el principal parámetro asociado con una baja mortalidad causada por cardiopatía isquémica. El α -tocoferol presentaba una mejor correlación inversa frente a la mortalidad por esta causa que factores de riesgo clásicos como el colesterol y la presión arterial (Gey, 1990). También se han observado descensos significativos en la mortalidad causada por enfermedades coronarias en estudios longitudinales en 87.245 enfermeras (Stampfer *et al.*, 1993), 39.910 profesionales de la salud (Rimm *et al.*, 1993) y en 5.133 finlandeses (Knekt *et al.*, 1994) tras la suplementación con vitamina E, con reducciones en el riesgo que alcanzaban el 32-65%. La capacidad antiaterogénica de la vitamina E también ha sido demostrada recientemente en primates (Verlangieri y Bush, 1992).

Los primeros mecanismos moleculares que subyacen en estos efectos protectores se relacionan, probablemente, con la capacidad de la vitamina E de disminuir la sensibilidad a la peroxidación lipídica cardíaca y de mantener al glutatión en su estado reducido. Se ha observado recientemente que la actividad ATPasa Na^+/K^+ miocárdica, una enzima fundamental en el mantenimiento de las propiedades bioeléctricas de los miocitos, está estrechamente relacionada con el contenido en glutatión reducido del músculo cardíaco (Haddock *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que cantidades intermedias de vitamina E (E MEDIA) son suficientes para disminuir la peroxidación lipídica, mientras que se necesitan niveles altos de esta vitamina (E ALTA) para obtener los valores más altos de

la razón GSH/GSSG. En cualquier caso, estos resultados muestran que un descenso en la peroxidación lipídica junto con un aumento en la razón GSH/GSSG se obtiene en el corazón con dosis de vitamina E mucho más altas que el requerimiento mínimo diario.

La importancia de la suplementación óptima con vitamina E en el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades parece especialmente importante en el caso del corazón, ya que el tejido muscular de mamíferos, incluido el músculo cardíaco, es especialmente pobre en defensas antioxidantes endógenas. Además, el músculo cardíaco muestra el mayor consumo de oxígeno basal (5 ml O₂/g.h) y máximo (18 ml O₂/g.h) así como el mayor contenido en citocromo *c* entre los órganos vitales, y la diferencia en la concentración de citocromo *c* entre el corazón y el resto de los tejidos es todavía mayor en los humanos que en las ratas (Tyler, 1992). Consecuentemente, la razón GSH/GSSG es menor en el corazón que en el hígado de cobaya. La presencia simultánea en el corazón de una capacidad antioxidante endógena baja con una elevada tasa de metabolismo mitocondrial aerobio (que incrementaría la tasa de producción de radicales libres) para mantener la contracción cardíaca, puede conducir fácilmente a un estrés oxidativo endógeno en este órgano. Esto se puede relacionar con el hecho de que el fallo cardíaco se encuentre en primer lugar entre las causas de muerte por fallo de un sólo órgano en la mayoría de los países industrializados. La capacidad de la vitamina E de proteger al corazón frente al estrés oxidativo, observada en este trabajo en el modelo del cobaya, puede ser de gran utilidad frente a la principal causa de muerte en humanos.

El shock séptico es un fenómeno sistémico que se produce tras una infección aguda y da lugar a un descenso en la presión sanguínea, un aumento de la frecuencia respiratoria y cardíaca, y puede producir en pocas horas coagulación intravascular y un fallo orgánico generalizado (French *et al.*, 1994). En este trabajo utilizamos lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* serotipo 0111:B4 para la inducción experimental del shock séptico en el cobaya. Aunque el mecanismo preciso de la sepsis inducida por endotoxinas bacterianas es desconocido, se relaciona con una inadecuada perfusión tisular (James *et al.*, 1995) y con la producción de radicales libres (McCord, 1987).

En nuestro estudio, los cobayas que recibieron dosis bajas de vitaminas C y/o E presentaron una deficiencia marginal, como ocurría en los experimentos anteriores, ya que

ingirieron como media 1,3 mg de vitamina C y/o 0,6 mg de vitamina E diarios, cantidades similares a los requerimientos mínimos diarios.

Al finalizar las cinco semanas de suplementación con diferentes cantidades de vitaminas C y E en la dieta, y antes del tratamiento con LPS, los grupos que recibieron dosis bajas de vitamina C (C BAJA E BAJA y +LPS +E) presentaron una reducción en la ingesta y el crecimiento, como ya habíamos observado en el primer estudio de este trabajo de suplementación con vitamina C.

El hígado es un órgano fundamental en la detoxificación del lipopolisacárido (LPS) bacteriano durante el shock endotóxico, con la participación de las células parenquimatosas y sinusoidales (Nolan, 1981). Este proceso se acompaña de daño hepatocelular iniciado por la activación, inducida por LPS, de células fagocíticas como los neutrófilos y las células de Kupffer. Se han realizado numerosos estudios en el hígado sobre la relación entre la endotoxina y el estrés oxidativo (Clements y Habib, 1995; Dhaunsi *et al.*, 1993; Ouchi *et al.*, 1993).

La quimioluminiscencia indica el nivel de oxígeno singlete *in vivo* (Cadenas y Sies, 1984), y un aumento de aquella refleja un incremento de la concentración intracelular de O₂ singlete y la presencia estrés oxidativo. En ratas sometidas a septicemia, se ha observado que la quimioluminiscencia hepática aumenta a las 24 h del desarrollo del shock endotóxico y este aumento está asociado al de enzimas marcadoras de daño hepático (Llesuy *et al.*, 1994).

Diversos estudios han demostrado que antioxidantes como la superóxido dismutasa (Koyama *et al.*, 1992), la catalasa (Milligan *et al.*, 1988; Seekamp *et al.*, 1988), el ácido ascórbico (Dwenger *et al.*, 1994), la dimetiltiourea (Olson *et al.*, 1987) y la N-acetilcisteína (Bernard *et al.*, 1984) atenúan el daño pulmonar causado por la endotoxina. Estas observaciones confirman el importante papel de las especies reactivas del oxígeno en el daño producido por la endotoxina.

En otros estudios, sin embargo, el grado de necrosis hepatocelular y los niveles plasmáticos elevados de transaminasas hepáticas inducidos por la endotoxina, no fueron atenuados por el tratamiento con SOD, catalasa, α -tocoferol o alopurinol, aunque en este

trabajo no se determinaron los niveles hepáticos de estos antioxidantes (Shibayama y Nakata, 1993). Tampoco el selenio protege frente a la hepatotoxicidad producida por la endotoxina (Shibayama *et al.*, 1994).

Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con concentraciones bajas de endotoxina tiene un efecto protector frente a la toxicidad del oxígeno, debido a la inducción de enzimas antioxidantes (Frank *et al.*, 1978).

Los niveles de ácido ascórbico y α -tocoferol que encontramos en el hígado de los cobayas reflejaron las dosis de estas vitaminas empleadas en la dieta. En los grupos que recibieron dosis bajas de vitamina C en la dieta, los niveles de ácido ascórbico hepático no alcanzaron niveles detectables. Los resultados obtenidos indican que el ácido ascórbico influye sobre los niveles de α -tocoferol, ya que el grupo suplementado con ambas vitaminas (+LPS +C+E) presentó valores significativamente mayores de α -tocoferol que el grupo suplementado sólo con vitamina E (+LPS +E). Esto sugiere que el efecto sinérgico entre ambos antioxidantes demostrado *in vitro* (Niki *et al.*, 1985; Packer *et al.*, 1979), podría ocurrir también *in vivo*. El ácido ascórbico regenera al radical tocoferilo a α -tocoferol protegiendo, de una manera indirecta, a las membranas biológicas. En los cobayas intactos utilizados en los experimentos anteriores, los bajos niveles de estrés oxidativo evitarían el consumo del α -tocoferol en los animales deficientes en vitamina C. Por el contrario, el tratamiento con LPS genera un estrés oxidativo adicional, que da lugar a un mayor consumo de la vitamina E, por lo se pone de manifiesto el papel del ácido ascórbico como regenerador del α -tocoferol.

La razón GSH/GSSG, un estimador del estrés oxidativo celular, presentó una tendencia a mostrar valores más altos en los grupos suplementados con vitaminas.

Se ha observado que la endotoxina induce un aumento en la peroxidación lipídica hepática asociada con la producción de radicales superóxido e hidroxilo en las células de Kupffer (Bautista y Spitzer, 1990; Ghezzi *et al.*, 1986). Sin embargo, la hepatotoxicidad producida por la endotoxina no aumenta en ratas por la ingestión de aceite de maíz peroxidado (Shibayama, 1992).

También se ha descrito la acumulación de sustancias reactivas al TBA (Sakaguchi *et al.*, 1991), dienos conjugados (Clements y Habib, 1995) y quimioluminiscencia (French *et al.*, 1994) y descensos en los niveles de glutatión reducido y antioxidantes liposolubles (Ohtake y Ogawa, 1984) en el hígado de roedores expuestos a endotoxina de *E. coli*.

En hígado de rata *in vivo*, los niveles de MDA incrementaron en la fase aguda del shock endotóxico, descendiendo por debajo de los valores controles durante la fase de recuperación, mientras que lo contrario ocurre en la actividad enzimática SOD (Portolés *et al.*, 1993).

En nuestro estudio, el tratamiento con LPS no modificó los niveles de MDA ni de los productos de peroxidación lipídica *in vivo* (TBARS a 0 min) en el hígado. Tampoco se observó un aumento de la peroxidación lipídica *in vitro* entre los grupos C BAJA E BAJA y +LPS, aunque ambos grupos presentaron niveles elevados de TBARS debido a las baja concentración hepática de vitamina E y a la ausencia total de vitamina C. Por el contrario, la suplementación con vitaminas en la dieta disminuyó significativamente la susceptibilidad a la peroxidación lipídica en relación con los grupos no suplementados. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los dos experimentos anteriores.

La concentración hepática de carbonilos proteicos aumentó significativamente como consecuencia del tratamiento con LPS, lo que sugiere la existencia de daño oxidativo a proteínas durante el shock endotóxico. Este efecto no se presentó en los grupos suplementados con vitamina C, lo que indica un papel de esta vitamina C como antioxidante en la fracción soluble, como habíamos observado en el primer experimento de esta tesis.

El daño oxidativo al ADN, estimado mediante la determinación de 8-OHdG, tendió a aumentar por efecto del tratamiento con endotoxina, y este efecto fue revertido por la suplementación con ácido ascórbico, α -tocoferol y, de una forma más acusada, con ambas vitaminas.

En el experimento de suplementación con diferentes cantidades de vitamina C en la dieta, habíamos observado que el tratamiento con dosis bajas de esta vitamina, eliminaba el ácido ascórbico cardíaco, mientras que dosis medias o altas producían un aumento en sus

niveles. En los cobayas tratados con LPS, encontramos el mismo resultado en los grupos que recibieron dosis bajas de vitamina C (C BAJA E BAJA, +LPS y +LPS +E). Sin embargo, los grupos tratados con dosis medias de esta vitamina (+LPS +C y +LPS +C+E) la concentración cardíaca de ácido ascórbico no resultó detectable, lo que indica que el ascorbato es consumido tras el tratamiento con LPS. Estudios previos sobre la acción de la endotoxina en tejidos animales se han realizado en animales capaces de sintetizar el ascorbato. Por esta razón, probablemente, este efecto de la endotoxina sobre los niveles de ácido ascórbico cardíaco no han sido descritos anteriormente.

Recientemente se ha descrito un efecto protector parcial frente a la endotoxina con el antioxidante N-acetilcisteína en el corazón (Zhang *et al.*, 1994) y con ascorbato en el pulmón (Dwenger *et al.*, 1994), y se ha observado la capacidad de la endotoxina de promover la oxidación del ascorbato (Stark *et al.*, 1988). El consumo total del ascorbato en el corazón, a diferencia de lo que sucede en el hígado, indica su relevancia en este tejido.

En un estudio en humanos con shock séptico se ha observado un desequilibrio prooxidante/antioxidante, junto con un descenso en los niveles de antioxidantes (Ogilve *et al.*, 1991). Además, recientemente se ha demostrado un alto consumo de ascorbato en plasma y una rápida degradación del ascorbato suministrado en pacientes con sepsis (Galley *et al.*, 1996). La administración de antioxidantes a modelos animales con sepsis aumenta la supervivencia (Goode y Webster, 1994) y el tratamiento con ascorbato, α -tocoferol, selenio y N-acetilcisteína reduce en un 50% la mortalidad en humanos con síndrome de distrés respiratorio agudo (Sawyer *et al.*, 1989).

Esta información sugiere que los antioxidantes poseen un valor protector frente a la infección. El ácido ascórbico puede ser elegido por tratarse de un antioxidante natural, cuya concentración tisular puede ser fácilmente aumentada mediante la suplementación en la dieta y que no presenta efectos secundarios en humanos a dosis inferiores a 1 g diario. Los humanos, como los cobayas, no son capaces de sintetizar el ascorbato. Es posible que en humanos, como hemos observado en el corazón de cobaya, el ascorbato represente, al mismo tiempo, una diana primaria y una sustancia protectora frente a la toxicidad inducida por la endotoxina.

En nuestro estudio, la peroxidación lipídica en corazón de cobaya no se modificó por el tratamiento con endotoxina. La suplementación con vitamina E, sólo (+LPS +E) o en combinación con vitamina C (+LPS +C+E), dió lugar a un descenso en la peroxidación lipídica en presencia de LPS. Así, el valor protector de la vitamina E que habíamos encontrado en cobayas sanos en el estudio de suplementación con vitamina E en la dieta, se mantiene en animales tratados con endotoxina. Además, la concentración de vitamina E, el principal antioxidante liposoluble, no se modificó por el tratamiento con LPS. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo agudo inducido por la endotoxina en el miocardio del cobaya, no ocurre primariamente en la fracción lipofílica. Esta idea es apoyada por el efecto de la endotoxina sobre los niveles de ascorbato, antioxidante hidrosoluble.

En la segunda parte de esta tesis estudiamos el efecto de la suplementación con ácido ascórbico y α -tocoferol en la dieta en el hígado y el plasma de ratas ODS.

En este estudio, las concentraciones hepáticas de vitamina E reflejaron los niveles de esta vitamina en la dieta en las tres dosis seleccionadas, mientras que en plasma, la concentración de vitamina E mostró dependencia de la dieta sólo entre los grupos E BAJA y E MEDIA. La concentración de vitamina C fue dependiente de la dieta en los tres niveles de suplementación estudiados, tanto en hígado como en plasma.

La suplementación en la dieta con vitamina C no modificó los valores de TBARS *in vivo* o *in vitro* en hígado ni en plasma y esto fue confirmado mediante la determinación específica de hidroperóxidos lipídicos PCOOH y PEOOH. Un estudio previo en ratas ODS (Kimura *et al.*, 1992) también mostró una carencia de efecto de la vitamina C sobre los niveles plasmáticos de TBARS.

Otros autores han demostrado la capacidad de la vitamina C en la dieta de disminuir los niveles hepáticos de TBARS en el cobaya (Chen y Chang, 1978) y en nuestro estudio en hígado de cobaya también hemos observado que la suplementación con vitamina C en la dieta es capaz de disminuir los niveles de MDA libre. La diferencia entre estos resultados y los que hemos encontrado en este estudio en ratas ODS puede ser debido a la utilización de variaciones de vitamina C en la dieta más amplias o tiempos de suplementación mayores en los estudios llevados a cabo en cobayas, o a diferencias intrínsecas en respuesta a la

suplementación con vitamina C entre los dos modelos animales.

En 1968, Tappel sugirió por primera vez una acción sinérgica entre la vitamina C y la vitamina E para eliminar radicales libres (Tappel, 1968). Diversos estudios realizados *in vitro* indican que el ácido ascórbico presente en la fase acuosa reacciona eficientemente con el radical α -tocoferoxilo producido en liposomas en proceso de peroxidación lipídica, regenerando al α -tocoferol y por tanto su capacidad de eliminar radicales libres.

Scarpa y colaboradores demostraron este efecto sinérgico en liposomas de fosfatidilcolina utilizando un método de resonancia paramagnética de electrones (Scarpa *et al.*, 1984). La reducción del radical α -tocoferilo por parte de la vitamina C también ha sido confirmada mediante espectroscopía en soluciones homogéneas (Packer *et al.*, 1979). Experimentos con generadores de radicales libres liposolubles en dispersiones acuosas, también han demostrado este efecto (Niki *et al.*, 1985; Burton e Ingold, 1986).

Aunque esta interacción entre la vitamina C y el radical de la vitamina E ocurre *in vitro*, actualmente no se ha determinado si este tipo de interacción también tiene lugar *in vivo*. Bendich y colaboradores mostraron que el nivel de vitamina E encontrado en plasma y pulmón en cobayas suplementados con ácido ascórbico que en cobayas alimentados con la misma dieta pero sin ascorbato (Bendich *et al.*, 1984). Este efecto sinérgico antioxidante entre la vitaminas C y E también se ha descrito en el hígado y el pulmón de cobayas alimentados con aceite oxidado (Miyazawa *et al.*, 1986).

Los resultados de nuestro estudio sugieren la existencia de un cierto sinergismo *in vivo* en condiciones basales ya que el contenido en vitamina E en el plasma aumentó en función del la cantidad de vitamina C en la dieta en las ratas ODS alimentadas con la dieta de bajo contenido en vitamina E (E BAJA). Esto es compatible con las relaciones molares relativas entre ambos antioxidantes (mucho mayores en el caso de la vitamina C) y con el sentido de la interacción redox propuesto: la vitamina C reduce al radical de la vitamina E.

Diversos autores han descrito la capacidad de la vitamina E de disminuir la peroxidación lipídica. La suplementación en la dieta con vitamina E disminuyó los niveles de TBARS *in vivo* en hígado de rata (Günther *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1993; Yoshizawa *et*

al., 1991) y disminuyó los valores de TBARS *in vitro* en microsomas hepáticos de rata (Palamanda y Kehrer, 1993) y disminuyó la producción de pentano *in vivo* en ratas (Litov *et al.*, 1981). Nosotros también hemos observado un descenso en los niveles de TBARS en hígado de cobayas suplementados con vitamina E.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que las ratas ODS también responden al tratamiento con vitamina E en la dieta con una reducción de los valores de TBARS *in vivo* tanto en hígado como en plasma y con un claro descenso en la sensibilidad a la peroxidación lipídica hepática (TBARS *in vitro*), lo que encaja con el funcionamiento de la vitamina E como antioxidante en la región lipofílica de los sistemas biológicos.

El descenso de los valores de TBA *in vitro* en el hígado e *in vivo* en plasma se pueden observar del grupo E BAJA al grupo E MEDIA, mientras que el incremento en vitamina E en el grupo E ALTA no produjo beneficios adicionales. Estos resultados son coincidentes con los que hemos encontrado para los valores de TBA *in vitro* en cobayas suplementados con vitamina E.

La reducción en los valores de peroxidación lipídica observados en este experimento mediante el test del TBA fueron confirmados mediante una técnica de HPLC de alta especificidad. Los hidroperóxidos lipídicos se generan durante el proceso de peroxidación lipídica con anterioridad a la fragmentación de la cadena que conduce a una gran variedad de productos, por lo que constituyen unos marcadores ideales de la peroxidación lipídica.

En este experimento, la concentración hepática de hidroperóxidos de fosfatidilcolina y de fosfatidiletanolamina (PCOOH y PEOOH) descendió *in vivo* a medida que aumentaba el contenido de vitamina E en la dieta. El descenso en los niveles de PEOOH se observa ya en el grupo E MEDIA, mientras que se necesitan niveles más altos de vitamina E (E ALTA) para observar una reducción significativa en los niveles de PCOOH.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, podemos deducir que la determinación de las cantidades óptimas de vitaminas en la dieta, uno de los objetivos principales de la investigación sobre vitaminas antioxidantes, puede variar dependiendo del parámetro estudiado. Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento indican que esas

cantidades óptimas son mucho más altas que aquellas necesarias para evitar los síndromes carenciales. Las concentraciones de vitamina E observadas en el grupo E BAJA son mayores que las típicas de ratas deficientes en esta vitamina, lo que apoya la conclusión anterior.

Se ha descrito la capacidad de la vitamina E para inhibir la acumulación de hidroperóxidos lipídicos en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono (Miyazawa *et al.*, 1990). Sin embargo, el efecto protector de la vitamina E sobre la formación de hidroperóxidos lipídicos *in vivo* en ausencia de cualquier tipo de manipulación experimental que incremente el estrés oxidativo sobre los niveles basales no había sido descrita anteriormente.

Las ratas ODS se utilizaron para estudiar simultáneamente la capacidad de las vitaminas C y E en la dieta de proteger contra la peroxidación lipídica en hígado y plasma en animales en ausencia de un estrés oxidativo. La vitamina C aumentó el contenido en vitamina E en plasma en los grupos E BAJA. La suplementación con vitamina E en la dieta, de acuerdo con trabajos realizados en otros modelos animales, disminuyó la peroxidación lipídica en hígado y plasma medida por el test del TBA. Esta capacidad fue confirmada a través de una determinación de PCOOH y PEOOH altamente específica mediante HPLC con detección de quimioluminiscencia.

En la última parte de esta tesis, estudiamos el efecto de la suplementación con ácido ascórbico y α -tocoferol en la dieta sobre los productos de peroxidación lipídica en la orina humana.

La estimación del estrés oxidativo global de todo el organismo mediante la determinación de los productos de peroxidación lipídica en la orina constituye un medio de determinar el estrés oxidativo en humanos de una manera sencilla y no invasiva (Kosugi *et al.*, 1994; Dhanakoti y Draper, 1987).

En las muestras de orina, la determinación de productos de peroxidación lipídica mediante la determinación espectrofotométrica clásica de TBARS está sujeta a ciertas interferencias. Por otra parte, la detección directa de MDA libre mediante HPLC (Bull y Marnett, 1985) presenta la limitación de que el MDA libre no está presente de una forma

consistente en la orina de animales alimentados con una dieta estándar (Hadley y Draper, 1989). Esto es debido, probablemente, al metabolismo del MDA en los tejidos por enzimas como la aldehído deshidrogenasa mitocondrial o a la reacción del MDA con el nitrógeno de guanina y citosina o con grupos amino de proteínas y fosfolípidos (Lee *et al.*, 1992; Draper y Hadley, 1990; Kosugi *et al.*, 1993).

Se ha descrito que diversos compuestos como el N- α -acetil-(2-propenal)lisina (McGirr *et al.*, 1985), su forma no acetilada N- ϵ -(2-propenal)lisina (Draper *et al.*, 1988), N-(2-propenal)serina (Hadley y Draper, 1988) y N-(2-propenal)etanolamina (Hadley y Draper, 1989) son responsables de más del 75% del cromógeno formado por reacción con el TBA en la orina de rata o humana. Algunos de estos compuestos son de origen endógeno en animales intactos (Hadley y Draper, 1989).

Toda esta información sugiere que la medida de productos de peroxidación lipídica en la orina debe ser estimada mediante medidas apropiadas de las sustancias TBA positivas en lugar de la detección directa de MDA (Kikugawa *et al.*, 1992). La medida de TBARS permite la estimación simultánea de diversos intermediarios y productos de peroxidación lipídica, lo que hace a este método mucho más sensible al estrés oxidativo *in vivo* (Guichardant *et al.*, 1994).

El único requerimiento para la aplicabilidad directa del test del TBA a las muestras biológicas *in vivo* es la utilización de un método que elimine las interferencias de sustancias no relacionadas con la peroxidación lipídica. Recientemente se ha centrado mucha atención en la medida de TBARS por HPLC con detección espectrofotométrica (Kosugi *et al.*, 1994; Guichardant *et al.*, 1994) por su alta fiabilidad. Sin embargo, se requieren métodos más simples, rápidos y sensibles, y que mantengan la capacidad de eliminar las interferencias.

La fluorimetría presenta la importante ventaja de una alta sensibilidad en relación con las técnicas de HPLC con detección UV (Richard *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1987; Iwata y Kikugawa, 1987; Wong *et al.*, 1987). Además, la medida de TBARS por fluorescencia elimina la interferencia de diversas sustancias (Bird y Draper, 1984; Okawa *et al.*, 1979). Un estudio reciente (Richard *et al.*, 1992) demuestra que la medida directa de los niveles de TBARS por fluorescencia correlaciona con los determinados en las mismas muestras

mediante HPLC con detección UV a 532 nm ($r=0,8$; $p < 0,0001$).

En el presente estudio, la determinación de sustancias TBA positivas fluorescentes en la orina humana se llevó a cabo realizando un barrido de todas las muestras entre 500 y 600 nm de longitud de onda de emisión. Los picos de emisión obtenidos, que estaban especialmente bien definidos en los sujetos con valores más altos de TBARS, mostraban la misma forma y el mismo máximo que los del complejo MDA-TBA. Esto confirma la alta especificidad de la medida de TBARS por fluorescencia en la orina humana.

La reducida variabilidad obtenida en nuestros resultados se puede relacionar con el hecho de que los valores de TBA se refirieron a la concentración de creatinina para corregir las variaciones en el volumen de orina (Knight *et al.*, 1988), y con la cuidadosa selección y el cercano seguimiento de los sujetos.

Una importante materia de discusión en relación con las medidas de TBARS fluorescentes es la selección de una longitud de onda de excitación apropiada. Mientras que todos los autores coinciden en medir la emisión de fluorescencia en el intervalo 532-539 nm, el método original descrito por Yagi en 1976 y otros trabajos posteriores (Draper *et al.*, 1993; Therasse y Lemmonier, 1987; Tatum *et al.*, 1990) recomiendan 515 nm ó 525 nm como longitud de onda de excitación con el fin de evitar el solapamiento de los espectros.

Otros autores, sin embargo, prefieren seleccionar la longitud de onda de excitación entre 532-539 nm para aumentar la sensibilidad (Yin, 1995) y proponen un barrido sincronizado (Yin, 1995; Conti *et al.*, 1991) para evitar el solapamiento de los espectros que se produce en muestras extraídas con n-butanol, debido a la cercanía entre las longitudes de onda de excitación y de emisión.

Los resultados obtenidos en este experimento indican que la longitud de onda de excitación óptima en muestras de orina humana extraídas con n-butanol corresponden a la descrita originalmente por Yagi para plasma sanguíneo, puesto que tras múltiples prebarridos de excitación-emisión de fluorescencia, encontramos que la longitud de onda de excitación óptima era 503 nm. A esta longitud de onda se observaba una alta sensibilidad al mismo tiempo que las longitudes de onda de excitación y emisión se mantenían suficientemente

separadas como para evitar el solapamiento de ambos espectros.

Cuando estas longitudes de onda óptimas son seleccionadas, se obtienen picos de fluorescencia idénticos en las muestras de orina humana y en el MDA puro, asegurando también la alta especificidad del método.

Estudios previos han demostrado incrementos en los productos de peroxidación lipídica en la orina en diversas situaciones fisiológicas como el ejercicio (Kosugi *et al.*, 1994), ciertas enfermedades (Fernández y Videla, 1989; Yagi *et al.*, 1981) o en situaciones de deficiencia en vitamina E (Lee *et al.*, 1992; Draper *et al.*, 1984). La vitamina E, aunque sólo en combinación con vitamina C y butilhidroxitolueno, protege parcialmente contra estos incrementos en rata (Kosugi *et al.*, 1994).

Se han descrito pequeñas reversiones parciales en los incrementos en TBARS en orina determinados por espectrofotometría inducidos por el ejercicio en 4 hombres tras tomar 800 mg diarios de vitamina E durante 12 días (Meydani *et al.*, 1993). Nuestro estudio realizado en 21 jóvenes sanos muestra la capacidad de 100 mg de vitamina E de disminuir los niveles de TBARS en orina en individuos que realizan sus actividades normales y en ausencia de cualquier estrés oxidativo adicional. Esto no ha sido descrito previamente en humanos.

Se ha demostrado que la suplementación con 100 mg de α -tocoferol (la misma dosis que la utilizada en nuestro estudio) durante 6 años, puede prevenir las primeras etapas de la aterosclerosis coronaria, mediante el descenso de la peroxidación de LDL (Takamatsu *et al.*, 1995).

Un estudio realizado en la Universidad de Tufts, en Boston, con 32 individuos sanos de 60 años de edad en adelante, demuestra que la suplementación con vitamina E produce un aumento de la respuesta inmune y un descenso de la concentración de peróxidos lipídicos en plasma (Meydani *et al.*, 1994).

Los individuos de este estudio recibieron 800 mg diarios de vitamina E o placebo durante 30 días. No se observaron efectos secundarios en ningún caso. La suplementación no afectó al peso corporal, proteínas plasmáticas totales, albúmina, glucosa, colesterol total,

triglicéridos, bilirrubina, fosfatasa alcalina, indicadores de las funciones hepática y renal, estado hematológico, hormonas tiroideas y aclaramiento de creatinina. La suplementación aumentó significativamente los niveles de vitamina E en sangre y los niveles plasmáticos de zinc. El efecto sobre el zinc puede reflejar una interacción entre los dos nutrientes. Estos datos indican que la suplementación con vitamina E a corto plazo, a dosis relativamente altas como 800 mg/día, no presenta efectos adversos en individuos adultos sanos.

En resumen, este experimento muestra que la medida directa mediante fluorescencia de TBARS en la orina se puede utilizar en humanos para estimar el estrés oxidativo del organismo de una manera no invasiva. Con la utilización de este método hemos observado la capacidad de la suplementación oral con dosis relativamente bajas de vitamina E de disminuir los productos de peroxidación lipídica en la orina de varones jóvenes sanos.

CONCLUSIONES

1. La suplementación con vitamina C en la dieta disminuye el daño oxidativo a lípidos y proteínas en el hígado de cobaya *in vivo* en condiciones basales.

2. La suplementación con vitamina E no modifica los indicadores de estrés oxidativo en el compartimento hidrofílico y disminuye la peroxidación lipídica en el hígado, mientras que en el corazón aumenta la razón GSH/GSSG y protege contra la peroxidación lipídica en cobayas *in vivo* en condiciones basales.

3. Tanto dosis muy bajas como muy altas de vitaminas C y E producen un descenso en la insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

4. La determinación de las cantidades óptimas de vitaminas en la dieta, puede variar dependiendo del parámetro estudiado. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que esas cantidades óptimas son mucho más altas que aquellas necesarias para evitar los síndromes carenciales.

5. El tratamiento con 3-amino-1,2,4-triazol (AT) no modificó los niveles de estrés oxidativo a la dosis y tiempo estudiados. La suplementación con ácido ascórbico disminuyó el daño oxidativo a lípidos y proteínas tanto en los animales intactos como en los tratados con AT.

6. En el hígado de cobayas tratados con LPS se observa un efecto sinérgico *in vivo* entre las vitaminas C y E, mientras que este efecto no es patente en animales intactos.

7. El tratamiento con LPS de *E. coli* produce en el hígado de cobaya un aumento del daño oxidativo a proteínas que es revertido por acción de la vitamina C. Las vitaminas C y E pueden proteger frente a la peroxidación lipídica hepática (TBARS) en animales tratados con endotoxina.

8. La suplementación con vitamina E sólo o en combinación con vitamina C, es capaz de proteger contra la peroxidación lipídica cardíaca en presencia de LPS. El estrés oxidativo agudo inducido por la endotoxina en el miocardio de cobaya, no opera principalmente sobre la fracción lipofílica. El ácido ascórbico es una diana antioxidante primaria durante el shock endotóxico en el corazón de cobaya. El ascorbato podría tener un valor preventivo importante frente al daño producido por los radicales libres durante el shock endotóxico.

9. En las ratas ODS, la suplementación con vitamina C aumenta los niveles plasmáticos de vitamina E, a niveles bajos de vitamina E en la dieta, lo que apoya el efecto sinérgico de ambas vitaminas *in vivo*.

10. La suplementación con vitamina E en la dieta disminuye los niveles de productos de peroxidación lipídica (TBARS) y de hidroperóxidos lipídicos en hígado y plasma de las ratas ODS.

11. La suplementación oral con dosis relativamente bajas de α -tocoferol (100 mg/día) da lugar a un descenso en los productos de peroxidación lipídica en la orina de varones jóvenes sanos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABE K., OHMAE M. y KATSUI G. (1976) Rapid and micro-method for the determination of tocopherols in liver. *Vitamins (Japan)* **50**: 453-457.
- ADAMS J.D. y ODUNZE I.N. (1991) Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.* **10**: 161-169.
- ADELMAN R., SAUL R.L. y AMES B.N. (1988) Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2706-2708.
- ALLEN R.G. y BALIN A.K. (1989) Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Rad. Biol. Med.* **6**: 631-661.
- ALLEN R.G., FARMER K.J. y SOHAL R.S. (1983) Effect of catalase inactivation on levels of inorganic peroxides, superoxide dismutase, glutathione, oxygen consumption and life span in adult houseflies (*Musca domestica*). *Biochem. J.* **216**: 503-506.
- AMES B.N. (1989a) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Rad Res. Commun.* **7**: 121-128.
- AMES B.N. (1989b) Mutagenesis and carcinogenesis: Endogenous and exogenous factors. *Environ. Mol. Mutagen.* **14**: 66-77.
- AMES B.N., CATHCART R., SCHWIERS E. y HOCHSTEIN P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused ageing and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6858-6862.
- AMES B., SHIGENAGA M.K. y HAGEN T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 7915-7922.

- AMICI A., LEVINE R.L., TSAI L. y STADTMAN E.R. (1989) Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **264**: 3341-3346.
- ANTONENKOV V. y SIES H. (1992) Ascorbate-dependent capacity of dialysed rat liver cytosol to prevent nonenzymatic lipid peroxidation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**: 1111-1116.
- ARACIL F.M., BOSCH M.A. y MUNICIO A.M. (1985) Influence of *E. coli* lipopolysaccharide binding to rat alveolar type II cells on their functional properties. *Mol. Cell. Biochem.* **68**: 59-66.
- ARAGON C.M.G., ROGAN F. y AMIT Z. (1991) Dose- and time-dependent effect of an acute 3-amino-1,2,4-triazole injection on rat brain catalase activity. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 699-702.
- ARAKAWA N., OTSUKA M. y KURATA T. (1982) Methods in vitaminology series. Methods for assay of vitamin C. *Vitamins (Japan)* **56**: 255-262.
- ARTHUR M.J.P., BENTLEY I.S., TANNER A.R., KOWALSKI SAUNDERS P. y MILLWARD-SADLER G.H. (1985) Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* **89**: 1114-1122.
- ASADA K., KISO K. y YOSHIKAWA K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J. Biol. Chem.* **249**: 2175-2181.
- ASUNCIÓN J.G., MILLÁN A.N., PLA R., BRUSE L., ESTERAS A., PALLARDO F.V., SASTRE J. y VIÑA J. (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* **10**: 333-338.
- AUST S.D., CHIGNELL C.F., BRAY T.M., KALYANARAMAN B. y MASON R.P. (1993) Free radicals in toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**: 168-178.

- BAEHNER R.L., BOXER L.A. y INGRAHAM L.M. (1982) Reduced oxygen by-products and white blood cells. En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W.A. ed.), Acad. Press., New York, pp. 91-108.
- BAGCHI D., BAGCHI M., HASSOUN E. y STOHS S.J. (1992) Endrin-induced urinary excretion of formaldehyde, acetaldehyde, malonaldehyde and acetone in rats. *Toxicology* **75**: 81-89.
- BANDY B. y DAVISON A.J. (1990) Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Rad. Biol. Med.* **8**: 523-539.
- BARJA G. (1993) Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Rad. Res. Comms.* **18**: 63-70.
- BARJA G. (1996) Ascorbic acid and aging. En: *Subcellular Biochemistry* Vol. 25, Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology (Harris J.R. ed.), Plenum Press, pp. 157-188.
- BARJA DE QUIROGA G., LÓPEZ-TORRES M. y PÉREZ-CAMPO R. (1989) Catalase is needed to avoid tissue peroxidation in *Rana perezi* in normoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* **94C**: 391-398.
- BARJA DE QUIROGA G., LÓPEZ-TORRES M., PÉREZ-CAMPO R. y ROJAS C. (1991) Simultaneous determination of two antioxidants, uric and ascorbic acid, in animal tissue by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **199**: 81-85.
- BARTLETT G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**: 466-468.
- BATES C.J., COWEN T.D. y TSUCHIYA H. (1988) Growth, ascorbic acid and iron contents of tissues of young guinea-pigs whose dams received high or low levels of dietary ascorbic acid or Fe during pregnancy and suckling. *Br. J. Nutr.* **60**: 487-497.

- BAUTISTA A.P. y SPITZER J.J. (1990) Superoxide anion generation by *in situ* perfused rat liver: effect of *in vivo* endotoxin. *Am. J. Physiol.* **259**: G907-912.
- BAUTISTA A.P., MESZAROS K., BOJTA J. y SPITZER J.J. (1990) Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. *J. Leukocyte Biol.* **48**: 123-128.
- BEERS R.F. y SIZER I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140.
- BENDICH A. (1990) Antioxidant vitamins and their functions in immune responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* **262**: 35-55.
- BENDICH A., D'APOLITO P., GABRIEL E. y MACHLIN L.J. (1984) Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens. *J. Nutr.* **114**: 1588-1593.
- BERNARD G.R., LUCHT W.D., NIEDERMEYER M.E., SNAPPER J.R., OGLETREE M.L. y BRIGHAM K.L. (1984) Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon *in vitro* granulocyte function. *J. Clin. Invest.* **73**: 1772-1784.
- BERRY L.J. (1977) Bacterial toxins. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **5**: 239-318.
- BIELSKI B.H.J., ARUDI R.L. y SUTHERLAND M.W. (1983) A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **258**: 4759-4761.
- BIRD R.P. y DRAPER H.H. (1984) Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol.* **105**: 299-305.
- BLOCK G. (1991) Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 1310S-1314S.

- BLOT W.J., LI J.Y., TAYLOR P.R., GUO W., DAWSEY S., WANG G.Q., YANG C.S., ZHENG S.F., GAIL M., LI G.Y., YU Y., LIU B., TANGREA J., SUN Y., LIU F., FRAUMENI J.F., ZHANG Y.H. y LI B. (1993) Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin-mineral combinations, cancer incidence and disease specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**: 1483-1491.
- BODE A.M., CUNNINGHAM L. y ROSE N.C. (1990) Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high pressure liquid chromatography. *Clin. Chem.* **36**: 1807-1809.
- BOSCH M.A., GARCÍA R., PAGANI R., PORTOLÉS M.T., DÍAZ-LAVIADA I., ABARCA S., AINAGA M.J., RISCO C. y MUNICIO A.M. (1988) Induction of reversible shock by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in rats. Changes in serum and cell membrane parameters. *Br. J. exp. Path.* **69**: 805-812.
- BOSTICK R.M., POTTER J.D., MCKENZIE D.R., SELLERS T.A., KUSHI L.H., STEINMETZ K.A. y FOLSOM A.R. (1993) Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E: the Iowa women's health study. *Cancer Res.* **53**: 4230-4237.
- BOVERIS A., CADENAS E. y STOPPANI A.O.M. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **156**: 435-444.
- BOWRY V.W., INGOLD K.U. y STOCKER R. (1992) Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes prooxidant. *Biochem. J.* **288**: 341-344.
- BREIMER L.H. (1984) Enzymatic excision from τ -irradiated polynucleotides of adenine residues whose imidazole ring has been ruptured. *Nucleic Acid Res* **12**: 6359-6367.
- BUETTNER G.R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 535-543.

- BULL A.W. y MARNETT L.J. (1985) Determination of malondialdehyde by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **149**: 284-290.
- BURTON G.W. e INGOLD K.U. (1986) Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* **19**: 194-201.
- BUTTRISS J.L. y DIPLOCK A.T. (1988) The α -tocopherol and phospholipid fatty acid content of rat liver subcellular membranes in vitamin E and selenium deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* **963**: 61-69.
- BYERS T. y PERRY G. (1992) Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* **12**: 139-159.
- CADENAS E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 79-110.
- CADENAS E. y SIES H. (1984) Low level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods Enzymol.* **105**: 211-230.
- CADET J. y TEOULE R. (1978) Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochem. Photobiol.* **28**: 661-667.
- CATHCART R., SCHWIERS E., SAUL R.L. y AMES B.N. (1984) Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: A possible assay for oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5633-5637.
- CARNEY J.M., STARKE-REED P.E., OLIVER C.N., LANDUM R.W., CHENG M.S., WU J.F. y FLOYD R.A. (1991) Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- α -phenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3633-3636.

- CERUTTI P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **277**: 375-381.
- CHANCE B. (1981) The reaction of oxygen with citochrome oxidase: the role of sequestered intermediates. En: *Oxygen and Living Processes: an Interdisciplinary Approach* (Gilbert D.L. ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 200-209.
- CHANCE B., SIES H. y BOVERIS A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605.
- CHEN L.H. (1988) Ascorbic acid-stimulated peroxidation in hepatocytes and inhibition by antioxidants. *Biochem. Arch.* **4**: 373-380.
- CHEN L.H. y CHANG M.L. (1978) Effect of dietary vitamin E and vitamin C on respiration and swelling of guinea pig liver mitochondria. *J. Nutr.* **108**: 1616-1620.
- CLEMENT M. y BOURRE J.M. (1993) Alteration of brain and liver microsomal polyunsaturated fatty acids following dietary vitamin E deficiency. *Neurosci. Lett.* **164**: 163-166.
- CLEMENTS N.C. y HABIB M.P. (1995) The early pattern of conjugated dienes in liver and lung after endotoxin exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: 780-784.
- CLOWES G.H.A., O'DONNELL T.F., RYAN N.T. y BLACKBURN G.L. (1974) Energy metabolism in sepsis: treatment based on different patterns in shock and high output stage. *Ann. Surg.* **179**: 684-688.
- COMPORTI M. (1985) Biology of disease-lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* **53**: 599-623.
- CONTI M., MORAND P.C., LEVILLAN P. y LEMMONIER A. (1991) Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin. Chem.* **37**: 1273-1275.

- COWLEY R.A., ATTAR S. y LA BROSSE E. (1969) Some significant biochemical parameters found in 300 shock patients. *J. Trauma* **9**: 926-930.
- DASGUPTA A. y ZDUNECK T. (1992) In vitro peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate. *Life Sci.* **50**: 875-882.
- DAVIES K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* **262**: 9895-9901.
- DAVIES K.J. (1990) Protein oxidation and proteolytic degradation. General aspects and relationship to cataract formation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**: 503-511.
- DAVIES K.J.A. y DELSIGNORE M.E. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **262**: 9908-9913.
- DAVIES K.J.A., DELSIGNORE M.E. y LIN S.W. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* **262**: 9902-9907.
- DEL MAESTRO R.F. (1980) An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.* **492**: 153-168.
- DESPRET S., DINH L., CLEMENT M. y BOURRE J.M. (1992) Alteration of delta-6 desaturase by vitamin E in rat brain and liver. *Neurosci. Lett.* **145**: 19-22.
- DHANAKOTI S.N. y DRAPER H.H. (1987) Response of urinary malondialdehyde to factors that stimulate lipid peroxidation *in vivo*. *Lipids* **22**: 643-646.
- DHAUNSI G.S., SINGH I. y HANEVOLD C.D. (1993) Peroxisomal participation in the cellular response to the oxidative stress of endotoxin. *Mol. Cell Biochem.* **126**: 25-35.
- DIPLOCK A.T. (1985) Vitamin E. En: *Fat-soluble Vitamins* (Diplock A.T. ed.), Heinemann, London, pp. 154-223.

- DIX T.A., KUHN D.M. y BENKOVIC (1987) Mechanism of oxygen activation by thyroxine hydroxylase. *Biochemistry* **26**: 3354-3361.
- DIZDAROGLU M. (1991) Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Rad. Biol. Med.* **10**: 225-242.
- DOBBS L.G., MASON R.J., WILLIAMS M.C., BENSON B.J. y SVEISKI K. (1982) Secretion of surfactant by primary cultures of alveolar type II cells isolated from rats. *Biochim. Biophys. Acta* **713**: 118.
- DRAPER H.H. y HADLEY M. (1990) A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* **20**: 901-907.
- DRAPER H.H., HADLEY M., LISSEMORE L., LAING N.M. y COLE P.D. (1988) Identification of N- ϵ -(2-propenal)lysine as a major urinary metabolite of malondialdehyde. *Lipids* **23**: 626-628.
- DRAPER H.H., POLESSENK L., HADLEY M. y MCGIRR L.G. (1984) Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. *Lipids* **19**: 836-843.
- DRAPER H.H., SQUIRES E.J., MAHMOODI H., WU J., AGARWAL S. y HADLEY M. (1993) A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Rad. Biol. Med.* **15**: 353-363.
- DWENGER A., PAPE H.C., BANTEL C., SCHWEITZER G., KRUMM K., GROTZ M., LUEKEN B., FUNCK M. y REGEL G. (1994) Ascorbic acid reduces the endotoxin-induced lung injury in awake sheep. *Eur. J. Clin. Invest.* **24**: 229-235.
- EGAN R.W., GALE P.H. y KUEHL F.A. (1979) Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase. *J. Biol. Chem.* **251**: 3295-3302.

- EICHHOLZER M., STÄHELIN H.B. y GEY K.F. (1992) Inverse correlation between essential antioxidants in plasma and subsequent risk to develop cancer, ischemic heart disease and stroke respectively: 12-year follow-up of the Prospective Basel Study. En: *Free Radicals and Aging* (Emerit I. y Chance B. eds.), Birkhäuser, Basel, pp. 398-410.
- EKSTRÖM T., STAHL A., SIGVARDSSON K. y HOGBERG J. (1986) Lipid peroxidation *in vivo* monitored as ethane exhalation and malondialdehyde excretion in urine after oral administration of chloroform. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **58**: 289-296.
- EPE B. (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem. Biol. Interact.* **80**: 239-260.
- ESTERBAUER H., LANG J., ZADRAVEC S. y SLATER F. (1984) Detection of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. En: *Methods in Enzymology: Oxygen Radicals in Biological Systems* (Packer L. ed.), Academic Press, London, **105**: 319-327.
- EVANS H.M. y BISHOP K.S. (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**: 650-661.
- FANTONE J.C. y WARD P.A. (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reaction. *Am. J. Pathol.* **107**: 397-418.
- FERNÁNDEZ V. y VIDELA L.A. (1989) Thyroid hormone, active oxygen, and lipid peroxidation. En: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* (Quintanilha A.T. y Miquel J. eds.), Boca Ratón, CRC Press, Florida, **1**: 105-115.
- FISCHER-NIELSEN A., POULSEN H.E. y LOFT S. (1992) 8-Hydroxydeoxyguanosine *in vitro*: Effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 121-126.

- FLEMING J.E., MIQUEL J., COTTRELL S.F., YENGOYAN L.S. y ECONOMOS A. C. (1982) Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology* **28**: 44-53.
- FLOHÉ L. (1988) Superoxide dismutase for therapeutic use: Clinical experience, dead ends and hopes. *Mol. Cell. Biochem.* **84**: 123-131.
- FLOHÉ L. y GIERTZ H. (1987) Endotoxins, arachidonic acid, and superoxide formation. *Rev. Infec. Dis.* **9**: S553-S561.
- FLOYD R.A. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**: 1447-1450.
- FLOYD R.A., WATSON J.J., WONG P.K., ALTMILLER D.H. y RICKARD R.C. (1986) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad. Res. Comm.* **1**: 163-172.
- FOLCH J., LEES M. y STANLEY G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.
- FOOD AND NUTRITION BOARD (1989) *Recommended Dietary Allowance*, 10th Edition, *Nat. Acad. Sci., Nat. Res. Council*, National Academy Press, pp. 99-107.
- FRAGA C.G. y TAPPEL A.L. (1988) Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slice. *Biochem. J.* **252**: 893-896.
- FRAGA C.G., MOTCHNIK P.A., SHIGENAGA M.K., HELBOCK H.J., JACOB R.A. y AMES B.N. (1991) Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11003-11006.
- FRAGA C.G., SHIGENAGA M.K., PARK J.W., DEGAN P. y AMES B.N. (1990) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4533-4537.

- FRANK L., YAM J. y ROBERTS R.J. (1978) The role of endotoxin in protection of adult rats from high oxygen lung toxicity. *J. Clin. Invest.* **61**: 269-275.
- FREEMAN B.A. y CRAPO J.D. (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**: 412-426.
- FREI B. (1991) Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 1113S-1118S.
- FRENCH J.F., THOMAS C.E., DOWNS T.R., OHLWEILER D.F., CARR A.A. y DAGE R.C. (1994) Protective effects of a cyclic nitron antioxidant in animal models of endotoxic shock and chronic bacteremia. *Circ. Shock* **43**: 130-136.
- FRIDOVICH I. (1979) Superoxide and superoxide dismutases. *Advanc. Inorg. Biochem.* **1**: 1-40.
- FUCCI L., OLIVER C.N., COON M.J. y STADTMAN E.R. (1983) Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1521-1525.
- GAJEWSKI E., RAO G., NACKERDIEN Z. y DIZDAROGLU M. (1990) Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* **29**: 7876-7882.
- GALANOS G., LÜDERITZ O., RIETSHEL E. y WESTPHAL O. (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharide with special reference to their lipid A component. En: *Internation Review of Biochemistry* (Goodwing T.W. ed.), University Park Press, Baltimore, Vol. 14.
- GALLEY H.F., DAVIES M.J. y WEBSTER N.R. (1996) Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free Rad. Biol. Med.* **20**: 139-143.

- GARCÍA R., DÍAZ-LAVIADA I., BOSCH M.A., ABARCA S., PORTOLÉS M.T., RISCO C., AINAGA M.J., PAGANI R., MUNICIO A.M. y ESCALONA J. (1990) Morphological studies of cytotoxic lesions in reversible endotoxic shock. *Histol. Histopath.* **4**: 43-48.
- GARCÍA R., VILORIA M.D. y MUNICIO A.M. (1985) Influence of *E. coli* endotoxin on ACTH induced adrenal cell steroidogenesis. *J. Steroid Biochem.* **22**: 377-385.
- GAVINO V.C., DILLARD C.J. y TAPPEL A.L. (1985) The effects of iron overload on urinary excretion of immunoreactive prostaglandin E₂. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**: 322-327.
- GAZIANO M., MANSON J.E., BURING J.E. y HENNEKENS C.H. (1992) Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **669**: 249-259.
- GEERTS A. y ROELS F. (1982) *In vivo* cooperation between hepatic catalase and superoxide dismutase demonstrated by diethyldithiocarbamate. *FEBS Lett.* **140**: 245-247.
- GEY K.F. (1990) Lipids, lipoproteins, and antioxidants in cardiovascular dysfunction. The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms. *Cardiov. Dysf.* **18**: 1041-1045.
- GEY K.F., MOSER U.K., JORDAN P., STÄHELIN H.B., EICHHOLZER M. y LUEDIN E. (1993) Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 787S-797S.
- GEY K.F., PUSKA P., JORDAN P. y MOSER U.K. (1991) Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: 326S-334S.

- GHEZZI P., SACCAROLO B. y BIANCHI M. (1986) Role of reactive oxygen intermediates in the hepatotoxicity of endotoxin. *Immunopharmacology* **12**: 241-244.
- GOODE H.F. y WEBSTER N.R. (1994) Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit. Care Med.* **21**: 1770-1776.
- GRIDLEY G. *et al.* (1992) Vitamin supplement use and reduced risk of oral and pharyngeal cancer. *Am. J. Epidemiol.* **135**: 1083-1092.
- GUICHARDANT M., VALETTE-TALBI L., CAVADINI C., CROZIER G. y BERGER G. (1994) Malondialdehyde measurement in urine. *J. Chromatogr.* **655**: 112-116.
- GÜNTHER T., HÖLLRIEGL V., VORMANN J., BUBECK J. y CLASSEN H.G. (1994) Increased lipid peroxidation in rat tissues by magnesium deficiency and vitamin E depletion. *Magnesium Bull.* **16**: 38-43.
- GÜNTHER T., VORMANN J., HÖLLRIEGL V., DISCH G. y CLASSEN H.G. (1992) Effects of isoproterenol and magnesium deficiency on vitamin E content, lipid peroxidation and mineral metabolism of various tissues. *Magnesium Bull.* **14**: 81-87.
- HADDOCK P.S., WOODWARD B. y HEARSE D.J. (1995) Cardiac Na⁺/K⁺ ATPase activity and its relation to myocardial glutathione status: studies in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**: 1185-1194.
- HADDOX M.K., STEPHENSON J.H., MOSER M.E. y GOLDBERG N.E. (1978) Oxidative-reductive modulation of guinea pig splenic cell guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **253**: 3143-3152.
- HADLEY M. y DRAPER H.H. (1988) Identification of N-(2-propenal)serine as a urinary metabolite of malondialdehyde. *Fed. J.* **2**: 138-140.
- HADLEY M. y DRAPER H.H. (1989) Identification of N-(2-propenal)ethanolamine as a urinary metabolite of malondialdehyde. *Free Rad. Biol. Med.* **6**: 49-52.

- HALE T.W., RAIS-BAHRAMI K., MONTGOMERY D.V.M., HARKEY C. y HABERSANG R.W. (1995) Vitamin E toxicity in neonatal piglets. *Clin. Toxic.* **33**: 123-130.
- HALLIWELL B. (1978) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* **140**: 81-88.
- HALLIWELL B. (1981) Free radicals, oxygen toxicity and aging. En: *Age Pigments* (Sohal R.S. ed.), Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 1-62.
- HALLIWELL B. (1993) The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* **23**: 118-126.
- HALLIWELL B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* **344**: 721-724.
- HALLIWELL B. y ARUOMA O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**: 9-19.
- HALLIWELL B. y GUTTERIDGE J.M.C. (1989a) Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. En: *Free Radicals in Biology and Medicine* (Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. eds.), Clarendon Press, New York, pp. 188-276.
- HALLIWELL B. y GUTTERIDGE J.M.C. (1989b) Lipid peroxidation: a radical chain reaction. En: *Free Radicals in Biology and Medicine* (Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. eds.), Clarendon Press, New York, pp. 188-276.
- HANDIN R.I., KARABIN R. y BOXER G.J. (1977) Enhancement of platelet function by superoxide. *J. Clin. Invest.* **59**: 959-965.

- HANKINSON S.E. (1992) Nutrient intake and cataract extraction in women: A prospective study. *Br. J. Med.* **305**: 335-339.
- HEMILÄ H. (1992) Vitamin C and the common cold. *Br. J. Nutr.* **67**: 3-16.
- HENRY J.P., MONNY C. y MICHELSON A.M. (1975) Characterization and properties of Pholas luciferase as a metalloglycoprotein. *Biochemistry* **14**: 3458-3466.
- HILDEBRANDT A.G. y ROOTS I. (1975) NADPH-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in liver microsomes. *Arch. Biochem.* **171**: 385-397.
- HINSHAW L.B. (1985) En: *Handbook of Endotoxin: Pathophysiology of Endotoxin* (Hinshaw L.B. ed.), Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 16-35.
- HINSHAW L.B., ARCHER L.T., BELLER B.K., WHITE G.L., SCHROEDER T.M. y HOLMES D.D. (1977) Glucose utilization and the role of blood in endotoxic shock. *Am. J. Physiol.* **233**: E71-E79.
- HIRANO T., HOMMA Y. y KASAI H. (1995) Formation of 8-hydroxyguanine in DNA by aging and oxidative stress. En: *Oxidative Stress and Aging* (Cutler R.G., Packer L., Bertram J. y Mori A. eds.), Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 69-76.
- HORIO F., OZAKI K., YOSHIDA A., MAKINO S. y HAYASHI Y. (1985) Requirement for ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J. Nutr.* **115**: 1630-1640.
- HRUSZKEWYCZ A.M. (1988) Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 191-197.
- HUNT J.V., BOTTOMS M.A. y MITCHINSON M.J. (1992) Ascorbic acid oxidation: a potential cause of the elevated severity of atherosclerosis in diabetes mellitus. *FEBS Lett.* **311**: 161-164.

- HUTCHINSON F. (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **32**: 115-154.
- IWATA A. y KIKUGAWA K. (1987) Fluorometric determination of malondialdehyde in oxidized lipids. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 5020-5023.
- JACOB R.A. (1995) The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* **15**: 755-766.
- JACQUES P.F. (1992) Relationship of vitamin C status to cholesterol and blood pressure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **669**: 205-214.
- JIALAL I. y GRUNDY S.M. (1992) Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **33**: 899-906.
- JONES G.L. y NEILL A.R. (1982) The effects of clofibrate and 3-amino-1,2,4-triazole on liver catalase and lipid metabolism in mice. *Biochim. Biophys. Acta* **712**: 420-426.
- KADIISKA M.B., HANNA P.M., HERNÁNDEZ L. y MASON R.P. (1992) *In vivo* evidence of hydroxyl radical formation after acute copper and ascorbic acid intake: Electron spin resonance spin-trapping investigation. *Mol. Pharmacol.* **42**: 723-729.
- KAPPUS H. y DIPLOCK A.T. (1992) Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 55-74.
- KASAI H., CRAIN P.F., KUCHINO Y., NISHIMURA S., OOTSUYAMA A. y TANOOKA H. (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* **7**: 1849-1851.
- KAWAI T., NISHIKIMI M., OZAWA T. y YAGI K. (1992) A missense mutation of L-gulonono- γ -lactone oxidase causes the inability of scurvy-prone osteogenic disorder rats to synthesize L-ascorbic acid. *J. Biol. Chem.* **267**: 21973-21976.

- KIKUGAWA K., KOJIMA T., YAMAKI S. y KOSUGI S. (1992) Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. *Anal. Biochem.* **202**: 249-255.
- KIMURA H., YAMADA Y., MORITA Y., IKEDA H. y MATSUO T. (1992) Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats. *J. Nutr.* **122**: 1904-1909.
- KNEKT P. (1988) Serum vitamin E level and risk of female cancers. *Int. J. Epidemiol.* **17**: 281-286.
- KNEKT P. (1993) Epidemiology of vitamin E: evidence for anticancer effects in humans. En: *Vitamin E in Health and Disease* (Packer L. y Fuchs J. eds.), Dekker, New York, NY, pp. 513-527.
- KNEKT P., AROMAA A., MAATELA J., AARAN R.K., NIKKAN T., HAKAMA M., HAKULINEN T., PETO R., SAXEN E. y TEPPU L. (1988) Serum vitamin E and risk of cancer among Finnish men during a ten-year follow-up. *Am. J. Epidemiol.* **127**: 28:41.
- KNEKT P., REUNANEN A., JARVINEN R., SEPPANEN R., HELIOVAARA M. y AROMAA A. (1994) Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am. J. Epidemiol.* **139**: 1180-1189.
- KNIGHT J., SMITH S., KINDER V. y ANSTALL H. (1987) Reference intervals for plasma lipoperoxides: age, sex, and specimen-related variations. *Clin. Chem.* **33**: 2289-2291.
- KNIGHT J.A., SMITH S.E., KINDER V.E. y PEPPER P.K. (1988) Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography, and determination of reference values for adults. *Clin. Chem.* **34**: 1107-1110.

- KOBA K., ABE K., IKEDA I. y SUGANO M. (1992) Effects of α -tocopherol and tocotrienols on blood pressure and linoleic acid metabolism in the spontaneously hypertensive rats (SHR). *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1420-1423.
- KOJ A., GAULDIE J., SWEENEY G.D., REGOECZI E. y SAUDER D.M. (1985) A simple bioassay for monocyte-derived hepatocyte stimulating factor: increased synthesis of α_2 -macroglobulin and reduced synthesis of albumin by cultured rat hepatocytes. *J. Immunol. Methods* **76**: 317-327.
- KOSUGI H., ENOMOTO H., ISHIZUKA Y. y KIKUGAWA K. (1994) Variations in the level of thiobarbituric acid reactant in healthy humans under different physiological conditions. *Biol. Pharm. Bull.* **17**: 1645-1650.
- KOSUGI H., KOJIMA T. y KIKUGAWA K. (1993) Characteristics of the thiobarbituric acid reactivity of human urine as a possible consequence of lipid peroxidation. *Lipids* **28**: 337-343.
- KOYAMA S., KOBAYASHI T., KUBO K., SEKIGUCHI M. y UEDA G. (1992) Recombinant-human superoxide dismutase attenuates endotoxin-induced lung injury in awake sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**: 1404-1409.
- KUCHINO Y., MORI F., KASAI H., INOUE H., IWAI S., MIURA K., OHTSUKA E. y NISHIMURA S. (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified and at adjacent residues. *Nature* **327**: 77-79.
- KUNIMOTO F., MORITA T., OGAWA R. y FUJITA T. (1987) Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats. *Circ. Shock* **21**: 15-22.
- LABADIE L. (1991) Du scorbut à l'équilibre vitaminique idéal. *Presse Med.* **20**: 2156-2158.
- LEE D.J.W. y BARNES M.McC. (1969) The effects of vitamin E deficiency on the total fatty acids and the phospholipid fatty acids of rat tissues. *Br. J. Nutr.* **23**: 289-295.

- LEE H.S., SHOEMAN D.W. y CSALLANY A.S. (1992) Urinary response to *in vivo* lipid peroxidation induced by vitamin E deficiency. *Lipids* **27**: 124-128.
- LEVINE M., CANTINELA C.C. y DHARIWAL K.R. (1993) *In situ* kinetics and ascorbic acid requirements. En: *World Review of Nutrition and Dietetics*. Panel IV: New concepts on nutrition, fitness and RDAs (Simopulos A.P. ed.), Karger, Basel, **72**: 114-127.
- LEVINE R.L., GARLAND D., OLIVER C.N., AMICI A., CLIMENT I., LENZ A.G., AHN B., SHALTIEL S. y STADTMAN E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**: 464-478.
- LITOV R.E., MATTHEWS L.C. y TAPPEL A.L. (1981) Vitamin E protection against *in vivo* lipid peroxidation initiated in rats by methyl ethyl ketone peroxide as monitored by pentane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**: 96-106.
- LLESUY S., EVELSON P., GONZÁLEZ-FLECHA B., PERALTA J., CARRERAS M.C., PODEROSO J.J. y BOVERIS A. (1994) Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Rad. Biol. Med.* **16**: 445-451.
- LOFT S., ASTRUP A., BUEMANN B. y POULSEN H.E. (1994) Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J.* **8**: 534-537.
- LOFT S., FISCHER-NIELSEN A., JEDING I.B., VISTISEN K. y POULSEN H.E. (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J. Toxicol. Environ. Health* **40**: 391-404.
- LÓPEZ-TORRES M., PÉREZ-CAMPO R., CADENAS S., ROJAS C. y BARJA G. (1993a) A comparative study of free radicals in vertebrates. II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**: 757-763.

- LÓPEZ-TORRES M., PÉREZ-CAMPO R., ROJAS C., CADENAS S. y BARJA G. (1993b) Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. *Free Rad. Biol. Med.* **15**: 133-142.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MAELLARO E., DEL BELLO B., SUGHERINI L., SANTUCCI A., COMPORITI M. y CASINI A.F. (1994) Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Biochem. J.* **301**: 471-476.
- MAIER M., PILL J., VOLKL A. y FAHIMI H.D. (1992) Co-cultures of rat and guinea pig hepatocytes used for the study of species-differences in the proliferation of peroxisomes I. Distinction between hepatocyte subpopulations by catalase cytochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* **25**: 39-44.
- MAKINO S. y KATAGIRI K. (1980) Osteogenic disorder rat. *Exp. Anim. (Japan)* **29**: 374-375.
- MARMUR J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- MÅRTENSSON J. y MEISTER A. (1991) Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4656-4660.
- MÅRTENSSON J. y MEISTER A. (1992) Glutathione deficiency increases hepatic ascorbic acid synthesis in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11566-11568.
- MÅRTENSSON J., HAN J., GRIFFITH O.W. y MEISTER A. (1993) Glutathione ester delays the onset of scurvy in ascorbate-deficient guinea pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 317-321.

- MÅRTENSSON J., JAIN A., STOLE E., FRAYER W., AULD A.M. y MEISTER A. (1991) Inhibition of glutathione synthesis in the new born rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9360-9364.
- MAYNE S.T., JANERICH D.T., GREENWALD P. (1994) Dietary beta carotene and lung cancer risk in U.S. non-smokers. *JNCI* **86**: 33-38.
- McCAY P.B. (1985) Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Ann. Rev. Nutr.* **5**: 323-340.
- McCORD J.M. (1985) Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.* **312**: 159-163.
- McCORD J.M. y FRIDOVICH I. (1968) The reduction of cytochrome *c* by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **243**: 5753-5760.
- McCORD J.M. y FRIDOVICH I. (1969) Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- McGIRR L.G., HADLEY M. y DRAPER H.H. (1985) Identification of N- α -acetyl-(2-propenal)lysine as a urinary metabolite of malondialdehyde. *J. Biol. Chem.* **260**: 15427-15431.
- McGOVERN V.J. (1982) The pathophysiology of Gram-negative septicaemia. *Pathol.* **4**: 265-270.
- MEISTER A. (1994a) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* **269**: 9397-9400.
- MEISTER A. (1994b) Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* **54**: 1969S-1975S.

- MELIN A., CARBONNEAU M.A., THOMAS M.J., PERROMAT A. y CLERC M. (1995) Dietary vitamins A and E affect differently lipid peroxidation in rat heart and testis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **18**: 19-33.
- MEYDANI S.N., BARKLUND M.P., LIU S., MEYDANI M., MILLER R.A., CANNON J.G., MORROW F.D., ROCKLIN R. y BLUMBERG J.B. (1990) Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **52**: 557-563.
- MEYDANI S.N., MEYDANI M., RALL L.C., MORROW F. y BLUMBERG J.F. (1994) Assessment of the safety of high-dose, short-term supplementation with vitamin E in healthy older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**: 704-709.
- MILLIGAN S.A., HOEFFEL J.M., GOLDSTEIN I.M. y FLICK M.R. (1988) Effect of catalase on endotoxin-induced acute lung injury in unanesthetized sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**: 420-428.
- MINOTTI G. y AUST S.D. (1987) The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* **44**: 191-208.
- MIYAZAWA T. (1989) Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. *Free Radical Biol. Med.* **7**: 209-217.
- MIYAZAWA T., ANDO T. y KANEDA T. (1986) Effect of dietary vitamin C and vitamin E on tissue lipid peroxidation of guinea pigs fed with oxidized oil. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 71-78.
- MIYAZAWA T., FUJIMOTO K., SUZUKI T. y YASUDA K. (1994) Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. En: *Methods in Enzymology* (Packer L. ed.), Academic Press, New York, **233**: 324-332.

- MIYAZAWA T., SUZUKI T., FUJIMOTO K. y KANEDA T. (1990) Phospholipid hydroperoxide accumulation in liver of rats intoxicated with carbon tetrachloride and its inhibition by dietary α -tocopherol. *J. Biochem.* **107**: 689-693.
- MIZUSHIMA Y., HARAUCHI T., YOSHIZAKI T. y MAKINO S. (1984) A rat mutant unable to synthesize vitamin C. *Experientia* **40**: 359-361.
- MORI T., KITAMURA R., IMAOKA S., FUNAE Y., KITADA M. y KAMATAKI T. (1992) Examination for lipid peroxidation in liver microsomes of guinea pigs as a causal factor in the decrease in the content of cytochrome P-450 due to ascorbic acid deficiency. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **75**: 209-219.
- MUKAI K., SAWADA K., KOHNO Y. y TERAJO J. (1993) Kinetic study of the prooxidant effect of tocopherol. Hydrogen abstraction from lipid hydroperoxides by tocopheroxyls in solution. *Lipids* **28**: 747-752.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978) *Nutrient requirements of laboratory animals.* Natl. Acad. Sci., Washington DC.
- NELSON G.J., MORRIS V.C., SCHMIDT P.C. y LEVANDER O. (1993) The urinary excretion of thiobarbituric acid reactive substances and malondialdehyde by normal adult male after consuming a diet containing salmon. *Lipids* **28**: 757-761.
- NIKI E. (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* **44**: 227-253.
- NIKI E. (1991) Vitamin C as an antioxidant. *World Rev. Nutr. Diet* **64**: 1-30.
- NIKI E., KAWAKAMI A., YAMAMOTO Y. y KAMIYA Y. (1985) Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **58**: 1971-1975.

- NISHIKIMI M., KOSHIZAWA T., KONDO K., OZAWA T. y YAGI K. (1989) Expression of the mutant gene for L-gulono- γ -lactone oxidase in scurvy-prone rats. *Experientia* **45**: 126-129.
- NISHIKIMI M., KOSHIZAKA T., OZAWA T. y YAGI K. (1988) Occurrence in humans and guinea pigs of the gene related to their missing enzyme L-gulonolactone oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **267**: 842-846.
- NISHIKIMI M. y YAGI K. (1996) Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. En: *Subcellular Biochemistry* Vol. 25, Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology (Harris J.R. ed.), Plenum Press, pp. 17-39.
- NOHL H. (1993) Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann. Biol. Clin.* **52**: 199-204.
- NOHL H. y HEGNER D. (1978) Do mitochondria produce oxygen radicals *in vivo*? *Europ. J. Biochem.* **82**: 563-567.
- NOLAN J.P. (1981) Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury. *Hepatology* **1**: 458-465.
- NORTH J.A., SPECTOR A.A. y BUETTNER G.R. (1994) Cell fatty acid composition affects free radical formation during lipid peroxidation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **36**: C117-C188.
- O'BRIEN P.J. (1978) Hydroperoxides and superoxides in microsomal oxidations. *Pharmacol. Ther. A* **2**: 517-536.
- O'CONNOR H.J., HABIBZEDAH N., SCHORAH C.J., AXON A.T.R., RILEY S.E. y GARNER R.C. (1985) Effect of increased intake of vitamin C on the mutagenic activity of gastric juice and intragastric concentrations of ascorbic acid. *Carcinogenesis* **6**: 1675-1676.

- OGILVE A.C., GROENEVELD A.B.J., STRAUB J.P. y THIJS L.G. (1991) *Intens. Care Med.* **17**: 40-44.
- OHTAKE T. y OGAWA R. (1984) Reduction of hepatic glutathione concentration in endotoxemic rats. *Jpn. J. Anesthesiol.* **33**: 444-452.
- OKAWA H., OSHINI N. y YAGI K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-358.
- OKAYASU T., KAMEDA K., ONO T. y IMAI Y. (1977) Effects of dietary vitamin B2 and vitamin E on the delta-9 desaturase and catalase activities in the rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **489**: 397-402.
- OLIVER C.N., LEVINE R.L. y STADTMAN E.R. (1981) Regulation of glutamine synthetase degradation. En: *Metabolic Interconversion of Enzymes* (Holzer H. ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 259-268.
- OLSON N.C., ANDERSON D.L. y GRIZZLE M.K. (1987) Dimethylthiourea attenuates endotoxin-induced acute respiratory failure in pigs. *J. Appl. Physiol.* **63**: 2426-2432.
- OUCHI K., TANABE J., TOMINAGA T., ITO K., SAITO S. y MATSUNO S. (1993) Altered energy metabolism and oxidative injury following endotoxemia in rats with normal or cirrhotic livers. *Res. Exp. Med.* **193**: 81-88.
- OZAWA T. (1995) Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exp. Gerontol.* **30**: 269-290.
- PACKER J.E., SLATER T.F. y WILLSON R.L. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278**: 737-738.
- PALAMANDA J.R. y KEHRER J.P. (1992) Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**: 103-109.

- PALAMANDA J.R. y KEHRER J.P. (1993) Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione. *Lipids* **28**: 427-431.
- PALOZZA P. y KRINSKY N.I. (1992) β -Carotene and α -topherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**: 184-187.
- PARK J.W. y FLOYD R.A. (1992) Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Rad. Biol. Med.* **12**: 245-250.
- PÉREZ-CAMPO R., LÓPEZ-TORRES M., PATÓN D., SEQUEROS E. y BARJA DE QUIROGA G. (1990) Lung antioxidant enzymes, peroxidation, glutathione system and oxygen consumption in catalase inactivated young and old *Rana perezi* frogs. *Mech. Ageing Dev.* **56**: 281-292.
- PIKUL J., LESZCZYNSKY D.E. y KUMMEROW F.A. (1983) Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **31**: 1338-1342.
- PILARO A.M. y LASKIN D.L. (1986) Accumulation of activated mononuclear phagocytes in the liver following lipopolysaccharide treatment rats. *J. Leukocyte Biol.* **40**: 29-41.
- PLAA G.L. y WITSON H. (1976) Chemical drugs and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **16**: 125-141.
- PORTOLÉS M.T., AINAGA M.J. y PAGANI R. (1993) The induction of lipid peroxidation by *E. coli* lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage. *Biochim. Biophys. Acta* **1158**: 287-292.
- PORTOLÉS M.T., ARAHUETES R.M. y PAGANI R. (1994) Intracellular calcium alterations and free radical formation evaluated by flow cytometry in endotoxin-treated rat liver Kupffer and endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* **65**: 200-205.

- PORTOLÉS M.T., PAGANI R., DÍAZ-LAVIADA I. y MUNICIO A.M. (1987) Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on the microviscosity of liver plasma membranes and hepatocytes suspensions and monolayers. *Cell Biochem. Function* **5**: 55-61.
- PRYOR W.A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* **48**: 657-667.
- RABEY J.M. y HEFTI F. (1990) Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* **2**: 1-14.
- RAMOTAR D. y DEMPLE B. (1993) Enzymes that repair oxidative damage to DNA. En: *DNA and Free Radicals* (Halliwell B. y Aruoma O.I. eds.), Ellis Horwood Ltd., pp. 165-191.
- RATTAN S.I.S., SIBOSKA G.E., WIKMAR F.P., CLARK B.F.C. y WOOLLEY P. (1995) Levels of oxidative DNA damage product 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human serum increase with age. *Med. Sci. Res.* **23**: 469-470.
- RAVANAT J.L., TURESKY R.J., GREMAND E., TRUDEL L.J. y STADLER R.H. (1995) Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem. Res. Toxicol.* **8**: 1039-1045.
- RICHARD M.J., PORTAL B., MEO J., COUDRAY CH., HADJIAN A. y FAVIER A. (1992) Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin. Chem.* **38**: 704-709.
- RICHTER C. (1987) Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* **44**: 175-189.
- RICHTER C., PARK J.M. y AMES B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6465-6467.

- RIFICI V.A. y KHACHADURIAN A.K. (1993) Dietary supplementation with vitamins C and E inhibits *in vitro* oxidation of lipoproteins. *J. Am. Coll. Nutr.* **12**: 631-637.
- RIMM E.B., STAMPFER M.J., ASCHERIO A., GIOVANNUCCI E., COLDITZ G.A. y WILLET W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men *N. Engl. J. Med.* **328**: 1450-1456.
- RISCO C., CARRASCOSA J.L. y BOSCH A. (1991) Uptake and subcellular distribution of *Escherichia coli* lipopolysaccharide by isolated rat type II pneumocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 607-615.
- RISCO C., CARRASCOSA J.L. y BOSCH A. (1993) Visualization of lipopolysaccharide aggregates by freeze-fracture and negative staining. *J. Electron. Microsc.* **42**: 202-204.
- ROBERTSON J., DONNER A.P. y TREVITHICK J.R. (1989) Vitamin E intake and risk of cataracts in humans. En: *Vitamin E Biochemistry and Health Implications* (Diplock A.T., Machlin L., Packer L. y Pryor W.A. eds.), *Ann. N.Y. Acad. Sci. Vitaminol.* **570**: 372-382.
- ROSE R.C. y BODE A.M. (1993) Biology of free radical scavenger: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* **7**: 1135-1142.
- ROSEMAN J.E. y LEVINE R.L. (1987) Purification of a protease from *Escherichia coli* with specificity for oxidized glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **262**: 2101-2110.
- ROSENBERG I.H. (1994) Keys to a longer, healthier, more vital life. *Nutr. Rev.* **52**: S50-S52.
- RUSHMORE T.H., MORTON M.R. y PICKETT C.B. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* **266**: 11632-11639.

- SACHETTA P., DI COLA D. y FEDERICI G. (1986) Alkaline hydrolysis of *N*-ethylmaleimide allows a rapid assay of glutathione disulfide in biological samples. *Anal. Biochem.* **154**: 205-208.
- SAITO M. y YAMAGUCHI M. (1988) Influence of excessive ascorbic acid dose on liver microsomal mixed function oxydase system in guinea pigs. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **4**: 123-137.
- SAKAGUCHI S., KANDA N., HSU C. y SAKAGUCHI O. (1991) Lipid peroxide formation and membrane damage in endotoxemia poisoned mice. *Microbiol. Immunol.* **25**: 229-244.
- SALONEN J.T., SALONEN R., LAPPETELÄINEN R., MÄENPÄÄ P.H., ALFTHAN G., PUSKA P. (1985) Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamins A and E: matched case-control analysis of prospective data. *Brit. Med. J.* **290**: 417-420.
- SAMUELSSON B., DAHLEN S.E., LINDGREN J.A., ROUCER C.A. y SERHAN C.N. (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science* **237**: 1171-1176.
- SAUL R.L., GEE P. y AMES B.N. (1987) Free radicals, DNA damage, and aging. En: *Modern Biological Theories of Aging* (Warner H.R. ed.), Raven Press, New York, pp. 113-129.
- SAWYER M.A.J., MIKE J.J. y CHAVIN K. (1989) Antioxidant therapy and survival in ARDS. *Crit. Care Med.* **17**: S153.
- SCARPA M., RIGO A., MAIORINO M., URSINI F. y GREGOLIN C. (1984) Formation of α -tocopherol radical and recycling of α -tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. An electron spin resonance study. *Biochim. Biophys. Acta* **801**: 215-219.

- SCHIMKE I., SCHIMKE E., PAPIES B. y MORITZ V. (1987) Importance of the antioxidative potential for free radical induced heart damage. *Biomed. Biochim. Acta* **46**: 576-579.
- SCOTT J.A. y RABITO C.A. (1988) Oxygen radicals and plasma membrane potential. *Free Rad. Biol. Med.* **5**: 237-246.
- SEEKAMP A., LALONDE C., ZHU D. y DEMLING R. (1988) Catalase prevents prostanoid release and lung lipid peroxidation after endotoxemia in sheep. *J. Appl. Physiol.* **65**: 1210-1216.
- SENZEL A., REYNOLDS H. y PARK D.L. (1975) Peroxide value-Official final action. En: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Horwitz W. ed.), Association of official analytical chemists, Washington, DC, 12th ed., pp. 489.
- SEVANIAN A. y HOCHSTEIN P. (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* **5**: 365-390.
- SEVANIAN A., DAVIES K.J.A. y HOCHSTEIN P. (1991) Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 1129S-1134S.
- SEVANIAN A., MUAKKASSAH-KELLY S.F. y MONTESTRUQUE S. (1983) The influence of phospholipase A₂ and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* **223**: 441-452.
- SEVANIAN A., NORDENBRAND K., KIM E., ERNSTER L. y HOCHSTEIN P. (1990) Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Rad. Biol. Med.* **8**: 145-152.
- SHIBATA A., PAGANINI-HILL A., ROSS R.K. y HENDERSON B.E. (1992) Intake of vegetables, fruits, beta-carotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: A prospective study. *Br. J. Cancer.* **66**: 673-679.

- SHIBAYAMA Y. (1992) Role of lipid peroxidation in enhancement of endotoxin hepatotoxicity. *Exp. Toxic. Pathol.* **44**: 205-208.
- SHIBAYAMA Y. y NAKATA K. (1993) Effect of exogenous antioxidant enzymes and antioxidants on the development of endotoxin-induced hepatocellular necrosis in rats. *Exp. Toxic. Pathol.* **45**: 337-340.
- SHIBAYAMA Y., URANO T., ASAKA S. y NAKATA K. (1994) Failure of protection against endotoxin hepatotoxicity by selenium. *Exp. Toxic. Pathol.* **46**: 101-103.
- SHIBUTANI S., TAKESHITA M. y GROLLMAN A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**: 431-434.
- SHIGENAGA M.K. y AMES B.N. (1991) Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Rad. Biol. Med.* **10**: 211-216.
- SHIGENAGA M.K., GIMENO C.J. y AMES B.N. (1989) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9697-9701.
- SHIMOTORI N., EMERSON G.A. y EVANS H.M. (1939) Role of vitamin E in the prevention of muscular dystrophy in guinea pigs reared on synthetic rations. *Science* **90**: 89.
- SHVINKA J.G., TOMA M.K., GALININA N.I., SKARDS I.V. y VIESTURS U.E. (1979) Production of superoxide radicals during bacterial respiration. *J. Gen. Microbiol.* **113**: 377-382.
- SIEGEL J.H., CERRA F.B., BORDER J.R., COLEMAN B. y McMENAMY R.H. (1982) Human response to sepsis: a physiologic manifestation of disordered metabolic control. En: *Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemia* (Cowley R.A. y Trump B.F. eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, London, pp. 235-253.

- SIES H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. En: *Oxidative Stress* (Sies H. ed.), Academic Press, New York, pp. 1-8.
- SIES H. y MURPHY M.E. (1991) Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J. Photochem. Photobiol.* **8B**: 211-224.
- SIES H., BARTOLI G.M., BURK R.F. y WAYDHAS C. (1978) Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations and in selenium deficiency. *Europ. J. Biochem.* **89**: 113-118.
- SIES H., STAHL W. y SUNDQUIST A.R. (1992) Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **669**: 7-20.
- SIMIC M.G. (1992) The rate of DNA damage and aging. En: *Free Radicals and Aging* (Emerit I. y Chance B. eds.), Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 20-30.
- SIMON J.A. (1992) Vitamin C and cardiovascular disease: A review. *J. Am. Coll. Nutr.* **11**: 107-125.
- SINCLAIR A.J., LUNEC J., GIRLING A.J. y BARNETT H. (1992) Modulators of free radical activity in diabetes mellitus: Role of ascorbic acid En: *Free Radicals and Aging* (Emerit I. y Chance B. eds), Birkhäuser, Basel, pp. 342-352.
- SLATTERY M.L., ABBOTT T.M., OVERALL J.C., ROBISON L.M., FRENCH T.K., JOLLES C., GARDNER J.W. y WEST D.W. (1990) Dietary vitamins A, C and E and selenium as risk factors for cervical cancer. *Epidemiology* **1**: 8-15.
- SOHAL R.S., AGARWAL S., DUBEY A. y ORR W.C. (1993) Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7255-7259.

- SOHAL R.S., FARMER K.J., ALLEN R.G. y RAGLAND S.S. (1984) Effects of diethyldithiocarbamate on life span, metabolic rate, superoxide dismutase, catalase, inorganic peroxides and glutathione in the adult male housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* **24**: 175-183.
- SOUTHORN P. (1988) Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Mayo Clin. Proc.* **63**: 381-389.
- SOUTHORN P.A. y POWIS G. (1988) Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease. *Mayo Clin. Proc.* **63**: 390-408.
- STADTMAN E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* **9**: 315-325.
- STADTMAN E.R. (1991) Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 1125S-8S.
- STADTMAN E.R., STARKE-REED P.E., OLIVER C.N., CARNEY J.M. y FLOYD R. A. (1992) Protein modification in aging. En: *Free Radicals and Aging* (Emerit I. y Chance B. eds.), Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 64-72.
- STÄHELIN H.B., RÖSEL F., BUESS E., BRUBACHER G. (1984) Cancer, vitamins and plasma lipids: prospective Basel study. *J. Natl. Canc. Inst.* **73**: 1462-1468.
- STAMPFER M.J., HENNEKENS C.H., MANSON J.E., COLDITZ G.A., ROSNER B. y WILLET W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N. Engl. J. Med.* **328**: 1444-1449.
- STARK J.M., JACKSON S.K., ROWLANDS C.C. y EVANS J.C. (1988) En: *Free Radicals Methodology and Concepts* (Evans C.R. y Halliwell B. eds.), Richelieu Press, London, pp. 201-209.

- STARKE P.E. y FARBER J.L. (1985) Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**: 86-92.
- STARKE-REED P.E. y OLIVER C.N. (1989) Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 559-567.
- STEENKEN S. (1989) Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chem. Rev.* **89**: 503-520.
- STEINBRECHER U.P., ZANG H. y LOUGHEED M. (1990) Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* **9**: 155-168.
- STORZ G., TARTAGLIA L.A. y AMES B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194.
- SUTPHIN M.S. y BUCKMAN T.D. (1991) Effects of low selenium diets on antioxidant status and MPTP toxicity in mice. *Neurochem. Res.* **16**: 1257-1263.
- SUTTON H.C. y WINTERBOURN C.C. (1989) On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Rad. Biol. Med.* **6**: 53-60.
- TAKAGI A., SAI K., UMEMURA T., HASEGAWA R. y KUROKAWA Y. (1995) Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. *Cancer Lett.* **91**: 139-144.
- TAKAHASHI O. (1995) Haemorrhagic toxicity of a large dose of α -, β -, Γ - and σ -tocopherols, ubiquinone, β -carotene, retinol acetate and l-ascorbic acid in the rat. *Fd. Chem. Toxic.* **33**: 121-128.

- TAKAMATSU S., TAKAMATSU M., SATOH K., IMAIZUMI T., YOSHIDA H., HIRAMOTO M., KOYAMA M., OHGUSHI Y. y MIZUNO S. (1995) Effects on health of dietary supplementation with 100 mg *d*- α -tocopheryl acetate, daily for 6 years. *J. Intl. Med. Res.* **23**: 342-357.
- TAPPEL A.L. (1968) Will antioxidant nutrients slow aging processes? *Geriatrics* **23**: 97-105.
- TATE R.M. y REPINE J.E. (1984) Phagocytes, oxygen radicals, and lung injury. En: *Free Radicals in Biology* (Pryor W.A. ed.), Acad. Press, Florida, pp. 199-207.
- TATUM V.L., CANGCHIT C. y CHOW C.K. (1990) Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids* **25**: 226-229.
- TAYLOR A. (1992) Effect of photooxidation on the eye lens and role of nutrients in delaying cataract. En: *Free Radicals and Aging* (Emerit I. y Chance B. eds.), Birkhäuser, Basel, pp. 266-279.
- TAYLOR A., JACQUES P.F., NADLER D., MORROW F., SULSKY S.I. y SHEPARD D. (1991) Relationship in humans between ascorbic acid consumption and levels of total and reduced ascorbic acid in lens, aqueous humor, and plasma. *Curr. Eye Res.* **10**: 751-759.
- THE α -TOCOPHEROL, β -CAROTENE CANCER PREVENTION STUDY GROUP (1994) The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1029-1035.
- THERASSE J. y LEMMONIER F. (1987) Determination of plasma lipoperoxides by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **413**: 237-241.
- THOMPSON K.H. y LEE M. (1993) Effects of manganese and vitamin E deficiencies on antioxidant enzymes in streptozotocin-diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* **4**: 476-481.

- TIETZE F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**: 502-522.
- THIDUS P. y HOUSTON M.E. (1993) Antioxidants and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training. *Med. Sci. Sports Exercise* **26**: 354-359.
- TOYOKUNI S. y SAGRIPANTI J.L. (1992) Iron-mediated DNA damage: sensitive detection of DNA strand breakage catalyzed by iron. *J. Inorg. Biochem.* **47**: 241-248.
- TRABER D.L. (1985) Pulmonary microvascular dysfunction during shock. En: *Circulatory Shock: Basic and Clinical Implications* (Janssen E.F. y Barnes C.D. eds.), Academic Press, New York, pp. 28-36.
- TURNBOUGH L.L. y SWITZER R.L. (1975) Oxygen-dependent inactivation of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amido transferase *in vitro*: Model for *in vivo* inactivation. *J. Bacteriol.* **121**: 115-120.
- TURRENS J.F., FREEMAN B.A. y CRAPO J.A. (1982) Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**: 411-421.
- TYLER D. (1992) En: *The Mitochondrion in Health and Disease* (VCH Publishers), New York, pp. 172, 173, 253.
- UCHIYAMA M. y MIHARA M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**: 271-278.
- UEDA T. e IGARASHI O. (1990) Distribution and accumulation of α -tocoferol in tissues of rats given excess dose of dietary D- α -tocoferol. *Nippon Etyo Shokuryo Gakkaishi* **43**: 335-343.

- URSINI F., MAIORINO M., VALENTE M., FERRI L. y GREGOLIN C. (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* **710**: 197-211.
- VATASSERY G.T., BRIN M.F., FAHN S., KAYDEN H.J. y TRABER M.G. (1988) Effect of high doses of dietary vitamin E on the concentrations of vitamin E in several brain regions, plasma, liver, and adipose tissue of rats. *J. Neurochem.* **51**: 621-623.
- VERLANGIERI A.J. y BUSH M.J. (1992) Effects of d- α -tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. *J. Am. Coll. Nutr.* **11**: 131-138.
- VILLALBA J.M., CÓRDOBA F. y NAVAS P. (1996) Ascorbate and the plasma membrane a new view of cell growth control. En: *Subcellular Biochemistry* Vol. 25, Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology (Harris J.R. ed.), Plenum Press, pp. 57-81.
- VITORICA J., MACHADO A. y SATRUSTEGUI J. (1984) Age-dependent variations in peroxide-utilizing enzymes from rat brain mitochondria and cytoplasm. *J. Neurochem.* **42**: 351-356.
- WALD N.J., BOREHAM H., HAYWARD J.L. y BULBROOK R.D. (1984) Plasma retinol, beta-carotene and vitamin E levels in relation to the future risk of breast cancer. *Br. J. Cancer* **49**: 321-324.
- WANG H.P. y KIMURA T. (1976) Ferrous ion-mediated cytochrome P450 degradation and lipid peroxidation in adrenal cortex mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **423**: 374-381.
- WARD P., WARREN J.S. y JOHNSON K.J. (1988) Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* **5**: 403-408.

- WEIL M.H., MAC-LEAN L.D., VISSCHER M.B. y SPINK W.W. (1956) Studies on circulatory changes in the dog produced by endotoxin from gram-negative microorganisms. *J. Clin. Invest.* **35**: 1191-1198.
- WEISS S.J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* **320**: 365-376.
- WELCH R.W., BERGSTEN P., BUTLER J.B. y LEVINE M. (1993) Ascorbic acid accumulation and transport in human fibroblasts. *Biochem. J.* **294**: 505-510.
- WELLS W.W. y XU D.P. (1994) Dehydroascorbate reduction. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 369-377.
- WESTPHAL O., LÜDERITZ O., GALANOS C., MAYER H. y RIETSCHEL E.T. (1986) En: *Adv. Immunopharmacol.* (Chedid L., Hadden J.W., Ipreafico F., Dukor P. y Willoghby D. eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 13-34.
- WILLIAMS D.E., CARPENTER H.M., BUHLER D.R., KELLY J.D. y DUTCHUCK M. (1992) Alterations in lipid peroxidation, antioxidant enzymes and carcinogen metabolism in liver microsomes of vitamin E-deficient trout and rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **116**: 78-84.
- WOLF A., BROADHURST M., TSCHOPP M. y SINGER T. (1993) Protection against lipid peroxidation by vitamin E-acetate is higher in liver than in kidney. *Dev. Oncol.* **71**: 119-123.
- WONG L., HO S.C., COGGON D., CRUDDAS A.M., HWANG C.H., HO C.P., ROBERTSHAW A.M. y McDONALD D.M. (1993) Sunlight exposure, antioxidant status, and cataract in Hong Kong fishermen. *J. Epidemiol. Comm. Health* **47**: 46-49.
- WONG S., KNIGHT J., HOPFER S., ZAHARIA O., LEACH C.N. y SUNDERMAN F.W. (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* **33**: 214-220.

- YAGI K. (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**: 212-216.
- YAGI K., MATSUOKA S. y LINNANE A.W. (1981) Plasma lipid peroxide levels in an urbanized micronesian population-Nauru. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **27**: 425-428.
- YAMAMOTO K., VÖLKL A., HASHIMOTO T. y FAHIMI H.D. (1988) Catalase in guinea pig hepatocytes is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes. *Eur. J. Cell. Biol.* **46**: 129-135.
- YIN D. (1995) Appropriate excitation/emission wavelengths for fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances. *Clin. Chem.* **41**: 329-330.
- YOSHIKAWA T. (1990) Oxy radicals in endotoxin shock. *Methods Enzymol.* **186**: 660-665.
- YOSHIKAWA Y., MIKI T., OKAMATSU H., FUKUI F. y TAKAI Y. (1991) Effects of vitamin E-enriched egg yolk on lipid peroxidation, hemolysis and serum lipid concentration in young and old rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **37**: 213-227.
- YOUNGMAN L.D., PARK J-Y.K. y AMES B.N. (1992) Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9112-9116.
- YUSA T., BECKMAN J.S., CRAPO J.D. y FREEMAN B.A. (1987) Hyperoxia increases H₂O₂ production by brain *in vivo*. *J. Appl. Physiol.* **63**: 353-358.
- ZHANG H., SPAPEN H., NGUYEN D.N., BENLABED M., BUURMAN W.A. y VINCENT J.L. (1994) Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am. J. Physiol.* **266**: H1746-H1754.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Free Rad. Biol. Med. **17**: 105-115 (1994)

Free Rad. Res. **21**: 109-118 (1994)

J. Nutr. Sci. Vitaminol. **40**: 411-420 (1994)

Int. J. Biochem. Cell. Biol. **27**: 1175-1181 (1995)

Free Rad. Res. **4**: 485-493 (1996)

Free Rad. Biol. Med. (en prensa)

Pharmacology & Toxicology (en prensa)