

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de doctorado 030 E: Bioquímica Clínico-Médica e
Inmunología.



EFECTO DEL ZUMO DE MANDARINA SOBRE EL
ESTRÉS OXIDATIVO: ESTUDIO EXPERIMENTAL
Y EN PATOLOGÍAS MEDIADAS POR RADICALES
LIBRES

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
ANA BELÉN LÓPEZ JAÉN

Dirigida por:
Dra. D.^a Pilar Codoñer Franch
Dra. D.^a Victoria Valls Bellés

Tutor:
Dr. D. Guillermo Sáez Tormo

Valencia, 2014

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de doctorado 030 E: Bioquímica Clínico-Médica e
Inmunología. 2ª edición



**EFECTO DEL ZUMO DE MANDARINA SOBRE EL
ESTRÉS OXIDATIVO: ESTUDIO EXPERIMENTAL
Y EN PATOLOGÍAS MEDIADAS POR RADICALES
LIBRES**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por:

Dra. D.^a Pilar Codoñer Franch

Dra. D.^a Victoria Valls Bellés

Tutor:

Dr. D. Guillermo Sáez Tormo

Presentada por:

ANA BELÉN LÓPEZ JAÉN

Valencia, 2014

Dra. Pilar Codoñer Franch, Doctora en Medicina y Cirugía y Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dra. Victoria Valls Bellés, Doctora en Ciencias Biológicas y Técnico de Investigación del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

INFORMAN: que D.^a Ana Belén López Jaén, licenciada en Farmacia y Bioquímica por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia el presente trabajo titulado “**Efecto del zumo de mandarina sobre el estrés oxidativo: estudio experimental y en patologías mediadas por radicales libres**” y autorizan su presentación como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman el presente informe:

Fdo. Dra. Pilar Codoñer Franch

Fdo. Dra. Victoria Valls Bellés

Dr. Guillermo Sáez Tormo, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y como tutor.

INFORMA: que D.^a Ana Belén López Jaén ha realizado bajo la dirección de la Dra. Pilar Codoñer Franch y Dra. Victoria Valls Bellés, el presente trabajo titulado **“Efecto del zumo de mandarina sobre el estrés oxidativo: estudio experimental y en patologías mediadas por radicales libres”** que presenta como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, expide y firma el presente informe:

Fdo. Dr. Guillermo Sáez Tormo

El presente trabajo ha sido subvencionado por la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación (Programa Agroalimed) de la Generalitat Valenciana.

A mis padres, los pilares de mi vida

A Jorge, por ser mi vida

AGRADECIMIENTOS

Durante los años en los que se ha elaborado esta Tesis Doctoral, me he encontrado con excepcionales personas que han sido un gran apoyo y quisiera expresarles todo mi agradecimiento.

A mis directoras de tesis, la Dra. Pilar Codoñer Franch, por su apoyo y confianza en mí para la realización de este trabajo, y a la Dra. Victoria Valls Bellés, por haberme guiado en el mundo de la investigación, por su paciencia y dedicación en este camino. Gracias por vuestro cariño y amistad.

A mi tutor de tesis, al Dr. Guillermo Sáez Tormo, por hacer posible este trabajo.

A mis compañeros de Pediatría, Simón, Laura y María, por su especial amistad y colaboración incondicional, que nunca olvidaré.

A Rosa y Elvira, por su apoyo, cariño, amistad, colaboración y, en definitiva, por todo.

A Begoña, Pilar, Paco, Silvia, Patricia, Isa y Ángela, por su compañía, amistad y ayuda en los largos días en el laboratorio.

A Sandra, Concha y Rosa, con quienes he compartido mis estancias en los congresos, que no olvidaré jamás.

A la Dra. Eulalia Alonso Iglesias por todos los buenos momentos compartidos, por sus innumerables consejos y, en fin, por introducirme en la investigación.

Al Dr. Miguel Ángel García Pérez, por su ayuda desinteresada siempre que la he necesitado.

A las amigas de siempre, en especial a Sara, por ser más que una amiga.

A mi familia, especialmente a mis padres, Miguel y Enri, por su apoyo, su comprensión, su paciencia, su confianza, su amor y por enseñarme los valores de la vida: gracias por ser maravillosos, porque sin vosotros no hubiera sido posible este largo camino. Y, cómo no, a mi hermana Laura, por estar siempre a mi lado.

Finalmente, a Jorge, por todo. Porque sin ti, nada tendría sentido.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. RADICALES LIBRES.....	3
I.1.1. Concepto de radical libre.....	3
I.1.2. Principales radicales libres.....	5
I.1.3. Fuentes de radicales libres.....	11
I.1.3.1. Fuentes endógenas.....	11
I.1.3.2. Fuentes exógenas.....	17
I.2. DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS.....	21
I.2.1. Daño oxidativo a lípidos.....	21
I.2.2. Daño oxidativo a proteínas.....	23
I.2.3. Daño oxidativo al ADN.....	24
I.2.4. Daño oxidativo a hidratos de carbono.....	28
I.2.5. Daño oxidativo al colesterol.....	29
I.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	30
I.3.1. Concepto de estrés oxidativo y de antioxidante.....	30
I.3.2. Sistemas de defensa antioxidante.....	31
I.3.2.1. Antioxidantes enzimáticos.....	33
I.3.2.2. Antioxidantes no enzimáticos o “scavengers” de radicales libres.....	37
I.4. TAMOXIFENO.....	55
I.4.1. Metabolismo del tamoxifeno.....	57
I.4.2. Toxicidad del tamoxifeno.....	58

I.5. PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS RELACIONADOS CON LOS RADICALES LIBRES.....	63
I.5.1. Patología cardiovascular y estrés oxidativo: infancia y adolescencia.....	63
I.5.1.1. Hipótesis de la aterosclerosis.....	64
I.5.1.2. Hipercolesterolemia y aterosclerosis.....	66
I.5.2. Obesidad y estrés oxidativo: infancia y adolescencia.....	67
I.5.2.1. Prevalencia de la obesidad en España.....	71
I.5.2.2. Definición de obesidad.....	71
I.5.2.3. Tratamiento dietético de la obesidad.....	72
I.6. CONSECUENCIAS A LARGO PLAZO DE LA NUTRICIÓN EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA.....	74
I.7. IMPORTANCIA DE LA DIETA EN LA SALUD.....	77
I.8. ZUMO DE MANDARINA.....	85
I.8.1. Mandarina.....	85
I.8.1.1. Variedades de mandarina.....	85
I.8.1.2. Composición de la mandarina.....	87
I.8.1.3. Propiedades de la mandarina.....	88

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS...	93
II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	95
II.2. OBJETIVOS.....	96
III. MATERIAL.....	99
III.1. REACTIVOS.....	101
III.2. APARATOS.....	102
III.3. ZUMO DE MANDARINA.....	104
III.4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	106
III.5. ESTUDIO EN HUMANOS.....	106
III.5.1. Niños con hiperlipemia.....	106
III.5.1.1. Pacientes.....	106
III.5.1.2. Valoración dietética.....	107
III.5.1.3. Suplementación dietética.....	108
III.5.2. Niños con obesidad.....	108
III.5.2.1. Pacientes.....	108
III.5.2.2. Intervención dietética.....	109
III.5.2.3. Suplementación dietética.....	110

IV. MÉTODOS.....	111
IV.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	113
IV.1.1. Estudio en animales de experimentación.....	113
IV.1.1.1. Homogenización del hígado y obtención de aislado de mitocondrias.....	113
IV.1.2. Estudio en humanos.....	114
IV.2. ENSAYOS EN ZUMO DE MANDARINA Y EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DE HUMANOS.....	115
IV.2.1. Determinación del ABTS en zumo de mandarina y en plasma.....	115
IV.2.2. Determinación del FRAP en zumo de mandarina y en plasma.....	116
IV.2.3. Determinación del DPPH en plasma.....	116
IV.2.4. Determinación de la actividad estabilizadora del radical hidroxilo en el zumo de mandarina.....	117
IV.2.5. Determinación de la capacidad estabilizadora del radical superóxido en el zumo de mandarina.....	117
IV.2.6. Determinación de antioxidantes totales en plasma tras la ingesta de zumo de mandarina.....	118
IV.2.7. Determinación de carotenoides en plasma.....	118
IV.2.8. Determinación de la alanina aminotransferasa en plasma.....	119

IV.2.9. Determinación de la aspartato aminotransferasa en plasma.....	120
IV.2.10. Determinación del malondialdehído en suero y en homogenado de hígado total.....	121
IV.2.11. Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas.....	121
IV.2.12. Extracción y digestión del ADN de tejidos.....	122
IV.2.13. Determinación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en el ADN.....	123
IV.2.14. Tratamiento de la sangre para la determinación del glutatión reducido y hemoglobina.....	124
IV.2.15. Determinación de la hemoglobina en sangre.....	125
IV.2.16. Determinación del glutatión reducido.....	125
IV.2.17. Determinación de α -tocoferol en plasma y en homogenado de hígado total.....	125
IV.2.18. Determinación del ácido ascórbico en plasma.....	126
IV.2.19. Determinación de la actividad NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I) en la cadena de transporte electrónico.....	127
IV.2.20. Determinación de la actividad citocromo oxidasa (Complejo IV) en la cadena de transporte electrónico.....	127
IV.2.21. Determinación de los coenzimas Q ₉ y Q ₁₀ en la mitocondria.....	128
IV.2.22. Determinación de proteínas.....	129
IV.2.23. Pruebas bioquímicas en humanos.....	129

IV.2.24. Mediciones antropométricas en humanos.....	129
IV.2.25. Determinación de los triglicéridos en suero.....	130
IV.2.26. Determinación del colesterol total en suero.....	130
IV.2.27. Determinación de la HDL-colesterol en suero.....	131
IV.2.28. Determinación de la LDL-colesterol en suero.....	131
IV.2.29. Inmunoensayo enzimático para la determinación de los anticuerpos frente a las LDL oxidadas en suero.....	132
 IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	 132
 V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	 133
V.1. ESTUDIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	135
 V.2. ESTUDIO EN HUMANOS.....	 136
V.2.1. Niños con hipercolesterolemia.....	136
V.2.2. Niños con obesidad.....	136
 VI. RESULTADOS.....	 139
 VI.1. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL ZUMO DE MANDARINA.....	 141
 VI.2. BIODISPONIBILIDAD DEL ZUMO DE MANDARINA....	 143

VI.2.1. En animales de experimentación.....	143
VI.2.1.1. Determinación de antioxidantes totales en plasma de ratas tras la ingesta de zumo de mandarina.....	143
VI.2.1.2. Determinación de la capacidad antioxidante total en plasma de ratas tras la ingesta de zumo de mandarina.....	144
VI.2.2. En humanos.....	148
VI.2.2.1. Determinación de antioxidantes totales en plasma humano tras la ingesta de zumo de mandarina.....	148
VI.2.2.2. Determinación de carotenoides en plasma humano tras la ingesta de zumo de mandarina.....	149
VI.2.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total en plasma humano tras la ingesta de zumo de mandarina.....	150
VI.3. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	154
VI.3.1. Efecto de la administración del tamoxifeno sobre el modelo animal (rata).....	154
VI.3.1.1. Seguimiento de la variación del peso corporal de los animales de estudio.....	155
VI.3.1.2. Determinación de los niveles de las aminotransferasas.....	155

VI.3.2. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas...	157
VI.3.2.1. En plasma de animales de experimentación (rata).....	157
VI.3.2.2. En homogenado de hígado total de animales de experimentación (rata).....	160
VI.3.3. Defensa antioxidante.....	164
VI.3.3.1. En plasma de animales de experimentación (rata).....	164
VI.3.3.2. En homogenado de hígado total de animales de experimentación (rata).....	166
VI.3.4. Daño oxidativo a nivel mitocondrial.....	168
VI.3.4.1. Actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte electrónico.....	169
VI.3.4.2. Niveles de los coenzimas Q ₉ y Q ₁₀	172
VI.4. ESTUDIO EN HUMANOS.....	176
VI.4.1. Estudio de niños con hipercolesterolemia.....	176
VI.4.1.1. Características físicas.....	176
VI.4.1.2. Ingesta dietética.....	176
VI.4.1.3. Efecto de la ingesta del zumo de mandarina.....	178
VI.4.1.3.1. Valores bioquímicos y perfil lipídico	178
VI.4.1.3.2. Marcadores de estrés oxidativo.....	180
VI.4.1.3.3. Marcadores de defensa antioxidante.....	181

VI.4.2. Estudio de niños con obesidad.....	182
VI.4.2.1. Características físicas.....	182
VI.4.2.2. Ingesta dietética.....	183
VI.4.2.3. Efecto de la ingesta del zumo de mandarina.....	186
VI.4.2.3.1. Valores bioquímicos y perfil lipídico	186
VI.4.2.3.2. Marcadores de estrés oxidativo.....	188
VI.4.2.3.3. Marcadores de defensa antioxidante.....	189
VII. DISCUSIÓN.....	191
VII.1. ZUMO DE MANDARINA.....	193
VII.2. BIODISPONIBILIDAD DEL ZUMO DE MANDARINA...194	
VII.2.1. En animales de experimentación.....	195
VII.2.2. En humanos.....	195
VII.3. ESTUDIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN....197	
VII.3.1. Efecto del tamoxifeno.....	197
VII.3.2. Daño oxidativo a biomoléculas y defensa antioxidante.....	198
VII.3.3. Daño oxidativo a nivel mitocondrial.....	210

VII.4. ESTUDIO EN HUMANOS.....	214
VII.4.1. Niños con hipercolesterolemia.....	214
VII.4.2. Niños con obesidad.....	220
VIII. CONCLUSIONES.....	227
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	231
X. DOCUMENTOS ADJUNTOS.....	289

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de especies oxigénicas reactivas en la reducción monovalente del oxígeno y en la cadena de transporte electrónico, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.....	13
Figura 2. Sistema hidroxilante microsomal hepático, adaptado de Mataix, 2002.....	14
Figura 3. Esquema de la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.....	16
Figura 4. Sistema oxidante en las células fagocitarias, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.....	17
Figura 5. Daño oxidativo al ADN y mecanismos de destrucción celular, tomada de Sedelnikova et al., 2010.	26
Figura 6. Consecuencia del daño oxidativo al colesterol.....	29
Figura 7. Estructura química del glutatión.....	38
Figura 8. Estructura química del α -tocoferol.....	40
Figura 9. Reacción del α -tocoferol con los peróxidos.....	41
Figura 10. Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina E, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.....	42
Figura 11. Estructura química del ácido ascórbico.....	43
Figura 12. Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina C, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.....	45

Figura 13. Estructura química básica de los flavonoides.....	46
Figura 14. Actuación de los polifenoles como “scavenger” de los radicales libres.....	50
Figura 15. Estructura química de los carotenoides.....	51
Figura 16. Mecanismos de actividad antioxidante de carotenoides.....	55
Figura 17. Estructura química del tamoxifeno.....	56
Figura 18. Hipótesis de la aterosclerosis.....	65
Figura 19. Esquema del metabolismo oxidativo y su relación con la dieta, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.....	79
Figura 20. Inhibición del radical hidroxilo.....	142
Figura 21. Inhibición del radical superóxido.....	143
Figura 22. Niveles de antioxidantes totales en plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	144
Figura 23. Determinación de la actividad antioxidante total por el método ABTS en el plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	145
Figura 24. Determinación de la actividad antioxidante total por el método DPPH en el plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	146
Figura 25. Determinación de la actividad antioxidante total por el método FRAP en el plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	147

Figura 26. Niveles de antioxidantes totales en plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	149
Figura 27. Niveles de carotenoides en plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	150
Figura 28. Determinación de la actividad antioxidante total por el método ABTS en el plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	151
Figura 29. Determinación de la actividad antioxidante total por el método DPPH en el plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	152
Figura 30. Determinación de la actividad antioxidante total por el método FRAP en el plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina.....	153
Figura 31. Evolución del peso de las ratas.....	155
Figura 32. Niveles de la alanina aminotransferasa.....	156
Figura 33. Niveles de la aspartato aminotransferasa.....	157
Figura 34. Niveles del malondialdehído en plasma de ratas.....	158
Figura 35. Niveles del contenido de grupos carbonilo en proteínas de plasma de ratas.....	159
Figura 36. Niveles de malondialdehído en homogenado de hígado total.....	161
Figura 37. Niveles del contenido de grupos carbonilo en proteínas de homogenado de hígado total.....	162

Figura 38. Niveles de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en homogenado de hígado total.....	163
Figura 39. Niveles de glutatión en plasma de ratas.....	165
Figura 40. Niveles de α -tocoferol en plasma de ratas.....	166
Figura 41. Niveles de glutatión en homogenado de hígado total.....	167
Figura 42. Niveles de α -tocoferol en homogenado de hígado total.....	168
Figura 43. Actividad del complejo I en mitocondrias de hígado de rata.....	170
Figura 44. Actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado de rata.....	171
Figura 45. Niveles del coenzima Q ₉ en mitocondrias de hígado de rata.....	174
Figura 46. Niveles del coenzima Q ₁₀ en mitocondrias de hígado de rata.....	175
Figura 47. Origen de la energía de los niños hipercolesterolémicos basal y después de la suplementación con zumo de mandarina.....	178
Figura 48. Origen de la energía de los niños obesos basal y después de la dieta hipocalórica.....	185
Figura 49. Origen de la energía de los niños obesos basal y después de la dieta hipocalórica + zumo de mandarina.....	185

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del zumo de mandarina.....	105
Tabla 2. Características físicas de 48 niños hipercolesterolémicos basal y después de la suplementación con zumo de mandarina.....	176
Tabla 3. Energía y toma de nutrientes de 48 niños hipercolesterolémicos basal y después de la suplementación con zumo de mandarina.....	177
Tabla 4. Valores de glucosa, insulina y folato antes y después de la suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos..	178
Tabla 5. Perfil lipídico basal y después de 4 semanas de suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos.....	179
Tabla 6. Niveles de malondialdehído y grupos carbonilo antes y después de las 4 semanas de suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos.....	180
Tabla 7. Niveles de glutatión reducido, α -tocoferol y vitamina C antes y después de las 4 semanas de suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos.....	181
Tabla 8. Características físicas de niños obesos.....	183
Tabla 9. Energía y toma de nutrientes de niños obesos antes y después de la intervención dietética.....	184
Tabla 10. Valores bioquímicos de niños obesos.....	187
Tabla 11. Niveles de aminotransferasas antes y después de la intervención dietética de niños obesos.....	187

Tabla 12. Perfil lipídico antes y después de la intervención dietética de niños obesos.....188

Tabla 13. Niveles de malondialdehído y grupos carbonilo antes y después de la intervención dietética de niños obesos.....189

Tabla 14. Niveles de glutatión reducido, α -tocoferol y vitamina C antes y después de la intervención dietética de niños obesos.....190

ABREVIATURAS

- ¹O₂**: oxígeno singlete
- 8-OHdG**: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
- ABTS**: ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- ADN**: ácido deoxirribonucleico
- AESAN**: Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición
- AGM**: ácidos grasos monoinsaturados
- AGP**: ácidos grasos poliinsaturados
- AGS**: ácidos grasos saturados
- ALT**: alanina aminotransferasa
- ARE**: elementos de respuesta a antioxidantes
- AST**: aspartato aminotransferasa
- ATP**: adenosina trifosfato
- BER**: reparación de escisión de base
- BR**: inversión de base
- CAT**: catalasa
- CGC**: contenido de grupos carbonilo
- DHA**: dehidroascorbato
- DNFH**: 2,4-dinitrofenilhidrazina
- DPPH**: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- EDTA**: ácido etilendiamino tetracético
- EGTA**: ácido etilenglicol tetracético
- EUROFEDA**: European Research on the Functional Effects of Dietary Antioxidants
- FRAP**: poder antioxidante de reducción férrica
- GPx**: glutatión peroxidasa
- GSH**: glutatión reducido, γ -glutamilcisteinilglicina
- GSSG**: glutatión oxidado
- H₂O₂**: peróxido de hidrógeno
- Hb**: hemoglobina
- HDL-c**: lipoproteínas de alta densidad colesterol
- HOMA-IR**: homeostasis model assessment of insulin resistance
- HPLC**: cromatografía líquida de alta resolución.
- IATA-CSIC**: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- IMC**: índice de masa corporal
- LDH**: lactato deshidrogenasa
- LDL-c**: lipoproteínas de baja densidad colesterol
- LDL-ox**: lipoproteínas de baja densidad oxidadas
- MDA**: malondialdehído
- MDH**: malato deshidrogenasa

MONICA: Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease

NADH: nicotiamida adenina dinucleótido reducido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

DT-diaforasa: NADPH-quinona oxidoreductasa

NBT: nitroazul de tetrazolio

NER: reparación de escisión de nucleótido

NO[•]: óxido nítrico

NO₂[•]: dióxido de nitrógeno

NOS: óxido nítrico sintasa

NOX: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

O₂: oxígeno molecular

O₂^{-•}: anión superóxido

OH[•]: radical hidroxilo

ONOO[•]: peroxinitrito

Q10: coenzima Q10

Q9: coenzima Q9

QH₂: ubiquinol

RE: retículo endoplásmico

RNS: especies reactivas del nitrógeno

RO[•]: alcoxilo

ROO[•]: peroxilo

ROS: especies reactivas del oxígeno, especies oxigénicas reactivas

SDS: dodecilsulfato sódico

SOD: superóxido dismutasa

TAM: tamoxifeno

TEAC: capacidad antioxidante equivalente de Trolox

TPTZ: 2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina

TROLOX: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

I. INTRODUCCIÓN

I.1. RADICALES LIBRES

I.1.1. Concepto de radical libre

Un radical libre es cualquier especie (átomo, molécula o ión) que contenga, al menos, un electrón desapareado en su orbital más externo y que sea, a su vez, capaz de existir de forma independiente (de ahí el término libre). Los radicales libres son altamente reactivos, necesitando “robar” o “donar” un electrón a otro átomo, el cual, a su vez, se transforma en un radical libre, lo que genera una reacción en cadena.

Entre los principales radicales libres se encuentran los derivados del oxígeno, conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS), y los derivados del nitrógeno, conocidos como especies reactivas del nitrógeno (RNS). Pero ambos términos son globales, ya que tanto ROS como RNS incluyen radicales y algunos no radicales (Halliwell, 1996; Halliwell, 2012). Así, cabe destacar por su relevancia:

- Radicales: anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), alcoxilo (RO^{\bullet}), peroxilo (ROO^{\bullet}) y óxido nítrico (NO^{\bullet}).
- No radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$).

Junto a los radicales del oxígeno existen otros derivados o centrados en átomos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, cloro, etc., que

indiscutiblemente contribuyen a la propagación y mantenimiento de nuevas reacciones conducentes a la formación de radicales.

En los sistemas biológicos son numerosas las reacciones por radicales libres. Una explicación de ello estriba en que, hace 3.500 millones de años, la formación de la química básica de la vida se produjo por las reacciones de los radicales libres originadas, esencialmente, por la radiación ionizante del sol (Harman, 2001). Junto a la aparición del oxígeno molecular, la progresiva acumulación del oxígeno en la atmósfera como consecuencia del proceso conocido como fotosíntesis (Echelin, 1970), dio lugar a la aparición de organismos aeróbicos. Por tanto, el oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia (Davies, 1995), siendo clave para el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular. Pero, al mismo tiempo, el oxígeno conlleva un peligro potencial para los seres vivos debido a las especiales características paramagnéticas de este gas. Dichas características son responsables de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad, conocidos éstos últimos como especies oxigénicas reactivas (ROS).

Así pues, por un lado, para los organismos el oxígeno juega un papel esencial en sus procesos metabólicos, no pudiendo sobrevivir sin él. Pero, por otro lado, el oxígeno al activarse se convierte en tóxico para dichos organismos, dando lugar a lo que se conoce como la paradoja del oxígeno.

En definitiva, la presencia de oxígeno en el desarrollo de los organismos provoca una exposición de éstos a la generación de ROS, siendo los responsables del daño oxidativo en las biomoléculas tales como los lípidos, las proteínas, el ADN, los hidratos de carbono y el colesterol (Halliwell et al., 1989; Halliwell et al., 1996; Valko et al., 2006). Asimismo, las ROS jugarían un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades tales como obesidad, cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, enfermedades reumáticas, enfermedades gastrointestinales (Maritim et al., 2003; Afonso et al., 2007; Reuter et al., 2010; Chen et al., 2012; Kim et al., 2012), entre otras.

I.1.2. Principales radicales libres

Existen numerosos radicales libres, pudiendo destacarse, entre los más relevantes, los siguientes:

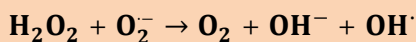
a) Radical hidroxilo (OH^\cdot)

Es uno de los radicales libres más reactivos. Tiene una vida media muy corta, estimada en alrededor de 10^{-9} s (Liochev and Fridovich, 1994; Pastor et al., 2000). Debido a su alta reactividad reacciona con la mayoría de las biomoléculas muy cerca de su lugar de formación (Cheeseman and Slater, 1993).

Este radical se produce por distintas reacciones, siendo la más importante en su formación la llamada reacción de Fenton en presencia de compuestos metálicos (Fenton, 1894):



Otra reacción a través de la que puede producirse es la reacción de Haber-Weiss, a partir del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido (Haber and Weiss, 1934):



Esta reacción es muy lenta, pero los metales de transición (hierro y cobre) pueden acelerar la velocidad de la reacción al actuar como catalizadores de la misma (Halliwell and Gutteridge, 1989).

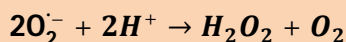
Igualmente, puede formarse por la acción de las radiaciones UV, al dividir el agua oxigenada en dos moléculas de radical hidroxilo. Así como también por radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ), que pueden provocar rotura homolítica del agua.

b) Anión superóxido (O_2^-)

El anión superóxido es un radical resultante de la reducción univalente del oxígeno molecular (O_2). Es poco reactivo, siendo capaz de reaccionar con un número reducido de moléculas (Halliwell, 1996), tales como quinonas, fenoles, otros radicales (óxido nítrico, el propio anión superóxido), etc. Aunque también es potencialmente tóxico, pudiendo iniciar y propagar reacciones que den lugar a otras especies

oxigénicas reactivas mucho más tóxicas, como el radical hidroxilo (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997).

Una reacción de dismutación permite la conversión del superóxido en peróxido de hidrógeno, tal como muestra la siguiente reacción:

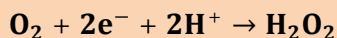
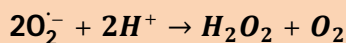


Asimismo, existen otras fuentes de origen del anión superóxido tales como, en primer lugar, la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias (Boveris et al., 1972; Droese and Brandt, 2012); en segundo lugar, como producto de reacciones catalizadas por enzimas como oxidasas, hidrolasas, deshidrogenasas (Behar et al., 1979; Korycka-Dahl and Richardson, 1980); y, en tercer lugar, como producto de reacciones no enzimáticas del oxígeno con la riboflavina (Barton and Parker, 1970) o la cisteína (Viña et al., 1983).

c) Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, ya que no posee electrones desapareados. No obstante, se debe tener en cuenta por su facilidad para difundirse a través de las membranas, pudiendo reaccionar con otras moléculas y dando lugar a reacciones de oxidación en puntos alejados de su lugar de producción.

El peróxido de hidrógeno se puede formar a partir de diferentes reacciones: por dismutación del ión superóxido (Cheeseman and Slater, 1993; Frei, 1994) o por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997):



Igualmente, cabe su formación por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahi and Richarson, 1980) y producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, monoamino oxidasa, uricasa, etc.) (Fridovich, 1986; Nicotra et al., 2004).

d) Óxido nítrico (NO[•])

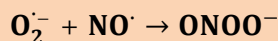
El óxido nítrico es un radical libre, pero no es muy reactivo. Tiene una vida media relativamente larga (3-5 segundos). Se forma en numerosos tipos celulares por una reacción enzimática catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa para la conversión de L-arginina a L-citrulina (Nisoli et al., 2003).

El NO[•] regula eventos críticos en procesos de lipoperoxidación de membranas o lipoproteínas, mediante su contribución a la formación de oxidantes secundarios más potentes como el peroxinitrito, o bien por su capacidad de terminación de reacciones de propagación lipídica con la concomitante formación de productos no radicalares del tipo

nitrosolípidos. Las velocidades relativas y concentraciones en el estado estacionario del NO[•] y radicales libres del oxígeno, así como los sitios de producción celular de estas especies, determinan los efectos netos observados prooxidantes o antioxidantes del NO[•] (Rubbo, 1998). Asimismo, se considera que el NO[•] posee propiedades reguladoras y antiinflamatorias que se producirían en condiciones fisiológicas, esto es, cuando el NO[•] interactuase directamente con las moléculas biológicas, dándose en concentraciones bajas de NO[•]. En cambio, también es capaz de promover la disfunción tisular y celular mediante un efecto proinflamatorio. De modo que este efecto se daría en situaciones de inflamación, actuando de manera indirecta a través de los intermediarios derivados del NO[•], por la reacción de éste con el oxígeno o el radical superóxido, produciéndose cuando las concentraciones de NO[•] son elevadas (Grisham et al., 1999). Además, el óxido nítrico es capaz de reaccionar con metales de transición como el hierro de proteínas intracelulares, pudiendo provocar inactivación de las enzimas como la aconitasa. Igualmente, puede producir daño al ADN, provocando mutaciones y roturas.

e) Peroxinitrito (ONOO⁻)

El peroxinitrito no es un radical y se forma a partir del anión superóxido y el óxido nítrico (Gryglewslí et al., 1986; Miles et al., 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



Ahora bien, se trata de un potente intermediario oxidante, capaz de inducir la peroxidación lipídica y de reaccionar con numerosas moléculas, degradando carbohidratos, fragmentando el ADN, nitrando residuos de tirosina, oxidando lípidos, oxidando grupos tioles o tioéteres, nitrando y oxidando guanosina (Radi et al., 1991; Beckman et al., 1994; Beckman and Koppenol, 1996). Además, es capaz de formar un potente agente nitrante como es el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) cuando el peroxinitrito reacciona con el CO_2 (Lyman and Hurst, 1995).

f) Dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$)

El dióxido de nitrógeno es un radical libre formado por la reacción del óxido nítrico con el O_2 o por descomposición del peroxinitrito (Postlethwait et al., 1995). Este radical es un poderoso agente nitrante y capaz de iniciar la peroxidación lipídica (Kaur and Halliwell, 1994).

g) Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

El oxígeno singlete no es un radical libre. Es una forma excitada del oxígeno molecular, pudiendo reaccionar fácilmente con otras moléculas por transferencia de su energía de excitación o por combinación química con ellas. Se puede formar *in vivo* por la acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno, a partir de determinadas reacciones enzimáticas o en reacciones de oxidación de diversas especies. Tiene una vida media aproximada de 10^{-6} segundos (Cadenas, 1989). El $^1\text{O}_2$ es capaz de oxidar a macromoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, dependiendo de su sitio de

formación y promover procesos como la peroxidación lipídica (Ryter and Tyrrell, 1998).

h) Radical peroxilo (ROO^{\cdot})

Los radicales peroxilos son menos reactivos aunque probablemente los más abundantes en los sistemas biológicos. Tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos) (Cadenas, 1989). Se forman a partir de la adición de oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado. La mayoría de los radicales peroxilo en los sistemas biológicos son derivados de lípidos (Reed, 1987).

I.1.3. Fuentes de radicales libres

Los radicales libres pueden generarse a través de gran diversidad de procesos siendo tanto de origen endógeno, generados por la propia célula, como exógeno (Frei, 1994). En el caso de los radicales libres de origen endógeno, se producen como intermediarios o productos tanto de reacciones oxidativas de las células como de procesos físico-químicos o de biotransformación (Pryor, 1976). Sin embargo, los que tienen un origen exógeno pueden producirse a través de la exposición a oxidantes medioambientales, farmacológicos y nutricionales, etc.

I.1.3.1. Fuentes endógenas

Las principales fuentes endógenas generadoras de radicales libres en la célula son:

a) Cadena de transporte electrónico

La cadena de transporte electrónico mitocondrial puede considerarse como la principal fuente de especies oxigénicas reactivas en el interior de la célula (Halliwell and Gutteridge, 1989; Lindsay and Astley, 2002; Fang et al., 2002; Alfadda and Sallam; 2012). Ello se debe a que su principal función es generar energía, puesto que el 95% del oxígeno que respiramos es reducido a H_2O por la acción de la citocromo oxidasa-a-3 (último eslabón de la cadena de transporte electrónico), mediante un mecanismo en el que participan cuatro centros redox, proporcionando, además, la principal fuente de energía (ATP) al organismo (Mathews and van Holde, 1998). Sin embargo, el 3-5% del oxígeno que respiramos puede dar lugar a la formación de especies oxigénicas reactivas, como consecuencia de la reducción monovalente de la molécula de oxígeno, tales como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), responsables de la toxicidad del oxígeno. Primeramente, se describió la producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno por Jensen en 1966 y, posteriormente, se demostró que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris and Cadenas, 1975). La generación del radical superóxido por la mitocondria se produce cuando los transportadores de la cadena respiratoria, localizados en la membrana mitocondrial interna, están altamente reducidos (Turrens and Boveris, 1980). La excepción en este caso viene constituida por el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) que, no siendo un radical, entra a formar parte de importantes reacciones redox, dando lugar a la formación de especies mucho más

reactivas. Por otra parte, también se puede formar el $O_2^{\bullet -}$ a nivel del complejo I y del complejo quinona-semiquinona-ubiquinol (Q_{10}), que actúan como aceptor de electrones (Figura 1) (Fridovich, 1978; Ames et al., 1993).

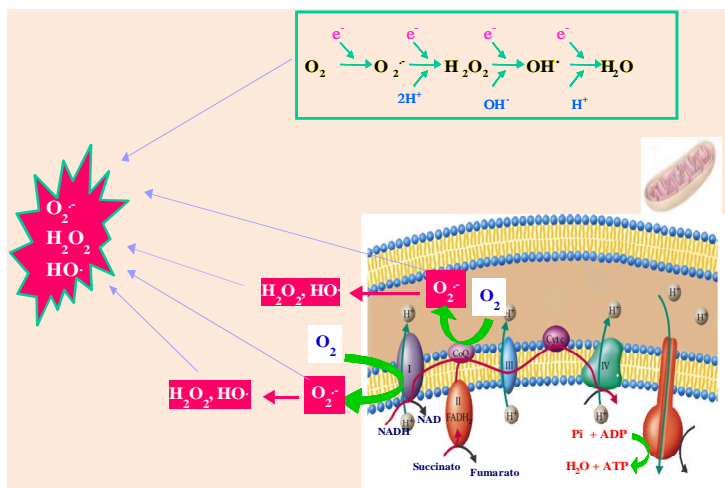


Figura 1. Generación de especies oxigénicas reactivas en la reducción monovalente del oxígeno y en la cadena de transporte electrónico, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.

b) Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico

La fracción microsomal de la célula contiene el sistema de transporte electrónico no fosforilante. Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b_5 que participan en diversas reacciones de hidroxilación y desaturación, produciendo ROS. Un sistema de hidroxilación lo constituyen los enzimas microsomales del citocromo P450, que se encargan de la metabolización de xenobióticos.

El sistema microsomal hepático (Figura 2) está constituido por una flavoproteína denominada NADPH-citocromo P450 reductasa, así como un citocromo microsómico, el P450. Un equivalente electrónico es transferido desde NADPH a la flavoproteína que contiene un grupo prostético FAD, al que reduce por completo. Posteriormente, los electrones son transferidos desde la flavoproteína reducida a la forma oxidada del citocromo P450 (Fe^{3+}) para dar la forma reducida P450 (Fe^{2+}), la cual reacciona con el O_2 formando el ión superóxido ($\text{Sevastian et al., 1990}$).

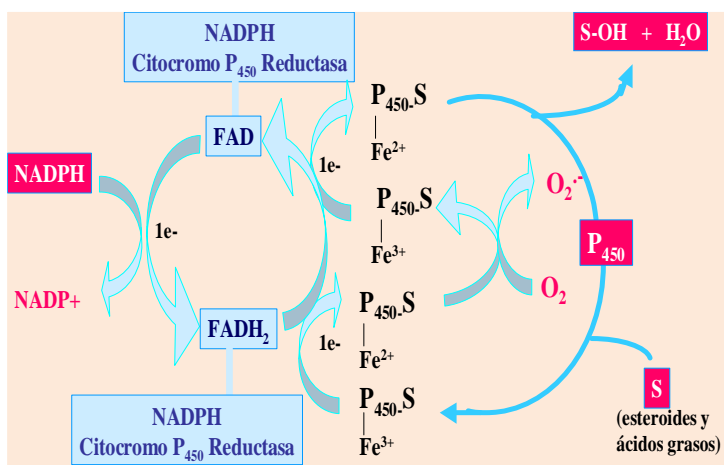


Figura 2. Sistema hidroxilante microsomal hepático, adaptado de Mataix, 2002.

c) Diversas enzimas

La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario originan radicales libres, tales como:

- El sistema hipoxantina/xantina oxidasa.

- Enzimas citosólicas solubles como son la aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa, que generan radicales libres durante su actividad catalítica.
- Enzimas que se encuentran unidas a la membrana plasmática como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa.

Con respecto al sistema hipoxantina/xantina oxidasa, en condiciones normales, la xantina deshidrogenasa oxida la hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico, no produciendo especies oxigénicas reactivas, puesto que el NAD^+ actúa como aceptor de electrones (Kinnula et al., 1995). Pero en condiciones de hipoxia (como en un proceso isquémico o reperfusión), la xantina deshidrogenasa sufre una conversión a xantina oxidasa que cataliza la misma reacción, pero el oxígeno actúa como aceptor de electrones con la reducción del oxígeno molecular y formación del anión superóxido en primera instancia (Figura 3) y peróxido de hidrógeno en segunda (Valko et al., 2004).

Con respecto a la enzima óxido nítrico sintasa existen tres isoformas, NOS neuronal (nNOS o NOS I), NOS inducible (iNOS o NOS II), NOS endotelial (eNOS o NOS III), que en las células produce uno de los radicales más relevantes en la regulación biológica: el óxido nítrico (Bredt et al., 1991; Lamas et al., 1992; Forstermann and Sessa et al., 2012).

Igualmente, cabe reseñar la importancia que presentan las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la

ciclooxigenasa, en la generación de radicales libres como consecuencia del metabolismo del ácido araquidónico, dando lugar a potentes productos biológicos, como son las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos (Kim et al., 2008).

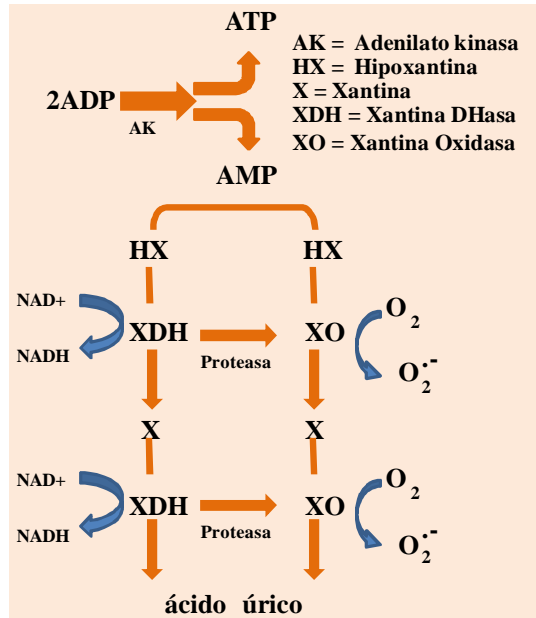


Figura 3. Esquema de la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.

d) Células fagocitarias activadas

Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos) poseen en la membrana plasmática la enzima NADPH oxidasa, que es una fuente importante de producción de radicales libres. Así, cuando se activan consumen gran cantidad de oxígeno que les permite generar directamente $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 como mecanismo para combatir a los microorganismos (Weiss and Lobuglio, 1982).

Además, dichas células por la acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular generan óxido nítrico (NO^\bullet), como mecanismo de defensa. La combinación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ con el NO^\bullet da lugar a la formación del ONOO^- , capaz de inducir peroxidación lipídica y producir lisis celular (Nathan and Xie, 1994) (Figura 4).

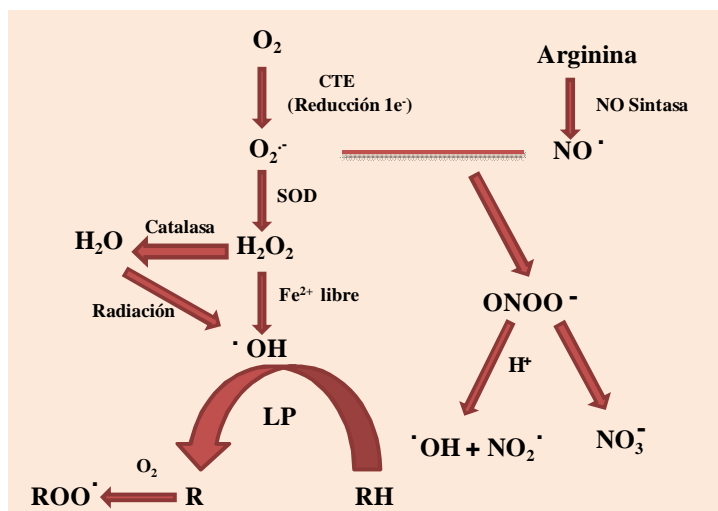


Figura 4. Sistema oxidante en las células fagocitarias, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.

e) Autooxidación

La autooxidación de diferentes moléculas citoplasmáticas puede dar lugar a especies oxigénicas reactivas. En general, se produce la formación del anión superóxido que, por una reacción de dismutación espontánea o enzimática, puede dar lugar a H_2O_2 .

I.1.3.2. Fuentes exógenas

Como se ha comentado anteriormente, también existe un origen

exógeno de ROS. Las fuentes exógenas pueden ser de diversos tipos: ambientales, nutricionales y farmacológicas.

a) Ambientales

Entre los factores ambientales se encuentran las radiaciones ionizantes, el ozono, el tabaco, los pesticidas, los contaminantes aéreos fotoquímicos o los hidrocarburos aromáticos. Estos agentes pueden poseer radicales libres, o bien convertirse en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación. La radiación ionizante puede causar daño a células vivas, incluyendo daño a ADN y mutación genética, muerte celular y cáncer (Riley, 1994). La mayoría de los efectos tóxicos de las radiaciones ionizantes es mediada por ROS (Tulard et al., 2003). Los ROS se generan rápidamente a través de radiólisis de las moléculas de agua, así como de las reacciones secundarias que conducen a un aumento en los niveles de ROS, que puede persistir y difundirse dentro de la célula (Riley, 1994; Leach et al., 2001). Ejemplo de ello es que los radicales libres se pueden producir en respuesta a las radiaciones electromagnéticas, como los rayos gamma, que pueden escindir el agua y producir radicales hidroxilo (Halliwell, 1996; Betteridge, 2000).

b) Nutricionales

Se producen ante la presencia de contaminantes, aditivos, etc. Las sales de hierro y cobre promueven la formación de radicales libres generando H_2O_2 . Cuando un individuo absorbe una cantidad

significativa de hierro dietético debido a un defecto genético, particularmente de hierro hemo, se convierte en un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Frei et al., 1990).

c) Farmacológicas

Los xenobióticos han demostrado generar ROS en células por metabolización directa a intermediarios radicales primarios o por activación de fuentes endógenas de ROS (Rice-Evans and Burdon, 1993; Klaunig et al., 1997). La inducción de estrés oxidativo y el daño se han observado después de la exposición a xenobióticos de variadas estructuras químicas y modos de acción. Los compuestos clorados, los iones metálicos, los barbitúricos, los ésteres de forbol y algunos compuestos de proliferación de peroxisomas están entre las clases de compuestos que han demostrado inducir estrés oxidativo y daño oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Klaunig et al., 1997). Compuestos quinónicos, incluyendo herbicidas como el paraquat, menadiona y una variedad bastante amplia de drogas usadas médicamente, pueden causar citotoxicidad debido a las especies oxigénicas reactivas generadas cuando estos compuestos sufren reacciones redox cíclicas con la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Una de las drogas más ampliamente estudiada generadora de estos radicales libres es la doxorubicina antibiótico de la familia de las antraciclinas, que se conoce como adriamicina (Valls-Bellés et al., 2006; Valls-Bellés et al., 2008). Esta droga somete a una reducción de un electrón que genera el radical semiquinona en el complejo I de la mitocondria.

El radical semiquinona de la adriamicina actúa como un reductor de oxígeno molecular, regenerando la droga nativa y produciendo el radical superóxido (Cadenas and Davies, 2000).

Aunque tradicionalmente las ROS se han observado desde un punto de vista negativo para la función y viabilidad celular, éstas pueden jugar un papel importante en el origen de la vida y la evolución biológica con efectos beneficiosos en los organismos. En los últimos años se ha reconocido y reevaluado la función de las ROS y su papel en funciones de señalización y modulación de la expresión génica. De hecho, no es fácil catalogar a las ROS o radicales libres como moléculas beneficiosas o dañinas. Según Jackson y colaboradores en 2002, todo depende del proceso celular que se analice. Para ello, estos autores toman dos ejemplos: en la muerte celular por necrosis, a consecuencia de los mecanismos de isquemia-reperfusión, las ROS no son beneficiosas, mientras que en la muerte celular por apoptosis pueden ser vistas, de manera ambivalente, como dañinas o también como beneficiosas. Además, otros autores consideran que el carácter beneficioso o perjudicial de las ROS es una cuestión de dosis, pudiendo desempeñar a niveles bajos un papel fundamental como segundos mensajeros y activando procesos celulares normales (Park et al., 2011).

El papel de las ROS en los procesos de inflamación también puede ser mixto. Así, se ha visto claramente su papel beneficioso en el ámbito proinflamatorio, ya que proporcionan una mejora en la respuesta

inmune consiguiente a la infección; sin embargo, en trastornos como la artritis reumatoide, la respuesta inflamatoria inapropiada generada por ellos debe ser suprimida por dañina.

Ya sean perjudiciales o beneficiosas, los investigadores han llegado a la conclusión de que las especies oxígeno reactivas juegan un papel importante en los cambios de la modulación de la expresión génica y en la función celular, pudiendo ser utilizados estos cambios como biomarcadores del estrés oxidativo.

I.2. DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS

Los radicales libres pueden causar daño sobre las biomoléculas mediante su modificación química, provocando cambios de estructura y también de sus funciones fisiológicas.

I.2.1. Daño oxidativo a lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados son vulnerables al ataque de los radicales libres, debido a la susceptibilidad de poseer en su estructura dobles enlaces de tipo cis, produciéndose el proceso de ataque oxidativo a lípidos que se conoce como peroxidación lipídica. Esta es una reacción en cadena que se puede dividir en tres etapas: inicio, propagación y terminación.

Se puede iniciar por acción de cualquier especie capaz de atacar a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, secuestrando un

átomo de hidrógeno y dando lugar al radical alquílico. El proceso va seguido de un reordenamiento de enlaces que da lugar a la estabilización de la molécula por la formación de un dieno conjugado. Entonces, el radical lipídico reacciona con el O₂ para formar el radical peróxido, que puede reaccionar con proteínas de membrana u otros hidrógenos de cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, formándose un radical alquílico y un peróxido lipídico, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994). De modo que el ataque da lugar a la formación de gran número de especies activadas, lo cual provocará la oxidación de una gran cantidad de sustancias, sobre todo hidrocarburos de cadena corta y aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonal, continuando hasta que el radical peróxido ataque una proteína o exista una molécula antioxidante en la membrana (Vladimirov, 1986). Además, dichos aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando mutaciones en el ADN y produciendo daños estructurales y funcionales cuando reaccionan con proteínas (Frei, 1994).

Dependiendo del grado de lesión de la membrana, éste puede no suponer importantes alteraciones o bien ser lo suficientemente elevado como para potenciar la susceptibilidad de la membrana a posteriores daños oxidativos (Gutteridge and Quinlan, 1985). El daño oxidativo a lípidos de membrana puede provocar alteraciones en la conductibilidad, permeabilidad y fluidez de las membranas (Shigenaga et al., 1994; Yu, 2005; Pamplona, 2008).

I.2.2. Daño oxidativo a proteínas

Los radicales libres son capaces de oxidar a todos los aminoácidos presentes en las proteínas al tener residuos susceptibles, sobre todo a nivel del grupo carbonilo, pudiéndose formar uniones proteína-proteína o fragmentar el esqueleto de la proteína (Cheal et al., 2009). Por tanto, dicha oxidación produce un cambio conformacional de la proteína y, en consecuencia, una modificación o pérdida de función biológica. Que una proteína sea susceptible al ataque de los radicales libres va a depender tanto de su composición de aminoácidos como de la accesibilidad a estos aminoácidos de la especie oxidante. Debiendo destacarse, en este sentido, que la metionina y la cisteína son especialmente sensibles a la oxidación por casi todas las formas de ROS (Stadtman and Levine, 2003).

En función de la concentración de oxígeno presente en el medio se pueden dar dos situaciones: de un lado, en presencia de oxígeno los radicales libres pueden producir la fragmentación de la cadena peptídica; de otro lado, en ausencia de oxígeno los radicales libres pueden promover el entrecruzamiento entre proteínas, con lo que esto conlleva sobre el funcionamiento de la proteína (Stadtman, 1992).

Ciertamente, existen numerosos ejemplos de ello. Entre oxidaciones que son de tipo reversible, se encuentra la oxidación de metionina a metionina sulfóxido y su reducción enzimática de nuevo a metionina. Y entre oxidaciones de tipo irreversible se da en la histidina y el triptófano cuando el daño provoca la ruptura del anillo imidazólico de

dichos aminoácidos. Un ejemplo de la importancia de la oxidación de proteínas lo representan las lipoproteínas de baja densidad (LDL), donde histidinas y lisinas son susceptibles de ser modificadas por oxidación, lo que causa una alteración en el reconocimiento del receptor correspondiente (Griffiths et al., 2002; Obama et al., 2007).

Por otra parte, los grupos carbonilo también pueden ser introducidos en las proteínas por reacciones con aldehídos que se producen durante la peroxidación lipídica, o con derivados carbonilo reactivos generados durante la reacción de reducción de azúcares o de sus productos de oxidación con los residuos de lisina, con la eventual formación de productos avanzados de glicoxilación (Miyata et al., 1998; Yuan et al., 2007).

I.2.3. Daño oxidativo al ADN

El ataque de los radicales libres sobre el ADN genera un índice de lesiones, que incluye la rotura de las cadenas y la modificación de las bases, dándose mediante dos reacciones principalmente:

- La reacción con los residuos desoxirribosa: en ella, el radical libre ataca a una desoxirribosa del ADN, produciéndose de manera general una rotura de la cadena en el lugar de la reacción. No obstante, la cadena complementaria que permanece intacta puede mantener unidos los dos extremos de la cadena dañada hasta que actúen las enzimas reparadoras. Por lo que no se trata de un daño crítico, a no ser que haya una rotura cercana en las dos cadenas (Breen and Murphy, 1995).

- La reacción de adición de los radicales a las bases del ADN: esta reacción es más frecuente que la rotura de las cadenas y da lugar a un gran número de productos. El modo de reacción principal consiste en la adición, a nivel de los carbonos C-4 y C-8, de las purinas y, a nivel de los carbonos C-5 y C-6, de las pirimidinas, produciendo un conjunto de formas radicales de las bases, que sufren modificaciones hasta la obtención productos finales muy modificados (Breen and Murphy, 1995).

Entre las principales bases modificadas cabe destacar: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 8-oxoadenina, 8-oxoguanina, 5-hidroxicitosina, timina glicol, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 6-diamino-5-formamidopirimidina, 5,6-dihidroxiuracilo, 5-hidroxi-5-metilhidantoina, entre otras, produciendo mutagénesis y carcinogénesis (Griffith, 1988). El daño oxidativo del ADN es, de hecho, un mecanismo más en la alteración de esta molécula genética (Figura 5).

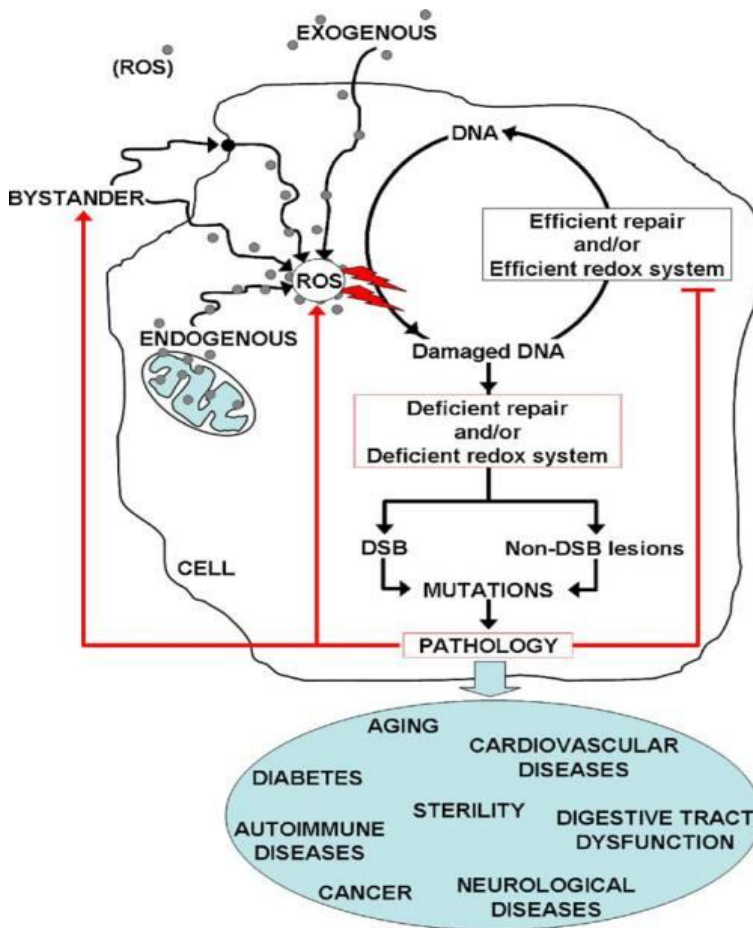


Figura 5. Daño oxidativo al ADN y mecanismos de destrucción celular, tomada de Sedelnikova et al., 2010.

Actualmente, se han detectado más de 20 modificaciones en las bases, siendo la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) una de las modificaciones oxidativas más frecuentes. Su importancia reside en su poder mutagénico, ya que durante la replicación producirá una transversión de GC a TA, a no ser que sea reparada previamente a la replicación (Kasai and Nishimura, 1984; Shibutani et al., 1991).

Además, existen estudios que reflejan una correlación entre esta base modificada y la carcinogénesis *in vivo* (Floyd et al., 1986; Cheng et al., 1992; Feig et al., 1994; Kasai et al., 1998; de la Asunción, 2004; Servais et al., 2005). Y para que un radical hidroxilo sea el que medie en este proceso, son necesarios dos pasos: primero, la adición del radical hidroxilo al C-8 de la guanina y, segundo, la consiguiente pérdida del átomo de hidrógeno (o un electrón más un protón) del intermediario para formar 8-OHdG, el cual permanece en el ADN durante algún tiempo (Valavanidis et al., 2005).

Otra de las bases modificadas es la 8-oxoadenina que, asimismo, puede ser erróneamente codificada e inducir a mutaciones en células de mamíferos (Kamiya and Kasai, 1995; Kasai, 1998). La 5-hidroxicitosina se muestra como una potente lesión premutagénica, llevando a una transición (purina o pirimidina sustituida por otra base diferente) de GC a AT y una transversión de GC a CG. Esta base modificada es uno de los productos más mutagénicos derivados del daño al ADN (Feig et al., 1994). Otras bases modificadas, como la 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 5,6-dihidroxiuracilo y la 5-hidroxi-5-metilhidantoina, también muestran indicios de que sus lesiones sean premutagénicas (Betteridge, 2000; Griffiths et al., 2002).

Es importante mencionar que el ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear (Richter et al., 1988). Las causas de ello son, en primer lugar, que su genoma presenta una serie de características determinadas, tales como escasez de enzimas

reparadoras, ausencia de histonas que protejan al ADN y su proximidad a la cadena de transporte mitocondrial (uno de los principales sistemas de producción de especies oxigénicas reactivas). Y, en segundo lugar, que no posee intrones, de modo que la modificación de cualquier base afecta normalmente a una zona codificante del ADN, siendo sus consecuencias más importantes. Por tanto, las lesiones en el ADN mitocondrial se acumulan con la edad en una tasa más elevada que el ADN nuclear (Ames et al., 1993; Lee and Wei, 2012).

I.2.4. Daño oxidativo a hidratos de carbono

Los radicales libres generan un daño oxidativo menor a los hidratos de carbono que a otras moléculas. A pesar de ello, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres afectando a su función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Duan and Kasper, 2011), alterando sus funciones celulares, tales como las asociadas a la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.

Por otro lado, existen monosacáridos capaces de actuar como captadores de radicales libres. Un ejemplo de ello es tanto la glucosa que es capaz de captar al radical superóxido como el manitol que actúa sobre el radical hidroxilo (Shen et al., 1997).

I.2.5. Daño oxidativo al colesterol

Los radicales libres actúan sobre la molécula de colesterol, produciendo hidroperóxidos de colesterol, oxisteroles y derivados del colesterol oxidado, en los que la oxidación se produce sobre el anillo beta del esterol. Estos derivados del colesterol están implicados en la patogénesis de la aterosclerosis y en sus distintas formas de presentación clínica (Figura 6). En la actualidad, existen muchas evidencias que indican que, en el proceso de iniciación de la aterosclerosis, están implicados los radicales libres, la peroxidación lipídica y la modificación oxidativa de la LDL (Spiteller, 2003; Zmijewski, 2005; Yoshida and Kisugi, 2010).

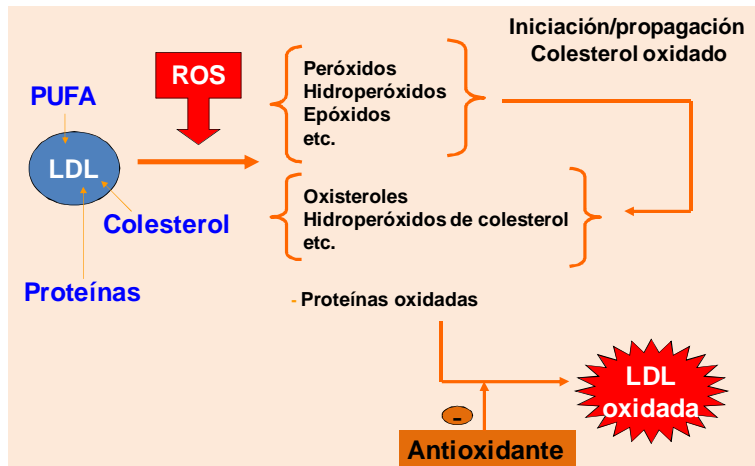


Figura 6. Consecuencia del daño oxidativo al colesterol.

I.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE

I.3.1. Concepto de estrés oxidativo y de antioxidante

Los radicales libres pueden desempeñar un papel fisiológico, siendo necesarios para el buen funcionamiento celular, pudiendo actuar como segundos mensajeros, estimulando la proliferación celular y actuando como mediadores para la activación de las células, cuando se encuentran a bajas concentraciones. Pero también pueden dar lugar al acumularse a reacciones de oxidación indeseadas, contra las que los organismos han tenido que desarrollar sistemas de defensa antioxidante con el fin de protegerse de su acción tóxica, mediante su eliminación o su transformación en moléculas estables (Davies, 1995; Halliwell, 1996; Halliwell, 2011).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1985). El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia, bien de un incremento de las especies prooxidantes, bien de un descenso de las antioxidantes, bien porque ambas situaciones se den simultáneamente.

De modo que, cuando se ocasiona este desequilibrio provocado por cualquiera de dichas causas, da como resultado daño celular, ya que se producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos. En estas circunstancias, el modo de paliar el daño oxidativo que se puede causar sobre las diferentes biomoléculas sería incrementar la capacidad antioxidante del organismo. Existen

diferentes modos para obtener este fin, basándose uno de ellos en la administración de antioxidantes como suplementos dietéticos (Carlsen et al., 2010).

Halliwell y Gutteridge definieron antioxidante, en 1989, como “cualquier sustancia que, en su presencia y a bajas concentraciones, en relación con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato”. Un buen antioxidante puede caracterizarse por su alta efectividad, su variabilidad operativa y su versatilidad para poder combinarse con una importante variedad de especies oxigénicas reactivas.

I.3.2. Sistemas de defensa antioxidante

Desde un punto de vista fisiológico, según el modo de acción, los antioxidantes se pueden clasificar en los siguientes tipos:

- Antioxidantes primarios, que son los que previenen la formación de nuevos radicales libres, detoxificándolos y de este modo, convirtiéndolos en moléculas menos dañinas, o bien impidiendo su formación. Entre ellos, cabe destacar la catalasa, la glutatión peroxidasa o la superóxido dismutasa.
- Antioxidantes secundarios, que son protectores no enzimáticos que interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres o desplazan las ROS. Los mismos intervienen cuando existe una superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones

en cadena. Pueden destacarse el glutatión, la vitamina E, la vitamina C, los carotenoides, etc. (Finaud et al., 2006).

- Antioxidantes terciarios, que son los encargados de la reparación de las moléculas dañadas por los radicales libres, para impedir su acumulación indeseada. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos y lipolíticos, así como los mecanismos enzimáticos de reparación del ADN. En estos sistemas están incluidos los siguientes subsistemas:

a) Sistema reparador directo: consiste en un grupo de enzimas reparadoras como las proteasas y las fosfolipasas, que actúan sobre proteínas y fosfolípidos, una vez se produce el daño en la molécula y éstas deben ser reemplazadas vía síntesis *de novo* (Davies, 1995; Sartori and Jiricny, 2003). Otro grupo de enzimas actúan mediante la reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas, como son la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.

b) Sistema reparador indirecto: este sistema conlleva, en primer lugar, el reconocimiento del daño molecular (siendo éste eliminado o degradado) y, en segundo lugar, la síntesis de la parte eliminada. Esto puede ocurrir tanto en proteínas oxidadas y en peróxidos lipídicos de las cadenas carbonadas, como en oxidaciones de ADN y ARN (Mataix, 2002). En el caso de la reparación del ADN, se identifica en primer lugar el sitio dañado sobre el ADN y entonces se inicia el proceso de

reparación de varias maneras, dependiendo de la estructura de la lesión y su impacto en el ADN. Por ejemplo, las lesiones voluminosas son reparadas por las proteínas NER (reparación de escisión de nucleótido), mientras que las lesiones más simples de ADN se reparan por las proteínas BER (reparación de escisión de base). A diferencia de las proteínas NER y BER, las proteínas BR (inversión de base) reparan, por inversión completa de las bases dañadas, las lesiones producidas por alquilación (Jena, 2012).

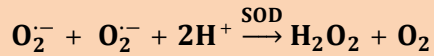
Además, desde un punto de vista bioquímico, los sistemas antioxidantes se pueden clasificar en sistema enzimático antioxidante y sistema no enzimático antioxidante.

I.3.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Las principales enzimas antioxidantes celulares que forman parte de los sistemas de defensa son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

a) Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1.) cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual puede ser reducido, de nuevo, por la catalasa o por la glutatión peroxidasa (McCord and Fridovich, 1969; Fridovich, 1974):

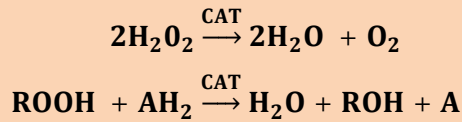


Es importante destacar que en la cadena de transporte electrónico, aproximadamente del 1 al 2% del oxígeno que se consume por la mitocondria en estado respiratorio se transforma en el radical anión superóxido, el cual es detoxificado por esta enzima, la superóxido dismutasa dependiente de manganeso. Otra función de la superóxido dismutasa consiste en proteger a las dehidratasas frente a la inactivación por el radical superóxido.

Existen diferentes formas de esta enzima antioxidante, según el grupo prostético ligado a ella. Así, en eucariotas se han definido las siguientes: la manganeso SOD (Mn-SOD) en la matriz mitocondrial y el citosol; la extracelular SOD (EC-SOD) y cobre/zinc SOD (CuZn-SOD) que se localiza en el citosol (Zelko et al., 2002).

b) Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6.) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno para dar lugar a agua y a oxígeno (Chance et al., 1979). También es capaz de catalizar reacciones de peroxidación en presencia de peróxido de hidrógeno, actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos o ácidos orgánicos como sustratos, protegiendo a las células del peróxido de hidrógeno interno:



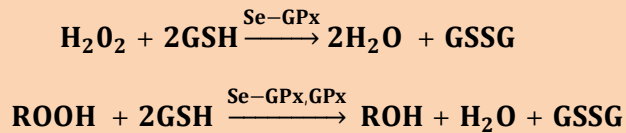
La catalasa es una enzima tetramérica con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa que contienen un grupo de ferriprotoporfirina por subunidad, alcanzando una masa molecular de 240 kDa. Además, para su actividad se requiere que el Fe^{3+} se una al sitio activo de la enzima. La catalasa es abundante en células de mamíferos y se localiza principalmente en los peroxisomas (Tolbert and Essner, 1981), donde destruye el peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas localizadas dentro de estos orgánulos (Halliwell, 1996).

c) Glutación peroxidasa

La glutatión peroxidasa es una enzima citosólica e intramitocondrial fundamental para catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno hasta agua. Asimismo, la GPx que se localiza en la membrana plasmática es capaz de detoxificar los peróxidos lipídicos hasta alcoholes (Chance et al., 1979), por lo que es muy importante para el mantenimiento de la estructura y la función de las membranas biológicas (McCord, 2000). Existen dos tipos de glutatión peroxidasa, una independiente de selenio (GPx, EC 2.5.1.18) (Sheehan et al., 2001) y otra que es selenio dependiente (Se-GPx, EC 1.11.1.9). En humanos se han identificado ocho isoformas diferentes de GPx: GPx1,

GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6, GPx7 y, finalmente, GPx8 (Brigelius-Flohe, 2006; Styskal et al., 2012).

Ambas enzimas utilizan, como cosustrato, el glutatión reducido (GSH), el cual actúa como donante de electrones para catalizar las siguientes reacciones:



La glutatión peroxidasa es la enzima clave del ciclo redox del glutatión: cuando se produce una agresión oxidativa, el GSH se oxida a glutatión oxidado (GSSG) mediante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado se reduce inmediatamente a GSH por medio de la glutatión reductasa, la cual es dependiente de NADPH, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. De esta manera, el glutatión es un factor esencial para la glutatión peroxidasa, por lo que su disminución puede deteriorar la acción de la enzima, con el consiguiente freno a los mecanismos limitadores de la peroxidación lipídica (Ameen et al., 2004; Sahin and Gumuslu, 2004; Sener et al., 2005). Además de participar, por otro lado, en la reducción de otros antioxidantes tales como el α -tocoferol y donar hidrógenos para reparar el ADN dañado (Masella et al., 2005).

Hay otras enzimas importantes que también participan en el sistema de defensa, incluidas en las reacciones de la regeneración del glutatión, como son la glutatión reductasa o la NADPH-quinona oxidoreductasa (DT-diaforasa). Ésta última cataliza la reducción de quinona a quinol y participa en la reducción de drogas de estructura quinónica (Davies, 1995).

I.3.2.2. Antioxidantes no enzimáticos o “scavengers” de radicales libres

En el sistema de defensa antioxidante presenta gran importancia una diversidad de moléculas antioxidantes. Por una parte, las lipofílicas, tales como los carotenoides, la vitamina E, la ubiquinona, entre otras. Y, de otra parte, las hidrofílicas, destacando el glutatión, la ferritina, la ceruloplasmina, el ácido úrico, la vitamina C, entre otras. Así, pueden citarse, como principales antioxidantes no enzimáticos, los siguientes:

a) Glutatión (GSH)

El glutatión o γ -glutamilcisteinilglicina es el principal componente antioxidante endógeno. Es un tripéptido compuesto de ácido glutámico, cisteína y glicina (Figura 7), que fue descubierto por Hopkins en 1921. Se sintetiza principalmente en el hígado y es transportado por la circulación sanguínea hasta los tejidos.

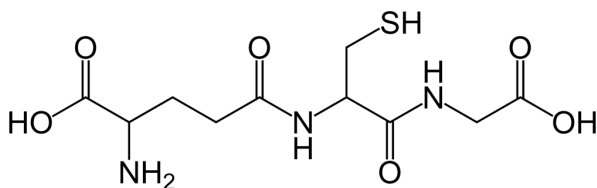


Figura 7. Estructura química del glutatión.

El glutatión se puede encontrar en dos formas: como glutatión reducido o GSH, o bien como glutatión oxidado o GSSG al estar compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas. Principalmente, se encuentra en las células en su forma reducida, y gran parte de sus funciones se deben a la presencia del grupo tiólico reducido que le confiere la cisteína. Su distribución es universal al estar presente tanto en plantas como en animales y juega un papel importante en la protección celular contra los efectos tóxicos de los radicales libres, así como frente a los efectos nocivos de las radiaciones.

Su estructura química le confiere muchas posibilidades para desempeñar sus funciones fisiológicas, ya que el grupo tiol (-SH) de la cisteína le proporciona capacidad para intervenir en reacciones redox, mediante el intercambio de electrones a través del azufre de la cisteína y, por otro lado, el enlace γ -glutamilo le confiere resistencia frente a la degradación por las peptidasas.

La síntesis del GSH se produce en dos etapas donde intervienen dos enzimas. En la primera etapa se da lugar a la γ -glutamilcisteína a partir del ácido glutámico y la cisteína, mediante la reacción catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa. El paso limitante de la síntesis del GSH es la disponibilidad de la cisteína. En la segunda etapa, la glutatión sintetasa cataliza la reacción donde la γ -glutamilcisteína se une con la glicina para formar el tripéptido. La síntesis del GSH se encuentra regulada por retroalimentación, ya que el GSH inhibe la γ -glutamilcisteína sintetasa; y por inhibición covalente de γ -glutamilcisteína sintetasa por fosforilación o nitrosación (Griffith, 1999).

Además de participar en diversos procesos fisiológicos, tales como la detoxificación de xenobióticos o la síntesis de ADN de un modo indirecto a través de proteínas tiólicas (glutarredoxina y tiorredoxina) que dependen del GSH, éste último se caracteriza por su papel antioxidante, ya que es capaz de interactuar con los radicales libres y estabilizar radicales como el hidroxilo, el superóxido y los peróxidos, lo puede hacer reaccionando directamente con los radicales libres, o bien por medio de la glutatión peroxidasa para reducir los peróxidos formados (Wefers and Sies, 1983; Sies, 1999).

b) Vitamina E

La vitamina E está considerada como el antioxidante natural más potente, capaz de actuar frente a las reacciones de lipoperoxidación en

cadena en la membrana celular. El término vitamina E es una descripción genérica para todos los tocoferoles y tocotrienoles, que presentan actividad biológica de α -tocoferol. Debido a su alta liposolubilidad, se asocia con los lípidos de membranas y las lipoproteínas plasmáticas.

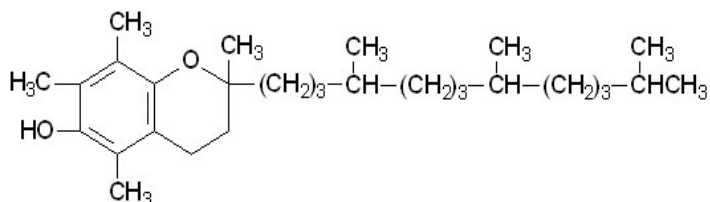


Figura 8. Estructura química del α -tocoferol.

La vitamina E se compone mayoritariamente de α - γ -tocoferol, estando las formas ingeridas en estado libre o formando ésteres (Figura 8). La principal fuente de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, soja) y productos elaborados a partir de estos aceites (margarinas, mayonesas, repostería). También se encuentra presente en frutos secos como las nueces y las avellanas. Otros alimentos como legumbres, lácteos y cereales pueden contribuir significativamente a la ingesta total de la vitamina E.

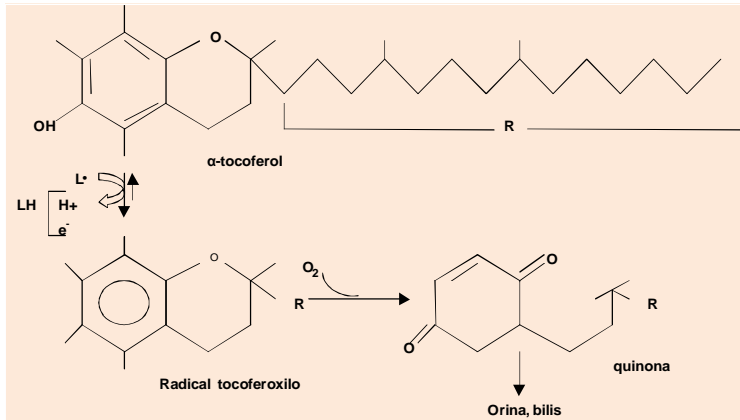


Figura 9. Reacción del α -tocoferol con los peróxidos.

La vitamina E puede reaccionar con $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} y ROO^{\bullet} . Una de sus funciones más importantes es la inhibición de la peroxidación lipídica, actuando de “scavenger” del radical peroxilo y dando como producto hidroperóxidos y radical tocoperoxilo, el cual puede transformarse en quinona en presencia de O_2 . Si bien la cantidad de quinona que se forma es mínima y ésta se elimina por orina o bilis (Figura 9). Lo que suele ocurrir es que la forma oxidada se reduce nuevamente en presencia de ácido ascórbico, de ubiquinol (QH_2) o de GSH, pudiendo actuar nuevamente de antioxidante (Figura 10) (Brigelius-Flohé and Traber, 1999; Abudu et al., 2004).

Por tanto, la generación de la vitamina E va a depender de las condiciones existentes: se consume en primer lugar el ácido ascórbico cuando los radicales se forman en fase acuosa, mientras que se consume primero el coenzima Q cuando los radicales se forman en la membrana. La vitamina E también puede actuar de prooxidante,

produciendo peroxidación en las LDL, facilitando la transferencia de la reacción de los radicales de la fase acuosa al interior del ambiente lipídico. Para inactivar esa peroxidación mediada por el tocoferol, son necesarios unos adecuados agentes reductores, llamados coantioxidantes, siendo los más eficaces el ácido ascórbico en ambientes hidrofílicos y el coenzima Q en ambientes hidrofóbicos (Figura 10) (Kontush et al., 1996).

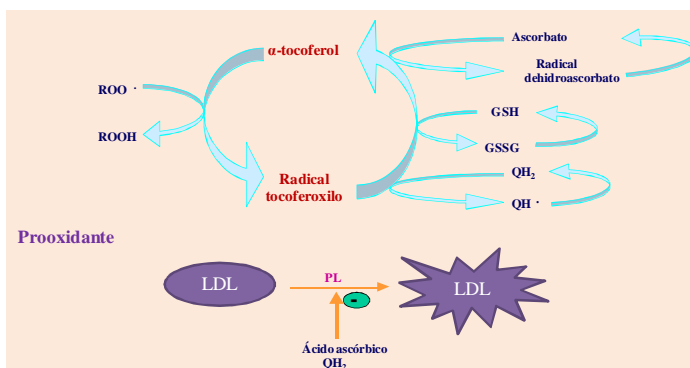


Figura 10. Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina E, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.

c) Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble y se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos y en plasma (Figura 11). Tanto las plantas como la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa; por el contrario, los humanos, otros primates superiores e, incluso, las cobayas no poseen la última enzima para su biosíntesis (ésta es, la L-gluco- γ -lactona oxidasa), teniendo que ser incorporada a través de la dieta. Además, como la mayoría de las vitaminas hidrosolubles, no se almacena en el cuerpo por un largo

período de tiempo y se elimina en pequeñas cantidades a través de la orina, por lo que resulta importante su administración diaria para evitar que se agoten sus reservas. La vitamina C muestra una amplia distribución en los tejidos, siendo máxima su concentración en aquellos con un intenso metabolismo como son las glándulas suprarrenales, la hipófisis, el hígado, el páncreas, el encéfalo y los ojos (Rumsey and Levine, 1998).

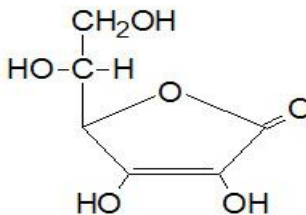


Figura 11. Estructura química del ácido ascórbico.

La vitamina C se absorbe mayoritariamente en el duodeno y yeyuno proximal mediante un mecanismo de transporte activo dependiente de sodio. Las principales fuentes son las frutas, especialmente los cítricos, el kiwi, las fresas y el melón. También se encuentra en determinadas verduras y hortalizas como tomate, pimiento, coles de Bruselas, coliflor, etc. Y, entre los alimentos de origen animal, aun teniendo siempre una importancia minoritaria, cabe destacar únicamente el hígado.

La vitamina C es uno de los antioxidantes más potentes en fase acuosa, que actúa a nivel extracelular y citosólico. Presenta unas características estructurales que le permite reaccionar con las especies oxigénicas reactivas, tales como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ROO^{\bullet} , OH^{\bullet} y 1O_2 , oxidándose a dehidroascorbato (DHA) y siendo nuevamente reducido a ácido ascórbico por acción de la dehidroascorbato reductasa (Ashton et al., 1999; Dhremer et al., 2001) (Figura 12). Esta reducción puede ocurrir vía no enzimática por la glutatión o vía enzimática por la actuación de proteínas que muestran actividad dehidroascorbato reductasa incluyendo la tioltransferasa. El glutatión es necesario para la reducción del DHA, y se obtiene probablemente de la reacción catalizada por la glutatión reductasa requiriendo NADPH como cofactor (Figura 12). Por otro lado, la vitamina C desempeñaría otro papel como antioxidante, regenerando la vitamina E, donde se consume la forma nativa de la vitamina C. La vitamina C en presencia de metales de transición como Fe^{2+} o Cu^{2+} posee actividad prooxidante, pudiendo tener efectos importantes *in vivo* dependiendo de la disponibilidad de los iones metálicos (Figura 12) (Young and Woodside, 2001; Du et al., 2012).

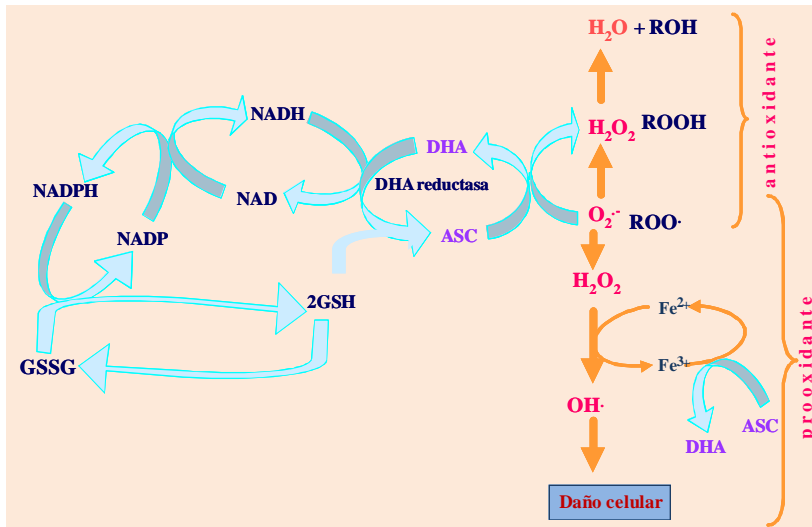


Figura 12. Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina C, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.

d) Polifenoles

Estos compuestos se agrupan según su estructura química en dos grandes grupos: no flavonoides y flavonoides. Los no flavonoides, abarcan los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos (C₆-C₁) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada (C₆-C₃), pero también otros derivados fenólicos como los estilbenos.

Los flavonoides son derivados benzo- γ -piranos, caracterizados por un esqueleto base de 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆) de tipo 2-fenil-benzopirona, es decir, están formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena de 3 carbonos, que se cierra en heterociclo oxigenado compuesto de 6 eslabones. Estos compuestos están

divididos en varias subclases que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano (Figura 13) (Bravo, 1998).

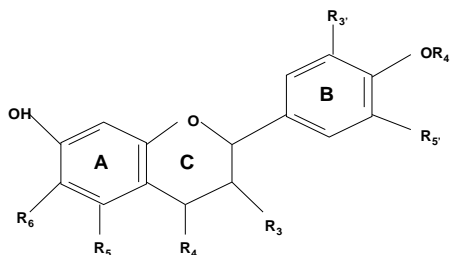


Figura 13. Estructura química básica de los flavonoides.

Hoy en día ya se conocen más de 5.000 flavonoides diferentes, pudiendo destacarse entre las familias más importantes las siguientes (Beecher, 2003): flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y procianidinas. Se caracterizan por presentar una gran variabilidad estructural, ya que pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30.000 Da (Bravo, 1998). Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en la mayoría de alimentos de origen vegetal, especialmente en las frutas y en las verduras, así como en el té, el café y en determinadas bebidas como la cerveza y el vino.

Actualmente, se carece de estudios concluyentes con respecto a la absorción, metabolismo y secreción de los flavonoides. En los alimentos, la mayoría de los flavonoides, excepto los flavanoles, se

encuentran en forma glicosilada, siendo con mayor frecuencia los azúcares ligados la glucosa o la ramnosa (Harborne, 1994). Estos compuestos son resistentes a los ácidos del estómago y pasan intactos al intestino. Y en el intestino delgado solamente se absorben las agliconas y algunos glicósidos mientras que el resto son hidrolizados por la microflora del colon (Scalbert and Williamson, 2000). No obstante, la absorción en el colon presenta más dificultades, debido a que su área de intercambio es menor, así como menor densidad de sistemas de transporte, por lo que aquellos glicósidos que son hidrolizados por la microflora del colon, como por ejemplo los glicósidos con ramnosa, son absorbidos más lentamente y de modo menos eficiente que las agliconas o el resto de glicósidos. Además, se ha observado que la flora intestinal juega un importante papel en la modificación de algunos polifenoles (Pietta et al., 1998).

Durante la absorción los polifenoles son conjugados en el intestino delgado, incluyendo dichos procesos metilación, sulfatación y glucuronidación. Estos compuestos son transportados unidos a la albúmina hasta el hígado, donde se conjugan con grupos sulfato, grupos metilo, con ambos a la vez, o bien a glucurónidos. La adición de estos grupos aumenta el tiempo de eliminación en circulación y, probablemente, disminuye la toxicidad. Las concentraciones plasmáticas alcanzadas están en función de la naturaleza del polifenol y de la fuente dietética. En general, los metabolitos de los polifenoles son rápidamente eliminados del plasma, aunque algunos de estos metabolitos pueden acumularse en las células diana o ser eliminados

por vía biliar y orina. Las bacterias intestinales poseen β -glucuronidasas y son capaces de liberar agliconas a partir de metabolitos conjugados secretados en bilis. Las agliconas pueden ser reabsorbidas por la recirculación enterohepática y mantener durante más tiempo su concentración en sangre (Manach et al., 2004). En definitiva, la biodisponibilidad varía según la cantidad de polifenoles y de sus derivados presentes en la dieta. Así, los polifenoles que más se absorben en humanos son las isoflavonas y el ácido gálico, seguidos por las catequinas, flavononas, glucósidos de quercetina. En cambio, los que menos se absorben son las proantocianidinas y las antocianinas, siendo los datos hasta la actualidad limitados para otros polifenoles (Manach et al., 2005).

La estructura química de los flavonoides es precisamente la que les confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres (Heim et al., 2002). En concreto, la presencia de una estructura 3',4'-hidroxi en el anillo B, de un doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo en el anillo C, y de un grupo 5-hidroxilo en el anillo A con un grupo 3-hidroxilo y una función 4-oxo en el anillo C, es lo que permite a los flavonoides interactuar con los radicales libres (Rice-Evans et al., 1996).

- Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades secuestradoras de radicales libres y quelantes de hierro y cobre, impidiendo la formación del radical hidroxilo (Bohm et

al., 1998; Bravo, 1998; Russo et al., 2000; Middleton et al., 2000; Mira et al., 2002; Ozgova et al., 2003).

- Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Ferrandiz y Alcaraz, 1991; Laughton et al., 1991; de Groot and Rauen, 1998; Van Hoorn et al., 2002; Varga et al., 2004). De este modo, se evita la generación de especies oxigénicas reactivas *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos.
- Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (Lindahl and Tagesson, 1997), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa y la superóxido dismutasa (Sudheesh et al., 1999).

De esta forma, los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de los radicales libres y en la formación del radical en sí (van Acker et al., 1996) (Figura 14).

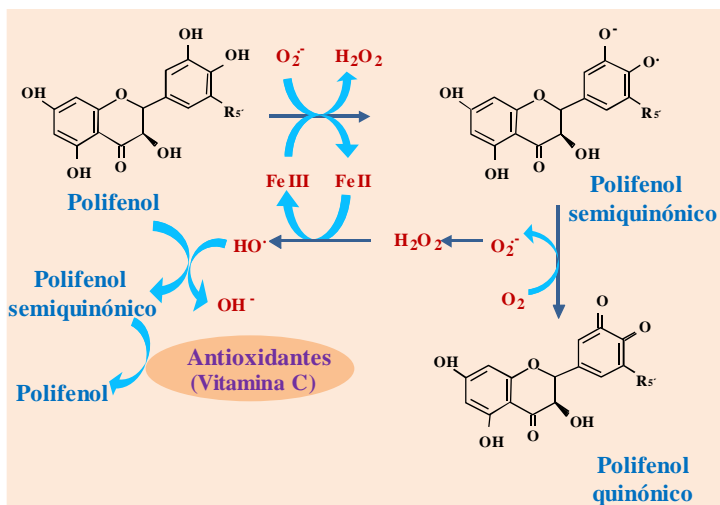


Figura 14. Actuación de los polifenoles como “scavenger” de los radicales libres.

Diversos estudios ponen de manifiesto que presenta mayor poder antioxidante la combinación de polifenoles que los mismos aislados. Los polifenoles aislados, como el galato de epigallocatequina, la quercetina, la diosmetina y el pignogenol, ejercen una protección parcial ante la peroxidación lipídica inducida en la retina bovina y porcina, mientras que la combinación de todos ellos aumenta muchísimo el efecto protector (Valls-Bellés et al., 2004). La fracción de flavonoidea de la cerveza (rubia y negra) protege los efectos tóxicos inducidos por el antibiótico antitumoral adriamicina en las células hepáticas aisladas de rata, disminuyendo la oxidación de lípidos y proteínas, al mismo tiempo que aumenta la viabilidad celular (González et al., 2001). Asimismo, la cerveza protege al ADN contra el daño oxidativo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Valls et al., 2005).

e) Carotenoides

Los carotenoides son hidrocarburos poliénicos sintetizados por las plantas a partir de ocho unidades de isopreno. Se trata de pigmentos responsables del intenso color amarillo, anaranjado o rojo de un gran número de vegetales. Se conocen unos 600 carotenoides aislados, de los cuales unos 50 son precursores de la vitamina A o retinol, siendo el más activo, y cuantitativamente más importante, el β -caroteno.

Los carotenoides se pueden clasificar en dos grandes grupos, los carotenoides hidrocarbonados o carotenos y los oxicarotenoides o xantofilas. Los carotenos son carotenoides que no contienen oxígeno, como los α o β -carotenos o el licopeno, mientras que las xantofilas, como la criptoxantina, cantaxantina y la luteína, son carotenoides oxigenados que contienen grupos carboxilos y/o hidroxilos en sus grupos sustituyentes (Figura 15).

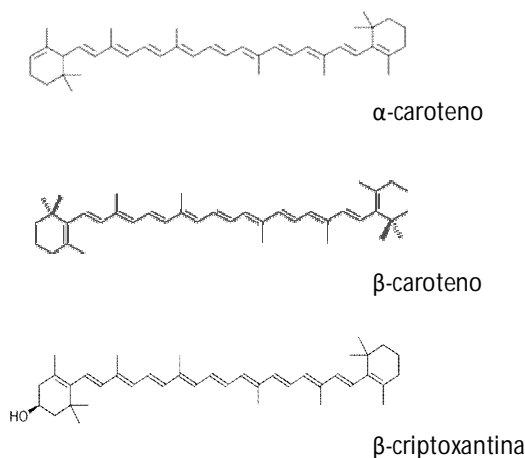


Figura 15. Estructura química de los carotenoides.

Los carotenoides se encuentran en los vegetales fuertemente coloreados de rojo, amarillo o verde, como es el caso del tomate, calabaza, zanahoria, espinacas, melón, etc. La mayor fuente de carotenoides son alimentos vegetales y carnes, en concreto α y β -carotenos, luteína y licopeno. La vitamina A (retinol) se encuentra mayoritariamente en la materia grasa de ciertos alimentos de origen animal como carnes, hígado, yema de huevo, leche, mantequilla, queso y nata. Los carotenoides de los vegetales existen normalmente en la forma all-trans, y los hidroxí-carotenoides como forma libre.

La mayoría de carotenoides pueden absorberse mediante difusión pasiva por la mucosa intestinal (Erdman et al., 1993; Parker, 1996). Los carotenoides provitamínicos pueden ser convertidos en parte en vitamina A en la mucosa intestinal, y tanto éstos como los no provitamínicos son incorporados a los quilomicrones y secretados a la linfa para su transporte a hígado. En el suero humano, se han identificado alrededor de 34 carotenoides, siendo la luteína, la zeaxantina, el licopeno, la β -criptoxantina y el α - y β -caroteno los que representan cerca del 90% o más de los carotenoides circulantes en el hombre (Khachick et al., 1992; 1997).

Se han descrito distintos factores que afectan tanto a la absorción como a su conversión a retinol de los carotenoides de la dieta (El Gorab et al., 1975; Hollander and Ruble, 1978; Erdman et al., 1993; de Pee and West, 1996), siendo la ubicación, la forma física de los carotenoides y el procesamiento de los alimentos los factores más

importantes que afectan a la biodisponibilidad, más que su forma química. Asimismo, el factor más importante de la dieta que influye en la disponibilidad de los carotenoides para la absorción es la co-ingestión de grasa, puesto que en el caso de dietas altas en grasa se ha demostrado que favorecen la absorción (Stahl et al., 2002).

La escisión de los carotenoides provitamínicos a compuestos retinoides es una importante ruta metabólica, teniendo lugar principalmente en el enterocito y, en menor medida, también en el hígado y en otros tejidos. La isomerización puede tener lugar durante y después de la absorción y, por tanto, los carotenoides pueden ser más metabolizados.

Sin embargo, las vías de eliminación de los carotenoides tienen todavía muchas lagunas. Los carotenoides no parecen ser eliminados en orina (Bowen et al., 1993) y son eliminados, sin modificar, en la bilis, tanto en condiciones normales como patológicas (Leo et al., 1995). Sin embargo, la excreción biliar diaria de β -caroteno es del orden de 1% del pool de plasma, sin existir indicios de que el β -caroteno no sea eficazmente reabsorbido en la bilis (Stahl et al., 2002).

Los carotenoides presentan una pronunciada actividad antioxidante (Stahl and Sies, 1993; Olson and Krinsky, 1995), debida a un extendido sistema de dobles enlaces conjugados. Son eficientes antioxidantes contra el oxígeno singlete, el radical peróxido, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas. Sin embargo,

esta actividad depende en gran medida de la concentración de oxígeno existente: en presencia de radicales peroxilos, el β -caroteno es un eficaz finalizador de la cadena oxidativa, siempre y cuando se mantengan las presiones parciales de O_2 bajas; en cambio, si la presión parcial no es baja, prosigue el proceso oxidativo, actuando en este caso de prooxidante. Por tanto, según cuales sean las características fisiológicas actuará de antioxidante o prooxidante (Young and Lowe, 2001) (Figura 16a). Además, la actividad antioxidante también depende de la estructura química de los carotenoides y el efecto acompañante de otros antioxidantes. De hecho, se ha observado que los carotenoides con ocho o más dobles enlaces son mil veces más eficaces a la hora de reaccionar con el oxígeno singlete. En este caso, actúa mediante la transferencia de energía de excitación al β -caroteno, con posterior eliminación de dicha energía en forma de calor (Figura 16b). Igualmente, la acción sinérgica de α -tocoferol y β -caroteno aumenta la capacidad antioxidante de este último, seguramente por protección frente a la autooxidación y también por inhibición de los posibles efectos oxidantes del radical peroxilo de β -caroteno, formado durante la acción antioxidante del mismo. Por último, habría que destacar la eficacia de los carotenoides en la disminución directa de la peroxidación lipídica, así como la habilidad de estas moléculas para modular los niveles de otros antioxidantes (Böhm et al., 2012).

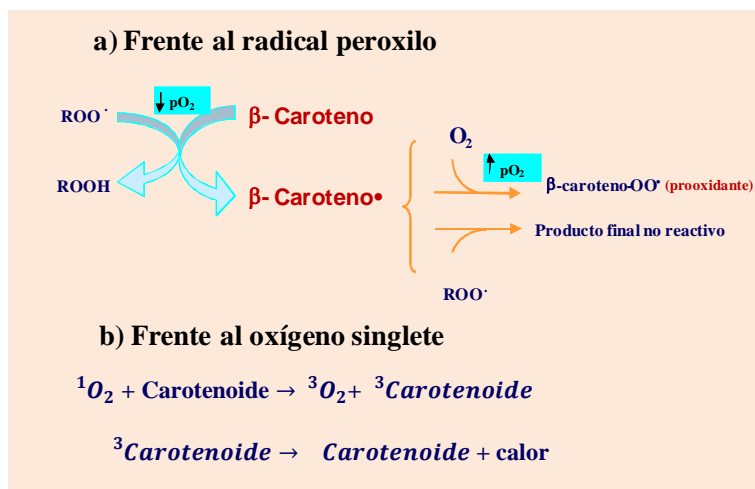


Figura 16. Mecanismos de actividad antioxidante de carotenoides.

I.4. TAMOXIFENO

El tamoxifeno, 1-{4-[2-(dimetilamino)etoxi]fenil}-1,2-difenil-1-buteno, es un fármaco no esteroideo basado en trifeniletileno que presenta acción antiestrógena (Figura 17). Este efecto antiestrógeno se produce con una administración a dosis recomendadas de tamoxifeno y a consecuencia de la existencia de una acción competitiva con los estrógenos para unirse al receptor estrogénico en los órganos diana. Existen diferentes tipos de respuesta como consecuencia de la unión del tamoxifeno al receptor estrogénico: primera, inhibe el crecimiento celular; segunda, es agonista de la inducción de receptores prostagénicos; y, tercera, antagoniza la inducción de la síntesis proteica. El tamoxifeno (TAM) constituye un modulador selectivo del receptor de estrógenos.

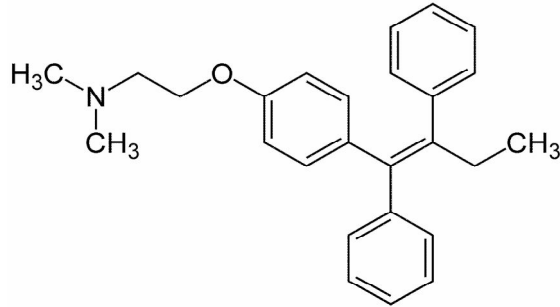


Figura 17. Estructura química del tamoxifeno.

El TAM ha sido utilizado usualmente en el tratamiento del cáncer de mama temprano y avanzado en las últimas décadas, demostrando una eficacia del 50% en la reducción del riesgo de este tipo de cáncer (Vogel et al., 2006). Asimismo, en 1998 se aprobó por la Agencia de Drogas y Alimentos americana el uso de TAM para la prevención de cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad (Fisher et al., 1998). De este modo, el tamoxifeno es usado en el tratamiento y prevención de todas las etapas del cáncer de pecho dependiente de hormonas (Desai et al., 2002; Jordan, 2003).

Además, presenta otros efectos clínicos sobre el metabolismo lipídico y óseo, considerados potencialmente beneficiosos, debido a su efecto agonista parcial, entre los que se encuentran la reducción de las concentraciones de colesterol y de la incidencia de infartos de miocardio y de osteoporosis.

En este sentido, se puede considerar como pauta estándar una dosis de 20 mg/día durante 5 años (Poirier and Schild, 2003).

I.4.1. Metabolismo del tamoxifeno

El tamoxifeno es considerado como un profármaco, ya que es ampliamente conocida su conversión en el organismo en una serie de metabolitos, los cuales son los responsables de una actividad farmacológica mucho mayor que la del propio TAM. El tamoxifeno es metabolizado para dar lugar a distintos metabolitos, mediante un metabolismo primario y secundario el cual es llevado a cabo en el hígado, principalmente por las enzimas del citocromo P450. Y en dicha transformación del tamoxifeno en sus metabolitos secundarios están implicados, en su mayoría, genes pertenecientes a dicha familia del citocromo P450. Las vías más importantes en el metabolismo del tamoxifeno son, de un lado, la conversión de TAM en N-dimetil-tamoxifeno metabolizado predominantemente por CYP3A4 y 3A5; y, de otro lado, la formación de 4-hidroxi-tamoxifeno llevada a cabo por CYP2D6, 2C9, 3A4, 2B6 y 2C19 (Crewe et al., 1997; Brauch et al., 2009).

Por tanto, primariamente el tamoxifeno se convierte en los dos citados metabolitos (N-dimetil-tamoxifeno y 4-hidroxi-tamoxifeno), teniendo ambos capacidad de transformarse en 4-hidroxi-N-dimetil-tamoxifeno. A pesar de que el N-dimetil-tamoxifeno es el metabolito más abundante, no es el responsable de la actividad del tamoxifeno. En cambio, el metabolito 4-hidroxi-tamoxifeno, aunque representa

menos del 10% de la oxidación primaria de tamoxifeno, se ha considerado el principal metabolito desde que fue descrito por primera vez en 1977. Así, su alcance farmacológico es muy importante, al tener un efecto antiestrogénico de 30 a 100 veces superior al del tamoxifeno (Jordan et al., 1977; Clarke et al., 2003; Kiyotani et al., 2012).

Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la relevancia farmacológica del otro metabolito citado, el 4-hidroxi-*N*-dismetil-tamoxifeno, también llamado endoxifeno. La formación de endoxifeno se produce como consecuencia de la oxidación del TAM, dando lugar como intermediario mayoritario al *N*-dismetil-tamoxifeno. Además, el endoxifeno tiene un potencial antiestrogénico 4 veces superior al de 4-hidroxi-tamoxifeno *in vitro* y puede alcanzar concentraciones plasmáticas 6 veces mayores que el 4-hidroxi-tamoxifeno en pacientes que están siendo tratados con TAM (Borges et al., 2006; Brauch et al., 2009).

I.4.2. Toxicidad del tamoxifeno

La detoxificación de la mayoría de fármacos es llevada a cabo en el hígado y, de modo general, da lugar a productos inactivos, pero en ocasiones dicha detoxificación a través del sistema del citocromo P450 puede dar lugar a metabolitos activos potencialmente tóxicos. Un ejemplo de ello es lo que le ocurre al tamoxifeno, cuando es metabolizado por dicho sistema, ya que se trata de un fármaco potencialmente hepatotóxico.

El tamoxifeno presenta un efecto carcinogénico en roedores. En ratas tratadas oralmente con tamoxifeno, éste induce una elevada incidencia de tumores hepáticos. Así, existen estudios carcinogénicos reveladores de que aquellas ratas a las cuales se les había administrado tamoxifeno durante un periodo de tiempo prolongado, presentan tumores malignos hepáticos. Entre dichos estudios, se encuentra uno que demuestra que este efecto carcinogénico hepático del tamoxifeno en ratas, tras la administración de tamoxifeno en diferentes dosis por intubación gástrica durante un periodo de dos años, se incrementa en función de la dosis, aumentándose la incidencia de los tumores hepatocelulares. En este estudio, se destaca como descubrimiento principal, el incremento del número y la temprana aparición de neoplasmas hepatocelulares en ratas tratadas con tamoxifeno comparados con los controles (Greaves et al., 1993). Otro estudio de toxicidad crónica demuestra la potente hepatocarcinogenicidad del tamoxifeno en ratas hembras tras la administración a altas dosis en las condiciones de exposición diaria durante 12 meses, puesto que aparecían múltiples y agresivos tumores hepáticos inducidos por el tamoxifeno, no apareciendo prácticamente tejido normal en los hígados de rata (Hard et al., 1993). Por tanto, el tamoxifeno debe ser considerado como un carcinógeno hepático en ratas.

Es conocido que ciertos tóxicos se caracterizan por ser capaces de inducir daño hepático a causa de su escisión por el citocromo P450 a radicales libres. De modo que el tamoxifeno que es metabolizado en humanos por el citocromo P450 3A4, 2C9, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6,

1A1, 1A2 y 2A6, también es metabolizado en ratas por el citocromo P450s 2B2, 2B1 y 3A en dosis comparables con dosis terapéuticas usadas en humanos (El-Beshbishy, 2005a). En el caso del tamoxifeno ha sido demostrado que, a altas dosis, se convierte en un carcinógeno hepático en ratas, debido a la sobreproducción de especies oxigénicas reactivas que se producen durante el metabolismo del tamoxifeno (Ahotupa et al., 1994; Caballero et al., 2001). Además, la activación metabólica del TAM, no sólo por el citocromo P450, sino también por diferentes peroxidases y por α -oxidación hepática del grupo etilo del TAM, da lugar a una serie de metabolitos que pueden unirse covalentemente con el ADN, lípidos y proteínas e inducir un daño irreversible a estas moléculas biológicamente activas y estructuras de las membranas. Los metabolitos de TAM también pueden ser oxidados por el oxígeno molecular, dando lugar a la formación de ROS (Pagano et al., 2001; Wozniak et al., 2007).

Determinados estudios sugieren que el carcinoma hepatocelular que se desarrolla en ratas a las que se les administró tamoxifeno se debe a la acumulación de aductos de ADN-tamoxifeno y su consecuente daño (Han and Liehr, 1992). Estos aductos de ADN inducidos por el tamoxifeno no han sido detectados en el útero, pero si fundamentalmente en hígado y, en menor medida, en riñones de ratas. La existencia de altas concentraciones de modificaciones covalentes del ADN en hígados de ratas se correlaciona bien con la unión de los metabolitos del tamoxifeno con proteínas hepáticas (Han and Liehr, 1992) y con cáncer de hígado inducido por tamoxifeno en ratas

(Carthew et al., 2001). De este modo, existen evidencias sustanciales de que los tumores hepáticos en ratas son debidos a un mecanismo genotóxico que resulta de la formación de aductos de ADN, por la vía metabólica que involucra la α -hidroxilación del tamoxifeno y N-desmetiltamoxifeno (Gamboa da Costa et al., 2001).

Así, para la formación de aductos de ADN es indispensable la activación metabólica del tamoxifeno. El tamoxifeno es activado por un electrófilo por α -hidroxilación y esterificación secuencial. La α -hidroxilación es catalizada principalmente por el citocromo P450 3A4, mientras que la esterificación parece que se debe a una sulfatación, la cual es catalizada por sulfotransferasas, en particular SULT2A, dando lugar a los metabolitos α -hidroxitamoxifeno y su *O*-sulfato (Gamboa da Costa et al., 2001; Kasahara et al., 2002). Por otro lado, los principales metabolitos, tales como N-desmetiltamoxifeno, tamoxifeno *N*-óxido y 4-hidroxitamoxifeno, son generalmente caracterizados como formas de detoxificación, aunque las formas α -hidroxilo del *N*-desmetiltamoxifeno y del tamoxifeno *N*-óxido son capaces de producir los aductos de ADN (Kasahara et al., 2002). Siendo el principal aducto de ADN resultante de este metabolismo el (E)- α -(deoxiguanosin- N^2 -yl)-tamoxifeno, acompañado de cantidades menores del *Z*-diastereomero y aductos de deoxiadenosina. Otra principal vía de activación del tamoxifeno en el hígado de rata es la *N*-desmetilación seguida por α -hidroxilación (o α -hidroxilación seguida por *N*-desmetilación) para dar α -hidroxi-*N*-desmetiltamoxifeno, el cual será posiblemente esterificado. El principal aducto resultante de

esta vía es (E)- α -(deoxiguanosin-N²-yl)-N-desmetiltamoxifeno. Ambos aductos y sus Z-diastereómeros fueron identificados en la reacción de α -acetoxi-N-desmetiltamoxifeno con deoxiguanosina (Gamboa da Costa et al., 2001).

Además, como consecuencia del metabolismo del tamoxifeno no sólo se produce la formación de aductos, sino que también se conduce al daño hepático oxidativo, el cual es debido a la superproducción de ROS durante dicho metabolismo. La peroxidación lipídica a través de la sustracción de hidrógeno a partir de ácidos grasos insaturados forma radicales lipídicos centrados en carbono. Esta molécula agrega oxígeno molecular para formar radicales peroxilipídicos, iniciando así el proceso de peroxidación lipídica (Tabassum et al., 2006). Igualmente, el tamoxifeno ha demostrado estimular la óxido nítrico sintasa aumentando el peroxinitrito mitocondrial, lo que provoca estrés oxidativo y nitrativo. El óxido nítrico generado en el citoplasma ejerce propiedades antiapoptóticas por mecanismos que implican caspasa-S-nitrosación, considerando que el óxido nítrico producido dentro de las mitocondrias se convierte en proapoptótico por generar peroxinitrito (Nazarewicz et al., 2007). En definitiva, parece ser que el mecanismo de inducción de hepatotoxicidad del tamoxifeno implica la disfunción mitocondrial que provoca esteatosis, debido al deterioro de β -oxidación de los ácidos grasos, llevando a la generación de ROS y el agotamiento del ATP (Tabassum et al., 2006).

I.5. PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS RELACIONADOS CON LOS RADICALES LIBRES

En la actualidad son conocidos muchos procesos fisiopatológicos que, directa o indirectamente, están relacionados con los radicales libres, tales como mutagénesis, transformación celular, cáncer, diabetes, enfermedad del neonato (retinopatía neonatal), enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide, lupus), desórdenes en el sistema nervioso central (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer), envejecimiento, etc. Entre ellos destacaremos tanto la patología cardiovascular como la obesidad (Bondia-Pons et al., 2012; Taverne et al., 2013).

I.5.1. Patología cardiovascular y estrés oxidativo: infancia y adolescencia

La patología cardiovascular consiste en un proceso multifactorial donde están implicados, entre otros, la obesidad, la dislipemia, la diabetes, la hipertensión, la genética, los radicales libres o el estilo de vida, siendo la aterosclerosis el proceso subyacente en la mayoría de los casos de patologías cardiovasculares. Existen múltiples evidencias que indican que los ROS están implicados en este proceso, a través de la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad, contribuyendo a la formación de la placa aterosclerótica o también causando daños en el endotelio, que desempeña un papel clave en la patogenia de las enfermedades cardiovasculares (Madamanchi et al., 2005). En este sentido, los compuestos con actividad antioxidante que

previenen la oxidación de las LDL y el daño endotelial pueden reducir el desarrollo y progresión del proceso aterogénico (Kaliora et al., 2006; Babal et al. 2006). Actualmente, las enfermedades relacionadas con la aterosclerosis (infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares, etc.) son responsables de casi la mitad de las muertes en los países occidentales.

I.5.1.1. Hipótesis de la aterosclerosis

La aterosclerosis es un proceso muy complejo en el que están implicadas las LDL y la proliferación celular en el endotelio (Celermajer et al., 1992). Existen diferentes hipótesis para explicar los procesos asociados al desarrollo de la aterosclerosis:

- Respuesta al daño: esta hipótesis se basa en la propuesta de que el paso inicial sería la disfunción endotelial, produciendo un número de respuestas compensatorias que alterarían las propiedades homeostáticas vasculares normales. Sin embargo, más recientemente se ha constatado que una pared celular endotelial intacta puede desarrollar lesiones ateroscleróticas.
- Respuesta a la retención de LDL: se basa en un aumento en la retención de la LDL dentro de la pared arterial y su asociación con los proteoglicanos. Junto con la unión a proteoglicanos, parecen jugar un papel importante las enzimas lipolíticas y liposomales en la matriz extracelular.
- Modificación oxidativa: se basa en que la LDL modificada químicamente es internalizada por macrófagos. La LDL es

atrapada en el espacio subendotelial donde es susceptible a la modificación oxidativa por células vasculares residentes, tales como células musculares lisas, células endoteliales y macrófagos. La LDL oxidada estimula la quimiotaxis monocítica, impide la salida monocítica y apoya la formación de células espumosas. Una vez formada, la LDL oxidada también provoca la disfunción endotelial y el daño, y las células espumosas se necrotizan debido a la acumulación de LDL oxidada (Steinberg et al., 1989) (Figura 18).

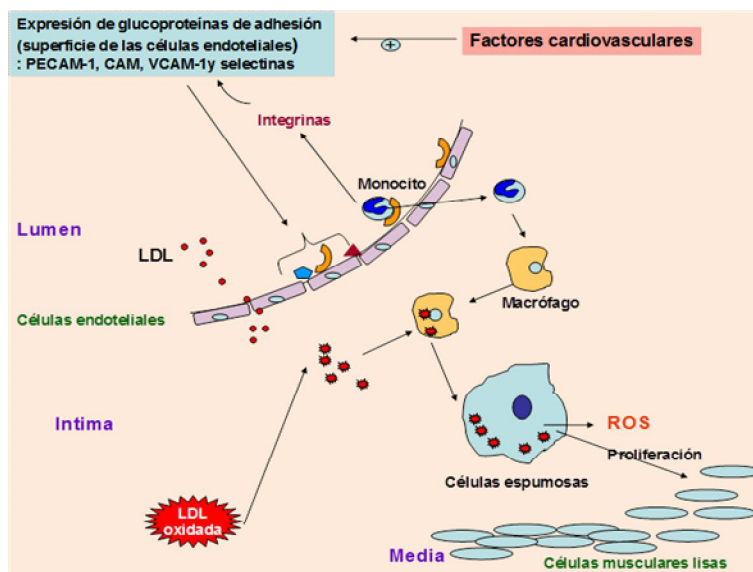


Figura 18. Hipótesis de la aterosclerosis.

En la actualidad, numerosas evidencias muestran que en el proceso de iniciación de la aterosclerosis están implicados los radicales libres, la peroxidación lipídica y la modificación oxidativa de las LDL

(Spiteller, 2003; Zmijewski et al., 2005; Lacroix et al., 2012; Yang et al., 2012), dando mayor validez a la última hipótesis descrita.

En las lesiones ateroscleróticas se ha observado la existencia de diferentes modificaciones oxidativas que tienen lugar sobre la lipoproteína, además de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno por las células vasculares. Por ello, la aterosclerosis se ha representado como un estado de elevado estrés oxidativo caracterizado por oxidación lipídica y proteica en la pared vascular.

Así pues, otros estudios han establecido la presencia de lípidos oxidados (Carpenter et al., 1993; Heinecke, 2006) en dichas lesiones, como consecuencia de la oxidación lipídica, obteniéndose productos como peróxidos, hidroperóxidos, epóxidos, etc. Del mismo modo, cuando las especies reactivas actúan sobre las moléculas de colesterol producen hidroperóxidos de colesterol y oxisteroles. Además, existen evidencias de la oxidación proteica en tales lesiones (Fu et al., 1998; Heinecke, 1999; Heinecke, 2002).

I.5.1.2. Hipercolesterolemia y aterosclerosis

La aterosclerosis constituye un proceso cuyo inicio se encuentra en la infancia, se desarrolla lentamente a lo largo de la segunda y tercera décadas de la vida y suele empezar a manifestarse clínicamente a partir de la cuarta década de la vida. La enfermedad evolucionará influenciada por una serie de factores que ya se encuentran presentes

en la infancia, tales como la obesidad, la hiperlipemia, etc. Y, en la edad adulta, será el efecto conjunto de estos factores los que potencien el riesgo de dicha enfermedad. Existen estudios que demuestran que existe una asociación entre los trastornos del colesterol y el inicio de la aterosclerosis en niños, adolescentes y jóvenes (Berenson et al., 1998, McGill et al., 2000). Asimismo, determinados estudios de seguimiento han afirmado que los sujetos que en la infancia muestran niveles altos en diferentes factores de riesgo cardiovascular, como es el caso de la hipercolesterolemia, tienden a permanecer en esos niveles altos en la adolescencia y en la edad adulta, ayudando a predecir el riesgo cardiovascular (Lauer et al., 1989, Webber et al., 1991; Porkka et al., 1994; Magnussen et al., 2008).

Además, la infancia coincide con el período asintomático, de lo que se deriva la importancia de que el estilo de vida y los comportamientos que afectan al riesgo cardiovascular se aprendan en una época temprana de la vida. Por ello, epidemiólogos, cardiólogos pediátricos y patólogos acuerdan que hasta el 90% de las enfermedades del corazón puede prevenirse eficazmente, debiendo comenzar en la infancia la promoción de estilos de vida saludables, nutrición adecuada y ejercicio (Kones, 2011).

I.5.2. Obesidad y estrés oxidativo: infancia y adolescencia

Los principales determinantes para la generación de ROS o RNS en la obesidad son la familia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX), la respiración mitocondrial, la función del retículo

endoplásmico (RE) y la óxido nítrico sintasa (NOS) (de Ferranti and Mozaffarian, 2008).

En primer lugar, en la obesidad se produce una sobrecarga metabólica como consecuencia de la sobreabundancia de macronutrientes, que inducirá la formación de ROS a nivel celular mediante el ciclo de Krebs. De modo que, cuando la ingesta calórica supera el gasto energético, se produce un aumento de actividad del ciclo de Krebs inducida por sustrato, generando un exceso de ROS. En este sentido, un sobrecarga de glucosa de 75 g indujo un aumento en la generación del radical superóxido en leucocitos y, entonces, los ROS eran liberados en el medio extracelular (Mohanty et al., 2000). También se observó un efecto similar con ingesta de grasas saturadas (Mohanty et al., 2002). Por otra parte, una comida alta en grasas y en carbohidratos inducía una respuesta de estrés oxidativo e inflamatoria más intensa y prolongada con una mayor generación de ROS en los pacientes obesos en comparación con sujetos de peso normal (Patel et al., 2007).

En segundo lugar, existen mecanismos para generar ROS que incluyen sistemas metabólicos específicos, tales como el sistema NOX (Bedard and Krause, 2007) y las acciones de otras oxidasas (lipoxigenasa y xantina oxidasa). El mecanismo responsable por el que se genera una mayor producción de ROS mediada por NOX en los adipocitos no está claro. Se ha demostrado que la hipoxia (Zhang et al., 2010) y las citoquinas inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral y estrés del RE (Moe et al., 2006; Zhang and Kaufman, 2008), inducen

un incremento de los niveles de ARN mensajero de NOX-4. Por tanto, una mayor expresión de NOX-4 y el aumento de la producción de su sustrato nicotinamida adenina dinucleótido fosfato contribuyen, potencialmente, al aumento de la producción del radical superóxido en el tejido adiposo en el contexto de la obesidad. Además, la obesidad está asociada con un aumento en el estrés oxidativo a nivel de las mitocondrias del adipocito, debido a que el procesamiento del exceso de ácidos grasos libres causa un desacoplamiento mitocondrial y una mayor liberación de ROS (Gao et al., 2010). Trabajos recientes sugieren que los ROS mitocondriales actúan como moléculas de señalización para desencadenar la producción de citocinas pro-inflamatorias, uniendo el estrés oxidativo y la inflamación (Bulua et al., 2011).

En tercer lugar, el retículo endoplásmico (RE) es esencial para la regulación del metabolismo de lípidos y proteínas e, igualmente, responsable de la síntesis de proteínas. El plegamiento adecuado de las proteínas y la formación de enlaces disulfuro son fundamentales para la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas y éste es un proceso que consume energía y puede representar el 25% de la generación de ROS celular total (Tu and Weissman, 2004). El almacenamiento del exceso de lípidos conduce a mayor actividad de RE, pudiendo desbordar su capacidad funcional. Así, el denominado “estrés del RE” puede ser iniciado por la creciente demanda de síntesis de nuevas proteínas o por la acumulación de proteínas plegadas de forma incompleta promovida por estímulos inflamatorios

(Malhotra et al., 2008). Además, el estrés del RE conduce a la activación de vías de señalización inflamatorias con una mayor generación de ROS en la mitocondria (Malhotra and Kaufman, 2007).

En este sentido, la excesiva generación de ROS en el tejido adiposo se produce por varios mecanismos fisiopatológicos interrelacionados, incluyendo la sobrecarga metabólica de nutrientes, la disfunción mitocondrial y el estrés del RE. La generación de ROS es perpetuada por una respuesta inflamatoria, alimentando un ciclo vicioso.

Y, por último, la producción de óxido nítrico, a través de la actividad de la isoforma de la óxido nítrico sintasa inducible por señales inflamatorias en los adipocitos (Lamers et al., 2011). Provocando además que, cuando el radical superóxido y el óxido nítrico se producen simultáneamente con cierta proximidad, se genera una reacción que conduce a la formación de peroxinitrito y, posteriormente, a los radicales hidroxilo (Pacher et al., 2007).

En resumen, muchas señales de estrés que se originan en el tejido adiposo dan como resultado unos mayores niveles ROS y RNS, alterando la función de las mitocondrias y RE, pudiendo converger en caminos comunes y, a su vez, regularse mutuamente. Es probable que la regulación coordinada de las vías afectadas por ROS y RNS sea una característica esencial de la obesidad y pueda repercutir en la perpetuación de la inflamación y del estrés oxidativo (Codoñer-Franch et al., 2011).

I.5.2.1. Prevalencia de la obesidad en España

En las dos últimas décadas, la prevalencia de la obesidad infantojuvenil ha presentando una tendencia ascendente, alcanzando cifras alarmantes, lo que ha provocado que en España se consolide el término de “obesidad epidémica”.

En 2011, la Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha desarrollado un estudio, denominado ALADINO (Alimentación, Actividad física, Desarrollo Infantil y Obesidad), que recoge datos actualizados de la prevalencia de la obesidad infantil en España, durante el curso escolar 2010/2011 en 7.923 niños y niñas de 6 a 9,9 años de edad, pertenecientes a todas las Comunidades Autónomas de España. En dicho estudio se ha observado que el exceso de peso en la población infantil española se ha estabilizado en los últimos diez años, si bien afecta al 45,2% de los niños y niñas que se reparte de la siguiente manera: el 26,1% corresponde a sobrepeso y el 19,1% a obesidad. Por género, los niños tienen más exceso de peso que las niñas (26,3% de sobrepeso frente a 25,9% y 22% de obesidad frente a 16,2%).

I.5.2.2. Definición de obesidad

La obesidad constituye un trastorno metabólico que conduce a una excesiva acumulación de energía en forma de grasa corporal en relación con el valor esperado según el sexo, la talla y la edad (Pi-Sunyer, 2000). Pero, en los niños obesos, la definición de obesidad puede no ser tan precisa. De hecho, en la práctica clínica actual existe

acuerdo en la utilización del índice de masa corporal (IMC), para definir la obesidad:

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Talla (m}^2\text{)}$$

Su principal desventaja es que varía con la edad. Por tanto, su valoración se debe realizar mediante curva percentilada o con el cálculo de puntuaciones z . Se define obesidad cuando el $\text{IMC} \geq \text{P95}$ o puntuación $z \geq 1,65$. Para discriminar si se trata de un exceso de grasa (obesidad) o de masa magra (constitución atlética) habrá que realizar la medida del perímetro braquial y del pliegue cutáneo o bien efectuar cálculos de la composición corporal.

En cambio, para los estudios epidemiológicos hay consenso en la utilización de los puntos de corte de Cole, elaborados mediante una extrapolación matemática desde los valores de sobrepeso y obesidad en el adulto hacia edades infantiles, que permite utilizar una definición estandarizada internacional de sobrepeso y obesidad en la infancia (Cole et al., 2000).

I.5.2.3. Tratamiento dietético de la obesidad

En el tratamiento de la obesidad infantojuvenil es fundamental conseguir el peso ideal para la talla, pero manteniendo los aportes nutricionales necesarios para no interferir en el crecimiento. Uno de

los pilares fundamentales tanto de la prevención como del tratamiento de la obesidad infantojuvenil es la dieta.

Los objetivos del tratamiento de la obesidad varían en función de la edad del niño, del tiempo de evolución, de la respuesta a los tratamientos previos y, sobre todo, de la intensidad de la obesidad. El tratamiento dietético se basa en dos estrategias: la corrección de errores y la intervención dietética. Cuando se trata de una obesidad leve es suficiente con corregir los errores, encontrándose entre los más frecuentes una elevada ingesta de grasa a expensas de la disminución de los hidratos de carbono o una distribución de la energía que no se realice siguiendo las siguientes recomendaciones: en primer lugar, el desayuno diario, cuyo aporte calórico (junto con el almuerzo de media mañana) sea cercano al 25% de la energía total diaria y que la leche (o productos lácteos), la fruta y los cereales constituyan componentes obligados del desayuno; en segundo lugar, un número total de comidas no inferior a 4 al día, con una distribución energética del 25% entre desayuno y almuerzo; 30-35% en la comida; 15% en la merienda y el resto en la cena. Otro error debería buscarse en la selección de los menús, ya que es necesario una adecuada cantidad y frecuencia de los alimentos al elaborar los mismos.

No obstante, en las obesidades moderadas será necesaria una intervención nutricional, con una dieta hipocalórica calculada en función de la edad cronológica y teniendo como objetivo controlar el peso corporal de modo que, al no interferir en la talla, se vaya

reduciendo el IMC. Solamente en las obesidades graves habrá que recurrir a dietas hipocalóricas más estrictas, llegando a restringir la ingesta hasta un 25-30% de la recomendada a un niño de la misma edad y sexo. Solamente en casos muy concretos de obesidades mórbidas, se utilizan las dietas de muy bajo aporte calórico, en torno a 500-600 kcal. Éstas últimas deben emplearse durante períodos de tiempo cortos, en régimen de hospitalización y bajo vigilancia de un especialista (Dalmau Serra et al., 2007).

I.6. CONSECUENCIAS A LARGO PLAZO DE LA NUTRICIÓN EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA

Recientemente se ha puesto de manifiesto que la nutrición constituye un factor determinante de la salud. Así, las enfermedades con una base nutricional han adquirido en la actualidad una mayor prevalencia e incidencia, teniendo la mayoría de ellas su inicio en la edad pediátrica, por lo que su prevención debe ser acometida desde la infancia (Ballabriga, 1990; de Rufino-Rivas et al., 2007).

En consecuencia, las etapas preescolar y escolar constituyen un período de riesgo nutricional, por lo que resulta necesario la optimización de la dieta, junto con un estilo de vida saludable, tanto para asegurar un crecimiento y desarrollo adecuados, como para disminuir la incidencia de patologías con base nutricional, tales como las cardiovasculares y la obesidad. Así, se estima que el 50% de las enfermedades cardiovasculares y el 95% de la obesidad se asocian con

factores dietéticos (Ballabriga, 1990; Fernández Segura, 2005; de Rufino-Rivas et al., 2007), constituyendo tanto la infancia como la adolescencia las etapas cruciales para la prevención de dichas enfermedades. Entre las patologías asociadas a la nutrición, se clasifican en a corto plazo, entre las que se encuadran el sobrepeso y la obesidad, la hipercolesterolemia, caries, etc.; y a largo plazo, encontrándose las patologías cardiovasculares, la diabetes, la hipertensión y ciertos cánceres.

Existen unos aspectos primordiales de la niñez y de la adolescencia que inciden en las enfermedades crónicas, tales como la aparición de factores de riesgo durante ese periodo, la persistencia de los mismos a lo largo de la vida y la adquisición de hábitos saludables o insalubres tendentes a persistir durante la vida (OMS, 2003).

En cuanto a las enfermedades cardiovasculares, desde la niñez y la adolescencia se produce el agrupamiento de factores de riesgo, asociándose con la aterosclerosis en los primeros años de la edad adulta y, por tanto, con un mayor riesgo de sufrir dichas enfermedades posteriormente (Bao et al., 1994; Berenson et al., 1998). De modo que, cuando se produce un agrupamiento de trastornos fisiológicos asociados a una resistencia a la insulina, en particular hiperinsulinemia, disminución de la tolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, aumento de los triglicéridos plasmáticos y disminución del HDL-colesterol aparece lo que se conoce como síndrome metabólico (también “síndrome X”) (Reaven, 1988;

DeFronzo and Ferrannini, 1991). Un estudio mostró que los niveles de colesterol sérico en varones blancos adolescentes y jóvenes estaban estrechamente relacionados con el riesgo posterior de mortalidad y morbilidad por enfermedades cardiovasculares (Klag et al., 1993). Otro estudio prospectivo realizado en Finlandia examinó, durante 11 años, la relación entre el síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular en varones de mediana edad. Así, se consideró que el síndrome metabólico explicaba el 18% del riesgo de enfermedad cardiovascular, detectándose este aumento de la mortalidad en fases precoces, incluso antes del desarrollo de la enfermedad cardiovascular y la diabetes (Lakka et al., 2002).

En cuanto a la obesidad, cierto estudio expuso que, si bien el riesgo aparentemente no aumenta en los adultos que tenían exceso de peso a la edad de 1 y 3 años, sí lo hacía después de forma sostenida, independientemente del peso de los progenitores (Whitaker et al., 1997). Otro estudio también mostraba esa continuidad, donde los niños con exceso de peso tenían 2,8 más probabilidades de convertirse en adolescentes con exceso de peso, mientras que los niños de peso inferior al normal tenían 3,6 más probabilidades de seguir así en la adolescencia (Wang et al., 2000). Sin embargo, en un estudio prospectivo de cohorte realizado en el Reino Unido apenas se halló continuidad entre el exceso de peso en la niñez y la obesidad en la edad adulta cuando se usó una medida de la obesidad (porcentaje de grasa corporal para la edad) independiente de la complejión (Wright et al., 2001). En dicho estudio también se observó que sólo los niños

obesos a los 13 años presentaban un mayor riesgo de sufrir obesidad al llegar a adultos, así como que el sobrepeso en la niñez o la adolescencia no conllevaba riesgo adicional alguno para la salud del adulto. Otra observación interesante fue que los niños más delgados, cuanto más obesos se volvían en su vida adulta, mayor riesgo tenían luego de sufrir enfermedades crónicas.

En definitiva, la expresión temprana de las enfermedades crónicas debería tenerse en cuenta debido al hecho de que no solamente aparecen cada vez más precozmente, sino que una vez se presentan tienden a persistir en el individuo afectado a lo largo de toda la vida. Porque aunque existen datos que indican que también se pueden corregir, en realidad, el sobrepeso y la obesidad son particularmente difíciles de modificar una vez que se han arraigado, habiendo un riesgo de que el sobrepeso durante la niñez continúe en la adolescencia y la edad adulta (Dietz, 2001). Asimismo, más del 60% de los niños con exceso de peso tienen al menos un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, como tensión arterial elevada, hiperlipidemia o hiperinsulinemia, y más del 20% tienen dos o más factores de riesgo (Dietz, 2001).

I.7. IMPORTANCIA DE LA DIETA EN LA SALUD

En la actualidad no cabe duda alguna de que la dieta y los comportamientos de riesgo, como el tabaco o el sedentarismo, determinan la salud y el desarrollo de la población. Por ello, la dieta es

muy importante para promover y mantener la buena salud a lo largo de toda la vida. Su función está bien establecida como factor determinante de enfermedades no transmisibles crónicas, convirtiéndose en un componente fundamental en la prevención. En concreto, es la composición de la dieta la que desempeña un papel primordial en el estrés oxidativo, tanto en el daño oxidativo como en los mecanismos de defensa antioxidante. La dieta, a través de los vegetales, frutas y verduras, frutos secos y bebidas procedentes de vegetales (tales como la cerveza y el vino), aporta antioxidantes como vitaminas y otros fitoquímicos, los cuales son una importante fuente exógena capaz de aumentar la respuesta celular al estrés oxidativo. Por tanto, los sistemas de defensa antioxidante, o bien dependen de la dieta o bien están directamente relacionados con ésta (enzimático y reparadores), ya que dependen de otros nutrientes para su correcta funcionalidad (Valls-Bellés et al., 2005) (Figura 19).

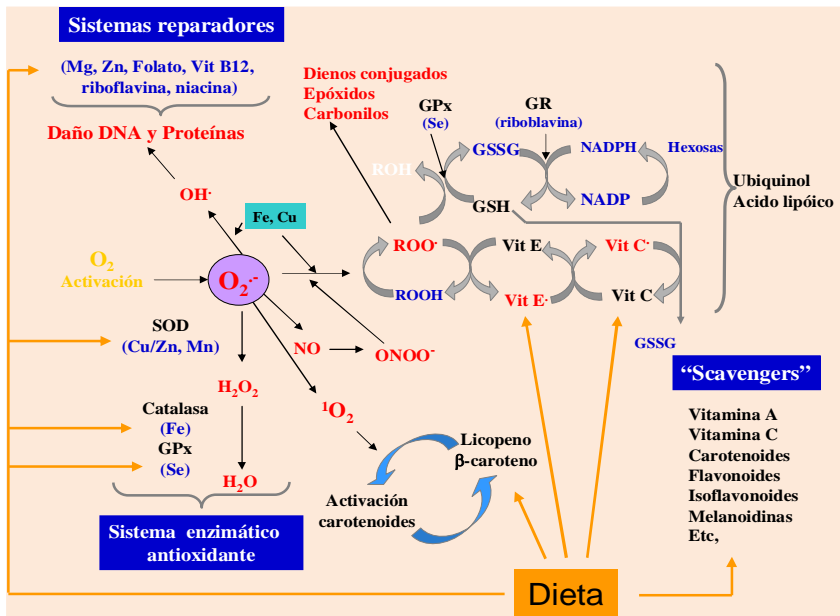


Figura 19. Esquema del metabolismo oxidativo y su relación con la dieta, tomada de Valls-Bellés et al., 2005.

Por un lado, hay que destacar que los estudios realizados en humanos con suplementos farmacológicos de antioxidantes no revelan una evidencia consistente sobre los efectos beneficiosos de esta suplementación, a diferencia de los datos obtenidos en la experimentación animal. Según los estudios llevados a cabo en la Comunidad Europea en el proyecto EUROFEDA, 2002 (Lindsay and Astley, 2002), en el cual se han recopilado y/o llevado a término muchos estudios epidemiológicos sobre suplementación farmacológica de antioxidantes (en concreto sobre vitaminas tales como la vitamina E, C y β -caroteno), se plantean problemas en cuanto a la relación causa-efecto, ya que la mayoría de estudios son a largo plazo y están interferidos por patologías agudas o crónicas. Además,

se ha de destacar que el abuso de suplementos es peligroso debido a su posible papel como prooxidantes. En conclusión, faltan estudios prospectivos y controlados y, por tanto, la escasez de datos no permite una recomendación de forma “sistemática” de suplementos de antioxidantes.

A día de hoy, se conoce que las frutas presentan una serie de características nutricionales, un contenido en minerales y en vitaminas, así como también una serie de compuestos fitoquímicos, que las convierten en beneficiosas para nuestra salud (Cassano et al., 2003). La composición de las frutas presenta tanto los nutrientes imprescindibles para la vida (como hidratos de carbono, grasas, proteínas, etc.), como también dichos compuestos fitoquímicos o bioactivos (tales como carotenoides, compuestos fenólicos, compuestos organosulfurados, vitaminas E y C, etc.), que presentan en común su actividad antioxidante, mostrando un posible efecto protector frente a determinadas enfermedades (Hertog et al., 1994; Giovannucci et al., 1995; Granado et al., 1997; Tribble, 1998; Duthie, 1999; Lampe, 1999; Kurowska et al., 2000; Slattery et al., 2000; Simon et al., 2001; Sánchez-Moreno et al., 2003a; Brandt et al., 2004; Pan et al., 2008). Además, existen diversos mecanismos por los que las frutas y sus constituyentes podrían ejercer un efecto protector, incluyéndose entre ellos los siguientes: en primer lugar, la capacidad de modificar el metabolismo del colesterol, regular la detoxificación de enzimas, estimular el sistema inmune, disminuir la agregación plaquetaria, reducir la presión arterial y actuar sobre la concentración

y metabolismo de las hormonas esteroideas; en segundo lugar, su papel como agente antibacteriano y antiviral; y, en tercer lugar, su actividad antioxidante (Lampe, 1999).

Numerosos datos epidemiológicos y experimentales indican que el consumo de fruta puede estar asociado a una reducción del riesgo de diferentes enfermedades. Un ejemplo de ello son los estudios epidemiológicos de Gey y colaboradores (WHO/Proyecto Mónica, 1991), en los cuales se determinaron los antioxidantes plasmáticos (α -tocoferol, ascorbato, vitamina A, carotenoides y selenio) en 16 poblaciones europeas, mostrando una relación inversa entre la incidencia de mortalidad por cardiopatía isquémica y el nivel de α -tocoferol. Los estudios realizados ponen de manifiesto la elevada diferencia en el consumo de frutas y verduras entre el norte y sur de Europa. Dichos estudios han demostrado una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer en los países del sur de Europa, donde se consume una dieta mediterránea, en relación con los países nórdicos, efecto atribuido en principio a las vitaminas.

En 2000, se publicaba un interesante artículo de revisión por la Oficina de Comunicación del Instituto Nacional del Cáncer de Bethesda (USA), en el que se analizaba la importancia de las frutas y verduras en la prevención de la enfermedad coronaria y en la del cáncer. Dicho trabajo concluía afirmando que la revisión efectuada apoyaba la recomendación de un aumento del consumo de gran variedad de frutas y de verduras, en especial las de hoja verde oscura,

las crucíferas y las ricas en pigmentos amarillo-anaranjados (Van Duyn and Pivonka, 2000). En 2005, se publicaba el “Estudio CARDIA” cuyo objetivo era evaluar la relación entre la dieta y la incidencia de hipertensión en 15 años de seguimiento. Este estudio concluyó que el consumo de fruta estaba inversamente relacionado con la tensión arterial, siendo igual el caso de otros alimentos vegetales como las verduras y legumbres (Steffen et al., 2005). En el “Estudio ATTICA” publicado en 2007 se analizaba la relación entre alimentos y pautas alimentarias y la presencia en la muestra de características metabólicas o fisiológicas asociadas al síndrome metabólico. Este trabajo se realizó con datos recogidos durante 2001 y 2002, procedentes de 1.514 hombres y 1.528 mujeres, de 18 a 89 años de edad, concluyendo que una pauta dietética que incluya frecuentemente frutas, verduras, cereales, legumbres y pescado está inversamente asociada con el perímetro de cintura, el nivel de triglicéridos sanguíneos y la presión arterial, así como directamente asociado con los niveles de HDL-colesterol (Panagiotakos et al., 2007). Otro estudio realizado por Ellingsen y colaboradores en 2008, analizó la relación entre el consumo de frutas y bayas y el espesor de la íntima en la arteria carótida. Este estudio se realizó con 547 hombres de 65 a 75 años, comprobándose tras el análisis de regresión multivariante y el necesario ajuste de los datos para otras variables, como la ingestión de grasa saturada y colesterol, que un mayor consumo de frutas y bayas estaba inversamente relacionado con el espesor de la íntima. Otra publicación del mismo equipo de investigación relaciona este mismo efecto sobre el espesor de la íntima

media con la ingestión de vitamina C procedente de la fruta y las verduras (Ellingsen et al., 2009). Además, otras líneas de investigación han analizado también el efecto de la ingestión de alimentos vegetales de diversa índole sobre los marcadores inflamatorios en suero (Salas-Salvado et al., 2008). Estos estudios avalan la hipótesis de que los antioxidantes naturales procedentes de los alimentos pueden proteger las células del estrés oxidativo.

Así pues, el consumo de frutas, al tratarse de alimentos ricos en compuestos con actividad antioxidante (como son los compuestos fenólicos, los carotenoides o las vitaminas, entre otros), puede prevenir determinadas enfermedades tales como las enfermedades cardiovasculares, la obesidad y el cáncer (McCall and Frei, 1999; Williamson, 1999; Gardner et al., 2000; Block et al., 2001; Schieber et al., 2001; John et al., 2002; Burns et al., 2003; Sánchez-Moreno et al., 2003a; Vioque et al., 2008; Herrera et al., 2009; Riccioni et al., 2009; Poiroux-Gonord et al., 2010; Yamada et al., 2011; Andriantsitohaina et al., 2012). Existiendo numerosos estudios epidemiológicos que demuestran un importante efecto protector por parte del consumo de frutas frente al riesgo de determinadas enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, obesidad, cataratas y degeneración macular (Jacques et al., 1988; Block et al., 1992; Hertog et al., 1993; Sarma et al., 1994; Giovannucci et al., 1995; Varma et al., 1995; Steinmetz and Potter, 1996; Kritchevsky et al., 1998; Law and Morris, 1998; Tribble, 1998; Albanes et al., 2000; Forastiere et al., 2000; Slattery et al., 2000; Virtamo et al., 2000; Jacques et al., 2001;

Simopoulos, 2001; Bazzano et al., 2002; Yuan et al., 2003; Lichtenthäler and Marx, 2005; Maserejian et al., 2006; Nagura et al., 2009; Zhang et al., 2009; Epplein et al., 2010; O'Neil et al., 2012; Polesel et al., 2012; Wang et al., 2012; Isa et al., 2013).

En definitiva, un suplemento de un antioxidante aislado, o de una mezcla de antioxidantes, no resulta equiparable a la complejidad de un alimento. La Organización Mundial de la Salud recomienda una ingesta de 400 g de frutas y verduras al día para poder alcanzar unos niveles óptimos de antioxidantes naturales y prevenir las patologías asociadas a los radicales libres. O, dicho en otros términos, para reducir el riesgo de cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular e hipertensión, para la prevención del aumento excesivo de peso y la obesidad, sobre todo en el caso de niños y adolescentes, o para la prevención de ciertos cánceres, tales como de cavidad bucal, esófago, estómago, colorrectal. Y son los antioxidantes, por sus efectos beneficiosos, junto con determinados cambios en el estilo de vida, como el ejercicio físico, abstenerse de fumar, la moderación en el consumo de alcohol o el mantenimiento de un peso corporal ideal, las principales recomendaciones para reducir el riesgo de muchas patologías relacionadas, directa o indirectamente, con los radicales libres. Por tanto, se debería considerar que el consumo de frutas puede ser de gran importancia como medio de protección frente a dichas enfermedades debido a ese alto contenido en compuestos antioxidantes. Así pues, una dieta rica en estos compuestos desempeñaría un papel clave en la prevención de dichas

enfermedades, ya que parece ser la forma más eficaz de lucha contra las mismas.

I.8. ZUMO DE MANDARINA

I.8.1. Mandarina

El origen de los cítricos se halla en el sudeste asiático, concretamente en China, Indochina e India, existiendo desde hace 20 millones de años. Posteriormente, se han extendido por todo el mundo y han evolucionado a muy distintas variedades. En el siglo XVIII llegó a España, siendo en la actualidad uno de los máximos productores y consumidores. En concreto, la mandarina constituye una de las frutas con mayor producción y cultivo en todo el mundo, aunque los principales productores son China, Brasil, Japón, Marruecos, Estados Unidos y, como hemos citado, España. En España, la máxima productora es la Comunidad Valenciana, donde se produce el 90% de la mandarina del país, seguida de Andalucía, Murcia, Cataluña y Baleares.

I.8.1.1. Variedades de mandarina

La mandarina es el fruto del mandarino, árbol que pertenece a la familia de las Rutáceas, del género de los Citrus y del subgénero aurantioideas. Los frutos, llamados hespérides, tienen la particularidad de que su pulpa está formada por numerosas vesículas llenas de jugo. Aunque la mandarina presenta una forma algo más achatada y de menor tamaño que una naranja, se considera como el cítrico más afín

a ésta última. Es una de las frutas más apreciadas y más consumidas en el mundo, gracias a su sabor más aromático, su pequeño tamaño y la facilidad de quitar su piel.

Las mandarinas se dividen en cuatro tipos varietales básicos, dentro de los cuales se encuentran las diferentes variedades: Clementinas, Clemenvillas, Híbridos y Satsumas.

- **Clementinas:** son frutos de color naranja intenso, de forma esférica aplanada y carecen de semillas. Tienen muy buen sabor y se pelan con facilidad. Se consideran un cruce entre una naranja silvestre de Argelia y una mandarina. Destacan variedades como: Clementina Fina, Oroval, Clemenules, Clemenpols, Oronules y Esbal.
- **Clemenvillas:** son de color naranja rojizo, de tamaño más grande que las anteriores y con mucho zumo. Destaca la variedad Clemenvilla o Nova.
- **Híbridos:** son de color naranja rojizo y de buen tamaño. La corteza se encuentra muy adherida a la pulpa. Esta última posee gran cantidad de zumo y es abundante en azúcares y ácidos orgánicos. Destacan las siguientes variedades: Fortune, Ellendale y Ortanique.
- **Satsuma:** son de color amarillo naranja o naranja asalmonado, de buen tamaño y de forma achatada. La corteza es gruesa y rugosa, y la pulpa de menor calidad gustativa. Es originaria de

Japón. Destacan las siguientes variedades: Clausellina, Okitsu y Owari.

I.8.1.2. Composición de la mandarina

La mandarina se caracteriza por presentar un contenido en agua mayor que el resto de los cítricos, así como un menor aporte en la cantidad de azúcares y, por tanto, un aporte calórico inferior, en torno al 49%, algo menor que el de la naranja, que es del 61%. La cantidad de fibra que contiene es apreciable y ésta se encuentra sobre todo en el albedo (parte blanca de la corteza).

Además, las mandarinas contienen:

- Vitaminas: vitamina C, provitamina A, vitaminas del grupo B: B1, B2, B3, B6 y ácido fólico (B9) (Dhuique-Mayer et al., 2005).
- Minerales: potasio, calcio, magnesio, fósforo (Topuz et al., 2005; Navarro et al., 2011).
- Flavonoides: hesperidina, narirutina, nobiletina (Dhuique-Mayer et al., 2005; Sentandreu et al., 2007; Tounsi et al., 2011).
- Carotenoides: β -criptoxantina, β -caroteno, vitamina A, violaxantina, luteína, zeaxantina, fitoeno, fitoflueno (Dhuique-Mayer et al., 2005; Navarro et al., 2011).
- Otros: ácido cítrico, ácido oxálico.

Con respecto al contenido vitamínico, en la mandarina destaca la vitamina C, aunque se encuentra en menor cantidad que en la naranja. En cambio, las cantidades de ácido fólico y de provitamina A que contiene son mayores que en cualquier otro cítrico. En menor proporción se encuentran las vitaminas del grupo B y el calcio, que presenta peor aprovechamiento que el que procede de los lácteos u otros alimentos que son buena fuente de dicho mineral. También contiene cantidades destacables de ácido cítrico, ácido oxálico, magnesio, potasio y fósforo.

La mandarina también presenta en su composición un elevado contenido en carotenoides, destacando la β -criptoxantina y el β -caroteno. La actividad antioxidante de estos compuestos fitoquímicos y de la vitamina C proporciona al alimento propiedades fisiológicas que van más allá de las nutricionales propiamente dichas.

I.8.1.3. Propiedades de la mandarina

La ingestión habitual de mandarina ha sido relacionada con efectos beneficiosos sobre diferentes enfermedades, en concreto, se ha asociado con una reducción en la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Yamada et al., 2011), con la prevención de la disfunción cognitiva relacionada con la edad y del daño oxidativo (Unno et al., 2011) o como inhibidor de la progresión de la disfunción hepática inducida por una hiperglucemia crónica (diabetes) (Sugiura et al., 2006). Así, cabe indicar, en primer lugar, que la nobiletina atenúa la sobreproducción de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad),

dislipidemia y aterosclerosis en ratones con resistencia a la insulina inducida por la dieta (Mulvihill et al., 2011); en segundo lugar, que la β -criptoxantina derivada de mandarinas (Satsuma) puede ayudar a prevenir la obesidad por represión hipertrófica de los adipocitos abdominales (Takayanagi et al., 2011); y, por último, que la mandarina lleva aparejados efectos tanto antitumorales (Xiao et al., 2009; Lee et al., 2011; Tanaka et al., 2012), como preventivos de la osteoporosis (Yamaguchi, 2012).

Así pues, la mandarina proporciona vitamina C que facilita la absorción de otras vitaminas y minerales, favorece la resistencia a las infecciones e interviene en el desarrollo de huesos, dientes, cartílagos glóbulos rojos y en la formación de colágeno. Además, también aporta provitamina A que, en el organismo, se transforma en vitamina A, siendo un nutriente esencial para el buen funcionamiento del sistema inmunológico y para el desarrollo de la visión, los dientes, el cabello, las mucosas, la piel y los huesos. Otra vitamina que contiene la mandarina es el ácido fólico que interviene en la producción de células sanguíneas, en la síntesis material genético y en la formación anticuerpos del sistema inmunológico. Incluso, debido a ese alto contenido en ácido fólico, el consumo de mandarina resulta adecuado para las mujeres embarazadas, ya que es imprescindible en los procesos de división y multiplicación celular que tienen lugar en los primeros meses de gestación, previniendo malformaciones congénitas incluyendo defectos del tubo neural del feto.

Este cítrico contiene tanto potasio, el cual es necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso, la actividad muscular normal y el correcto desarrollo del metabolismo celular, como calcio, que fortalece huesos y dientes. Y, por su alto contenido en potasio y bajo en sodio, las mandarinas resultan muy recomendables para aquellas personas que padecen alguna patología cardiovascular o hipertensión arterial. La mandarina es una fuente de fibra, fundamental para prevenir el estreñimiento. Asimismo, la fibra tiene un efecto saciante y su ingesta proporciona una menor absorción de colesterol y mejora el control de la glucemia, disminuyendo la hiperinsulinemia y las concentraciones plasmáticas de lípidos, por lo que resulta una fruta indicada para prevenir o mejorar enfermedades como la obesidad, hipercolesterolemia y diabetes. Además, favorece el tránsito de la materia fecal, lo que disminuye el tiempo de contacto de las sustancias nocivas con las paredes intestinales, pudiendo reducir el riesgo el cáncer de colorrectal. El ácido cítrico que posee esta fruta permite la alcalinización de la orina, combatir las infecciones y potenciar la acción de la vitamina C, el cual, junto al elevado contenido en agua y al potasio, proporcionan a las mandarinas un efecto diurético, beneficioso en caso de hiperuricemia y litiasis renal.

En definitiva, cabe destacar el gran contenido en compuestos con actividad antioxidante que contiene el zumo de mandarina (Sendra et al., 2006; Xu et al., 2008) como son los carotenoides (β -criptoxantina y β -caroteno), los flavonoides (hesperidina y narirutina) y la vitamina C, entre otros (Dhuique-Mayer et al., 2005; Fanciullino et al., 2006;

Navarro et al., 2011; Tounsi et al., 2011). Estos compuestos pueden proteger contra el daño oxidativo neutralizando directamente las especies reactivas oxigénicas o modulando la expresión génica que contribuye al estrés oxidativo (Svilaas et al., 2004), de modo que podrían prevenir aquellos procesos fisiológicos o fisiopatológicos relacionados con los radicales libres (Franke et al., 2005). En suma, el zumo de mandarina presenta unas excelentes y particulares características sensoriales y nutritivas que proporcionan una considerable contribución a la salud del consumidor, al tener un elevado contenido en compuestos fitoquímicos. Además, se ha convertido en una de las frutas más populares del mundo y en una de las predilectas de niños y adolescentes, por su sabor dulce y refrescante, su escaso sabor ácido, así como por la suavidad de su pulpa y por su facilidad en el pelado. Como muestra un estudio sobre las aversiones y preferencias alimentarias de los adolescentes, entre las preferencias respecto a las frutas, la mandarina se encuentra entre las frutas preferidas, presentando la segunda puntuación por detrás de la fresa. Y, con respecto a las bebidas, los zumos ocupan también en dicho estudio el segundo lugar, por detrás del agua (de Rufino-Rivas et al., 2007).

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La justificación de la necesidad de este estudio propuesto radica, básicamente, en el hecho de que el estrés oxidativo ha sido asociado con enfermedades degenerativas, como la aterosclerosis, y crónicas, como la obesidad. De hecho, la hipercolesterolemia es uno de los principales factores de riesgo en los procesos ateroscleróticos, existiendo múltiples evidencias indicativas de que, en el proceso de iniciación de la aterosclerosis, se hallan implicados los radicales libres, la peroxidación lipídica y la modificación oxidativa de las LDL (Spiteller, 2003; Zmijewski et al., 2005; Lacroix et al., 2012; Yang et al., 2012), jugando el estrés oxidativo un papel clave en la patogénesis de la aterosclerosis. Asimismo, en la actualidad se conocen cuales son los principales determinantes para la generación de ROS o RNS en la obesidad: la familia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX), la respiración mitocondrial, la función del retículo endoplásmico (RE) y la óxido nítrico sintasa (NOS) (de Ferranti and Mozaffarian, 2008).

Además, en los últimos años, han cobrado especial interés determinados compuestos con capacidad antioxidante, presentes principalmente en las frutas, verduras y sus derivados. Entre ellos, cabe destacar el zumo de mandarina que, a pesar de contener una gran cantidad de compuestos con actividad antioxidante (Sendra et al., 2006; Xu et al., 2008) como son los carotenoides (β -criptoxantina y β -caroteno), los flavonoides (hesperidina y narirutina) y la vitamina C,

entre otros (Dhuique-Mayer et al., 2005; Fanciullino et al., 2006; Navarro et al., 2011; Tounsi et al., 2011) y de su elevado consumo en todo el mundo, no existen datos sobre el potencial efecto antioxidante de zumo de mandarina *in vivo*.

Por todo ello, la falta de un examen integral en el que se valoren conjuntamente los diferentes biomarcadores del estrés oxidativo, así como la ausencia de datos acerca de ciertos parámetros relativos a éste último, ha motivado el diseño de un estudio cuyo objetivo general viene constituido por el análisis del efecto del zumo de mandarina como suplemento dietético, tanto en un modelo animal (rata) tras la administración de un agente inductor de estrés oxidativo (tamoxifeno) a nivel plasmático, hepático y mitocondrial, como en humanos afectados de patologías mediadas, directa o indirectamente, por radicales libres como son la hipercolesterolemia y la obesidad infantil a nivel del metabolismo lipídico y oxidativo.

II.2. OBJETIVOS

Con el propósito de alcanzar este fin, se pueden enumerar los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la capacidad antioxidante del zumo de mandarina.
2. Evaluar la biodisponibilidad del zumo de mandarina en ratas y en humanos.

3. Determinar los diferentes parámetros relacionados con el metabolismo oxidativo, antes y después de la suplementación con zumo de mandarina en ratas, a las cuales se les induce un estrés oxidativo con tamoxifeno a nivel plasmático, hepático y mitocondrial.
4. Determinar los diferentes parámetros relacionados con el metabolismo lipídico y oxidativo, antes y después de la suplementación con zumo de mandarina en niños con hipercolesterolemia y con obesidad.
5. Analizar el efecto del zumo de mandarina, como suplemento dietético, frente a la producción de especies oxigénicas reactivas (ROS), tanto en ratas a las cuales se les induce un estrés oxidativo con tamoxifeno, como en los pacientes con hipercolesterolemia y obesidad infantil.

III. MATERIAL

III.1. REACTIVOS

Los reactivos para las soluciones tamponadas, enzimas, coenzimas, son proporcionados por Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO, USA) y por Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El tamoxifeno (citrato de tamoxifeno) es de Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO, USA). Los disolventes y otros reactivos son de Scharlau (Barcelona, España) y Merck (Darmstadt, Alemania). Los tests enzimáticos de triglicéridos y de colesterol total están comercializados por Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). Los tests de las lipoproteínas de alta densidad colesterol (HDL-c) y de las lipoproteínas de baja densidad colesterol (LDL-c) son comercializados por Abbott Diagnostics (Wiesbaden, Alemania). Los kits para la determinación de los anticuerpos frente a las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) son de Biomedica Medizinprodukte (Wien, Austria). Los kits empleados para la determinación de los antioxidantes totales son de Laboratorios Randox (Barcelona, España). Para la determinación de la alanina y aspartato aminotransferasa se utiliza los kits de Linear Chemicals, S.L. (Barcelona, España). Para la determinación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina se utiliza el kit de la 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). La heparina empleada pertenece a los Laboratorios Farmacéuticos ROVI (Madrid, España). El agua utilizada en las determinaciones es de grado Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

III.2. APARATOS

Los aparatos utilizados en el desarrollo de este trabajo, son los siguientes:

- **Cromatógrafo líquido de alta resolución de Gilson compuesto por:**
 - Sistema de bombeo modelo 321 de Gilson
 - Inyector manual modelo 7725i de Gilson
 - Detector modelo 430 de Kontron Instruments
 - Detector electroquímico modelo Coulochem III Esa
 - Las columnas empleadas son proporcionadas por Teknokroma (Barcelona, España) y por Waters (Milford, MA, USA)

- **Espectrofotómetro:** Kontron Instruments modelo Uvikon 922

- **Centrífugas:**
 - Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo SS-34
 - Centrífuga refrigerada Heraeus, Megafuge 1.0
 - Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5415 R
 - Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Sepatech 200
 - Centrífuga de mesa Heraeus Sepatech, modelo Labofuge Ae
 - Hettich zentrifugen Universal 320 R

- **Analizadores automáticos:**
 - Autoanalizador modular EDDPP-Roche

- **Balanzas:**
 - Balanza de precisión Mettler, modelo AM-100
 - Balanza Ohaus, modelo Navigator TM

- **Otros aparatos:**
 - pHmetro Crison, modelo microph 2001. Hamilton Liq-Glass
 - Homogeneizador: Junke and Kunkel, IKA-Werk, modelo RW 20 DZM
 - Sistemas de tratamientos de agua: Milli Q gradiente A10 de Millipore
 - Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 y Barnstead/Lab-Line modelo Max Q 7000
 - Agitadores magnéticos Minishaker IKA, modelo MS2, Heidolph modelo MR 3001 K y SBS modelo A-163, Lab-Line Instruments Inc. USA
 - Lector de placas: Bio-Rad, modelo BENCHMAK, Microplate reader
 - Ultracongeladores, congeladores y neveras

III.3. ZUMO DE MANDARINA

Los zumos de mandarina utilizados para el estudio se han obtenido de *Citrus clementina Hort. Ex Tan.*, que se trata de la variedad más abundante cultivada en España. Los zumos de mandarina han sido elaborados por un equipo de investigadores del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC) quienes han desarrollado un procedimiento con el que se obtienen zumos pasteurizados refrigerados de calidad sensorial comparable a los recién exprimidos, comercializados por Agricultura y Conservas, S.A. (Valencia, España). Además, con este nuevo proceso se garantiza la estabilidad y la seguridad propia de los zumos tratados térmicamente, obteniéndose un zumo estable desde el punto de vista microbiológico y sin pérdida de sabor. Para los animales, nos proporcionaron un concentrado de zumo de mandarina al 6X. Y a los niños, se les proporcionó zumos pasteurizados refrigerados.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos para la composición del zumo de mandarina. Resalta el hecho de que el zumo presenta un elevado contenido de polifenoles totales, carotenoides totales y vitamina C, siendo el principal glicósido de flavanona obtenido la hesperidina y obteniéndose también elevados niveles de flavonas totalmente metoxiladas [datos obtenidos por colaboración con el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC)].

Tabla 1. Composición del zumo de mandarina.

Energía, kcal/100mL	44,0 ± 2,3
Proteínas, g/100mL	0,60 ± 0,05
Carbohidratos, g/100mL	10,50 ± 0,09
Grasa, g/100mL	<1
Vitamina C, mg/100mL	35,05 ± 1,69
Glicósidos de flavanona, mg/L	31,00 ± 1,46
Narirutina, mg/L	10,53 ± 0,13
Hesperidina, mg/L	19,90 ± 1,33
Didimina, mg/L	0,57 ± 0,01
Flavonas totalmente metoxiladas, mg/L	2,80 ± 0,01
Isosinensetina, mg/L	0,079 ± 0,003
Hexametil-O-gosipetina, mg/L	0,086 ± 0,006
Sinensetina, mg/L	0,228 ± 0,001
Tetrametil-O-isoscutellareina, mg/L	0,025 ± 0,001
Hexametil-O-quercetagetina, mg/L	0,233 ± 0,009
Nobiletina, mg/L	0,852 ± 0,003
Tetrametil-O-escutellareina, mg/L	0,138 ± 0,001
Heptametoxiflavona, mg/L	1,019 ± 0,001
Tangeretina, mg/L	0,144 ± 0,001
Polifenoles totales, mg/L	51,83 ± 1,67
Carotenoides totales, µg/L	698,01 ± 43,76

Los valores están expresados media ± desviación estándar.

III.4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales empleados se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia. Se utilizaron ratas Wistar hembras de 3-4 meses de edad, a las que se les alimentó con dieta estándar IPM R-20 comercializada por Panlab (Barcelona, España) y agua ad libitum. Estuvieron sometidos a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas en una atmósfera controlada del 60% de humedad relativa y 22-24°C de temperatura. La evolución del peso corporal se determinó diariamente durante el mes de tratamiento. Todos los procedimientos para el bienestar de los animales fueron revisados y aprobados por el comité ético.

III.5. ESTUDIO EN HUMANOS

III.5.1. Niños con hiperlipemia

III.5.1.1. Pacientes

Por lo que respecta a los pacientes con hiperlipemia, éstos han sido reclutados desde las consultas externas del servicio de Pediatría del Hospital Universitario del Dr. Peset de Valencia. Así, el presente estudio ha incluido a 48 niños (22 niñas y 26 niños) con edades comprendidas entre los 8 y los 12 años y consultados por la detección de hiperlipemia en un estudio familiar. En este sentido, cabe destacar que el criterio de inclusión se ha realizado mediante medidas antropométricas (índice de masa corporal = $18.56 \pm 0.76 \text{ kg/m}^2$, índice

de masa corporal z -score = 0.60 ± 0.25) y bioquímicas (proteínas totales séricas, albúmina, prealbúmina, y estado férrico), así como por presencia de hipercolesterolemia (colesterol plasmático > 200 mg/dL, LDL colesterol [LDL-c] > 130 mg/dL). Además, todos los niños, con características preadolescentes, no presentan ninguna otra enfermedad, ni aguda ni crónica, su hígado exhibe un funcionamiento normal y tampoco han tomado ningún tipo de medicación durante la duración del estudio. Igualmente, se ha obtenido un detallado historial médico familiar de cada niño y se ha realizado un completo examen físico, el cual incluye parámetros antropométricos y de la etapa de pubertad de acuerdo a Tanner et al. (1966). Por último, adviértase que el estudio ha sido aprobado por el comité ético de investigación clínica del hospital, habiendo recibido, tanto los padres como los niños, la preceptiva información verbal y escrita acerca del mismo y, por ende, emitiendo su consentimiento escrito.

III.5.1.2. Valoración dietética

La valoración del estado nutricional se ha realizado mediante encuestas, tanto retrospectiva de recuerdo 24 horas como prospectiva de registro de 7 días, tanto a tiempo basal, como a las 2 semanas y a las 4 semanas después. A partir de los datos de tales encuestas, se ha estimado la ingesta de energía y de nutrientes, facilitándose a los padres un manual de instrucciones validado que contiene fotografías de las porciones del zumo de mandarina en 3 tamaños (Le Moullec et al., 1996). Además, de un lado, se ha monitorizado a padres y niños para asegurar la comprensión y la conformidad; y, de otro lado, se ha

calculado la composición nutricional usando la base de datos nutricional Alimentación y Salud, BitASDE (General Médica Farmacéutica, Granada, España), la cual está basada en tablas de composición de comidas españolas (Mataix, 2003).

III.5.1.3. Suplementación dietética

Resulta oportuno señalar que los niños han llevado a cabo sus dietas normales durante el estudio. Ahora bien, tanto los padres como los niños han sido entrenados en la suplementación del zumo de mandarina, la cual ha sido llevada en casa y dividida en 2 tomas: una por la mañana de 250 mL y otra por la tarde de 250 mL, durante 4 semanas consecutivas.

III.5.2. Niños con obesidad

III.5.2.1. Pacientes

En cuanto a los pacientes con obesidad, los mismos han sido reclutados desde las consultas externas del servicio de Pediatría del Hospital Universitario del Dr. Peset de Valencia. De este modo, el estudio ha incluido a 40 niños (23 niñas y 17 niños) con edades comprendidas entre los 9 y los 13 años, sobre la base de dos criterios de inclusión: por un lado, un índice de masa corporal z-score ≥ 2 y, por otro, su origen étnico caucásico. En cambio, los criterios de exclusión adoptados se corresponden con cualquier síndrome o enfermedad que pudiera influir en la ingesta dietética, en la distribución de la composición y de la grasa del cuerpo, trastornos endocrinos, uso de medicamentos o hábitos dietéticos inusuales (por

ejemplo, vegetarianismo). Asimismo, téngase en cuenta, de un lado, que ninguno de los niños padece enfermedades crónicas o sufre afecciones inflamatorias, no habiendo participado previamente en un programa estructurado de pérdida de peso o ejercicio; y, de otro lado, que las enfermedades infecciosas fueron descartadas por su historia clínica y exámenes físicos. También en este supuesto todos los sujetos, padres e hijos, recibieron la correspondiente información verbal y escrita acerca del estudio, otorgando su consentimiento por escrito. Finalmente, señalar que el estudio ha sido aprobado por el comité ético de investigación clínica del hospital.

III.5.2.2. Intervención dietética

Los sujetos han sido asignados en dos grupos, uno con dieta hipocalórica (n=20) y otro con dieta hipocalórica suplementada con zumo de mandarina (n=20), pidiendo a los participantes, antes de la intervención dietética, mantener sus hábitos alimentarios y la actividad física. La ingesta de referencia se ha estimado en todos los niños como la media de dos encuestas: una, retrospectiva de recuerdo 24h y, otra, prospectiva de 3 días (2 días laborables y 1 día del fin de semana). En todo caso, los padres e hijos han recibido asesoramiento nutricional, solicitándose un aumento en la ingesta de frutas, verduras y pescado, el consumo de alimentos bajos en lácteos y, por último, una reducción de la bollería y de los artículos de charcutería. Así, el objetivo de la intervención dietética común a ambos grupos ha sido minorar la dieta a casi el 70% de la basal, principalmente reduciendo el consumo de grasas. A tales efectos, conviene subrayar que la

adhesión a la intervención se ha evaluado por medio de registros dietéticos obtenidos cada dos semanas. Nótese, igualmente, que tanto la energía como la toma de nutrientes, basal y después de la intervención, se han calculado usando la base de datos nutricional Alimentación y Salud, BitASDE (General Médica Farmacéutica, Granada, España).

III.5.2.3. Suplementación dietética

Cabe subrayar, en primer lugar, que los niños han llevado a cabo sus dietas hipocalóricas durante el estudio; y, en segundo lugar, que los padres y niños correspondientes al grupo suplementado con zumo de mandarina han sido entrenados en la suplementación del zumo, la cual ha sido llevada en casa y dividida en 2 tomas, una matinal de 250 mL y otra vespertina de 250 mL, a lo largo de 4 semanas consecutivas.

IV. MÉTODOS

IV.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

IV.1.1. Estudio en animales de experimentación

Las ratas fueron anestesiadas con halotano. A continuación, se procedió, rápidamente, a la extracción de sangre intracardíaca en tubos heparinizados los cuales se procesaron para la obtención de plasma. A continuación, se procedió a la dislocación cervical para su sacrificio. Posteriormente, se seccionó longitudinalmente el animal para la extracción del hígado.

Por otra parte, para la determinación de los antioxidantes totales y de la capacidad antioxidante total en plasma, se utilizaron 4 grupos de 8 ratas Wistar cada uno, a las cuales se les extrajo sangre a diferentes tiempos. Una extracción de sangre previamente a la suplementación con zumo de mandarina, que corresponderá con tiempo 0. Y tres extracciones de sangre más, a diferentes tiempos: 30, 60 y 90 minutos, posteriores a la toma de zumo de mandarina concentrado (6 veces) a una cantidad equivalente a 500 mL para una persona de 65 kg de peso y día.

IV.1.1.1. Homogenización del hígado y obtención de aislado de mitocondrias

Para la obtención del homogenado del hígado se utilizó el método descrito por Santos et al. (2002). Se homogeniza el hígado con 5 mL de tampón/1g de tejido (tampón: 250 mM sacarosa, 1 mM EGTA y 5 mM Hepes-KOH, pH 7,4). Posteriormente, se centrifuga a 900g

durante 10 minutos a 4°C. Luego, se filtra el sobrenadante con una gasa triple. Y se extrae 1 mL de homogenado de hígado total para determinar el GSH, al que se le añade 0,1 mL de ácido perclórico al 20%. Y 2 mL de homogenado de hígado total se utilizará para realizar las correspondientes determinaciones.

El resto se utiliza para obtener el aislado de mitocondrias, para ello, se centrifuga a 9000g durante 10 minutos a 4°C. Y se resuspende el pellet con el homogenizador con 15 mL de tampón (250 mM sacarosa, 1 mM EGTA y 5 mM Hepes-KOH, pH 7,4). Se vuelve a centrifugar a 9000g durante 10 minutos a 4°C. Y se resuspende el pellet con 1 mL de tampón/1g de tejido (250 mM sacarosa, 0,5 mM EGTA y 5 mM Hepes-KOH, pH 7,4). Se guarda a -80°C que se utilizará para realizar las correspondientes determinaciones.

IV.1.2. Estudio en humanos

Se realizaron extracciones sanguíneas, tanto antes como después de la suplementación, obteniendo muestras tanto de plasma como de suero que fueron almacenadas a -80°C para, posteriormente, realizar las pertinentes determinaciones.

Por otra parte, para la determinación de los antioxidantes totales, de los carotenoides y de la capacidad antioxidante total en plasma, se requirieron de 9 mujeres voluntarias y sanas a las que se les realizaron diferentes extracciones de sangre. Una primera extracción de sangre previamente a la suplementación con zumo de mandarina, que

corresponderá con tiempo 0. Y tres extracciones de sangre más, a diferentes tiempos: 45, 90 y 135 minutos, posteriores a la toma de 500 mL de zumo de mandarina.

IV.2. ENSAYOS EN ZUMO DE MANDARINA Y EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DE HUMANOS

IV.2.1. Determinación del ABTS en zumo de mandarina y en plasma

Para la determinación de la capacidad antioxidante total se siguió el método del ABTS^{•+} de Miller y Rice Evans (1997) modificado por Re et al. (1999), basado en la oxidación del ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] por el persulfato potásico para formar el radical ABTS^{•+}, el cual es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. La generación del reactivo ABTS^{•+} se realiza mezclando ABTS 7 mM con la solución de persulfato potásico 2,45 mM en una proporción 1:1. La determinación de la actividad antioxidante total se realiza espectrofotométricamente a 734 nm añadiendo alícuotas de las muestras (30 µl de zumo de mandarina en 3 ml de reactivo ABTS^{•+} o 10 µl de plasma en 3 ml de reactivo ABTS^{•+}). Los resultados se expresan como TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox), utilizando una recta de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox.

IV.2.2. Determinación del FRAP en zumo de mandarina y en plasma

Este método se basa en el estudio del poder reductor de la muestra de zumo de mandarina o del plasma basado en el método de Benzie y Strain (1996). La mezcla de la reacción se prepara mezclando 10 volúmenes de acetato sódico 300 mM pH 3,6, 1 volumen de TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina) 40 mM y 1 volumen de FeCl_3 20 mM. A 2,970 o 2,950 mL de la mezcla de reactivo se le añade 30 μL de zumo de mandarina o 50 μL de plasma. La mezcla reactiva se incuba a 37°C durante 30 minutos en oscuridad. Se centrifuga y se lee espectrofotométricamente a 593 nm. Los resultados son expresados como Fe(II) usando una recta de calibrado con diferentes concentraciones de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

IV.2.3. Determinación del DPPH en plasma

Se siguió el método de Brand-Williams de 1995, usando el radical estable 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). El DPPH 1 mM se disuelve con etanol absoluto. 300 μL de sobrenadante (se diluye 100 μL de plasma en 900 μL de metanol y se toman 300 μL del sobrenadante) se mezclan con 1,2 mL de reactivo que tiene su máximo de absorción a 517 nm. Se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos, tiempo necesario para la estabilidad de la muestra, se centrifuga y se determina espectrofotométricamente a 517 nm. Los resultados se expresan como TEAC (capacidad antioxidante de Trolox), utilizando una recta de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox.

IV.2.4. Determinación de la actividad estabilizadora del radical hidroxilo en el zumo de mandarina

Se utilizó el método de la desoxirribosa, expuesta a la degradación oxidativa por el radical hidroxilo generado a través de la reacción de Fenton, siguiendo el método de Halliwell et al. (1987) con modificaciones de Rivero et al. (2005). Para un volumen de 1 mL se utiliza la siguiente mezcla reactiva: 10 μL de desoxirribosa 100 mM, 10 μL ácido ascórbico 60 mM, 10 μL H_2O_2 1 mM, extracto de zumo de mandarina (5, 10, 50 ó 100 μL), 10 μL de FeCl_3 10 mM, 10 μL de EDTA 10 mM y tampón fosfato de sodio 24 mM en 15 mM de NaCl pH 7,4. Se incuban todos los tubos a 37°C durante 1 hora, transcurrido este tiempo se añadía 1,5 mL de ácido tricloroacético al 2,8%, 1mL de ácido tiobarbitúrico al 1% y se incubaba a 100°C durante 15 minutos. Se deja enfriar y se lee la absorbancia a 532 nm. Los resultados se expresan como % de inhibición.

IV.2.5. Determinación de la capacidad estabilizadora del radical superóxido en el zumo de mandarina

La actividad de “scavenger” frente al radical superóxido fue evaluada mediante un método espectrofotométrico de acuerdo a Liu et al. (1997). El radical superóxido se genera mediante la oxidación del fenazina metasulfato-b-nicotinamida adenina dinucleótido por el NADH y se determina por la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT). En nuestro experimento, el radical superóxido se genera en 3 mL de tampón Tris/ClH 16 mM a pH 8,0 que contiene 78 μM de NADH, 50 μM de NBT y 10 μM de metosulfato de fenacina y zumo

de mandarina (100, 200 y 400 μL). Al reaccionar el radical superóxido y el NBT se produce un compuesto coloreado que absorbe a 560 nm. Los resultados se expresan como % de inhibición.

IV.2.6. Determinación de antioxidantes totales en plasma tras la ingesta de zumo de mandarina

Para la determinación de los niveles de antioxidantes totales se utilizó el kit Total Antioxidant Status de Laboratorios Randox (Barcelona, España) del modo siguiente: el ABTS se incubaba con peroxidasa y H_2O_2 para dar a la formación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Este radical presenta una coloración verde-azulada relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de la coloración, siendo esta supresión, proporcional a la concentración de antioxidantes.

IV.2.7. Determinación de carotenoides en plasma

Se utilizó la técnica de Talwar et al. (1998). A 200 μL de plasma se añade agua destilada hasta un volumen de 1,1 mL. Se añaden 70 μL de etanol al 0,01% de ácido ascórbico. Posteriormente, se añaden 2 mL de hexano, se vortea y centrifuga a 2.500 rpm durante 20 minutos. La parte del hexano, aproximadamente 1,2 mL, se evapora con nitrógeno. A continuación, el residuo se resuspende con 50 μL de tetrahidrofurano. Se voltea durante 1 minuto y se le añaden 100 μL de fase móvil. Se inyectan 50 μL al HPLC. Condiciones cromatográficas: se utiliza una bomba Gilson de gradiente, con una columna YMC^{TM} Carotenoid 5 μm de tamaño de partícula (250 x 4,6 mm) de fase

estacionaria C₃₀ de Waters. La fase móvil es metanol/metil tert-butil éter de 80:20 a 10:90, en gradiente. La velocidad de flujo es 0,8 mL/min y la absorbancia se mide a 450 nm.

IV.2.8. Determinación de la alanina aminotransferasa en plasma

Para la determinación de la alanina aminotransferasa se utilizó el kit Linear Chemicals, S.L. (Barcelona, España). La alanina aminotransferasa (ALT) cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al cetoglutarato con la formación de glutamato y piruvato. Éste último es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de nicotiamida adenina dinucleótido reducido (NADH). La reacción se controla cinéticamente a 340 nm a través de la disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD⁺, proporcional a la actividad ALT en la muestra. El procedimiento consiste en lo siguiente: se pipetea en la cubeta un 1 mL del reactivo de trabajo que contiene: tampón TRIS 150 mmol/L pH 7,3, L-alanina 750 mmol/L, lactato deshidrogenasa > 1350 U/L, NADH 1,3 mmol/L, 2-cetoglutarato 75 mmol/L, así como 50 µL de muestra o control. Se mezcla suavemente por inversión y se inserta la cubeta en el compartimiento termostatado del espectrofotómetro y se pone el cronómetro en marcha. Se incuba durante 1 minuto y se anota la absorbancia inicial. Se repiten las lecturas exactamente a los 1, 2 y 3 minutos. Finalmente, se calcula la diferencia entre absorbancias y el promedio de los resultados para obtener el cambio promedio en absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

IV.2.9. Determinación de la aspartato aminotransferasa en plasma

Para la determinación de la aspartato aminotransferasa se utilizó el kit Linear Chemicals, S.L. (Barcelona, España). La aspartato aminotransferasa (AST) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al cetoglutarato con la formación de glutamato y oxalacetato. Éste último es reducido a malato por la malato deshidrogenasa (MDH) en presencia de nicotiamida adenina dinucleótido reducido (NADH). La reacción se controla cinéticamente a 340 nm a través de la disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD^+ , proporcional a la actividad AST en la muestra. El procedimiento consiste en lo siguiente: se pipetea en la cubeta un 1 mL del reactivo de trabajo que contiene tampón TRIS 121 mmol/L pH 7,8, L-aspartato 362 mmol/L, malato deshidrogenasa > 460 U/L, lactato deshidrogenasa > 600 U/L, NADH 1,3 mmol/L, 2-cetoglutarato 75 mmol/L, así como 50 μL de muestra o control. Se mezcla suavemente por inversión. Se inserta la cubeta en el compartimiento termostatado del espectrofotómetro y se pone el cronómetro en marcha. Se incuba durante 1 minuto y se anota la absorbancia inicial. Se repiten las lecturas exactamente a los 1, 2 y 3 minutos. Finalmente, se calcula la diferencia entre absorbancias y el promedio de los resultados para obtener el cambio promedio en absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

IV.2.10. Determinación del malondialdehído en suero y en homogenado de hígado total

La determinación del malondialdehído (MDA) se realizó mediante la técnica de Mateos et al. (2005). Se pipetea 250 μL de muestra (suero o homogenado de hígado total) en un eppendorf y se le añaden 50 μL de hidróxido sódico 6M, incubándolo en un baño de agua a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante media hora. A continuación, se añade 125 μL de ácido perclórico 35% (v/v) y se centrifuga a 2800g durante 10 minutos. Se transfiere 250 μL del sobrenadante a un eppendorf y se mezcla con 25 μL del reactivo derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina, preparado como una solución 5 mM en ácido clorhídrico 2 M. Finalmente, la mezcla de reacción se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se inyecta una alícuota de 50 μL en el HPLC. Las condiciones cromatográficas utilizadas consisten en una columna Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula), mediante un modo isocrático con una mezcla de ácido acético al 0,2 % (v/v) en agua MilliQ y acetonitrilo (62:38, v/v). La velocidad de flujo es de 1,4 mL/min a temperatura ambiente. Los cromatogramas se adquieren a 310 nm.

IV.2.11. Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas

La oxidación proteica se mide por la cuantificación de los grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos, según el procedimiento desarrollado

por Levine et al. (1990), con algunas modificaciones de Tian et al. (1998). La DNFH unida a proteínas se cuantifica colorimétricamente tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina. Se centrifugan las muestras a 13.000 rpm durante 10 minutos y se cogen 20 μ L de muestra y se añaden 400 μ L de DNFH 10 mM/HCl 2,5 M a las muestras y 400 μ L de HCl 2,5 M a los controles. Se incuban 1 hora a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Se añaden 1 mL de ácido tricloroacético al 100%. Se deja a 4°C durante 15 minutos. Se centrifugan a 12.600 rpm durante 3 minutos. Se recoge el pellet y se lava con 1 mL de etanol/acetato de etilo (1:1, v/v). Se deja nuevamente a 4°C durante 10 minutos. Se centrifugan otra vez a 12.600 rpm durante 3 minutos y se recoge el pellet. Se repite el lavado. Finalmente, se añade 1,5 mL de guanidina 6 N a pH 2,3. Se incuba a 37°C durante 30 minutos. Se centrifuga a 12.600 rpm durante 3 minutos. Se mide a una $\lambda= 373$ nm en cubeta de cuarzo.

IV.2.12. Extracción y digestión del ADN de tejidos

Se homogeniza 0,1-0,3 g de tejido en 4 ml de tampón de extracción (Tris/HCl 1 M a pH 7,5, NaCl 4 M y EDTA 0,5 mM a pH 8) y se añade 0,2 mg/mL de Proteinasa K y SDS al 16 % a una concentración final de 0,5%, se incuba a 55 °C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se vierte a un tubo de gel (vacutainer SST, ref: 368510) y se añade 1 volumen de mezcla de cloroformo/isoamilalcohol (24:1, v/v) y se centrifuga. Esta etapa se repite tres veces hasta que la muestra esté totalmente limpia. Se

decanta a un tubo estéril y se precipita el DNA, añadiendo NaCl 4 M a una concentración final de 0,2 M y 1 volumen de etanol al 100%. Finalmente, se lava el ADN con etanol al 70% en frío. Se resuspende con tampón TRIS/HCl 10 mM a pH 7 para realizar de inmediato la digestión (Gupta, 1984; Thomas et al., 1989).

La digestión del ADN se realizó siguiendo el método descrito por Floyd et al. (1988) con ligeras modificaciones (Muñiz et al., 1995). Se diluyen 400 µg de ADN en tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,0 hasta un volumen de 100 µL en un eppendorf previamente autoclavado. Se añade DNasa I (1U/µg de ADN) y se incuba a 37° C durante 1 hora. Posteriormente, se añade 30 µL de acetato de sodio 0,5 M a pH 5,1 y Nucleasa P1 (1U/40 µg de ADN), y se incuba nuevamente a 37° C durante 1 hora. Finalmente, se agrega Tris/HCl 0,4 M a pH 7,5 para que el volumen final sea de 200 µL y Fosfatasa Alcalina (1U/40 µg de ADN), se incuba a 37° C durante 1 hora.

IV.2.13. Determinación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en el ADN

Para la determinación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) se utilizó el kit de la 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA (Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Este ensayo se basa en la competencia entre 8-OHdG y un conjugado de 8-OHdG-acetilcolinesterasa (8-OHdG Tracer) para una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal de 8-OHdG. Porque la concentración del 8-

OHdG Tracer se mantiene constante, mientras que la concentración de 8-OHdG varía, la cantidad de 8-OHdG Tracer que es capaz de enlazar con el anticuerpo monoclonal de 8-OHdG será inversamente proporcional a la concentración de 8-OHdG en el pocillo. Este complejo anticuerpo-8-OHdG se une a IgG anti-ratón policlonal de cabra que se ha colocado previamente en el pocillo. La placa se lava para quitar cualquier reactivo no unido y luego se añade el reactivo de Ellman (que contiene el sustrato para la acetilcolinesterasa) al pocillo. El producto de esta reacción enzimática tiene un distintivo color amarillo y absorbe fuertemente a 412 nm. La intensidad de este color determinada espectrofotométricamente, es proporcional a la cantidad de 8-OHdG Tracer unido al pocillo, que es inversamente proporcional a la cantidad de 8-OHdG libre presente en el pocillo durante la incubación.

IV.2.14. Tratamiento de la sangre para la determinación del glutatión reducido y hemoglobina

Se toma una alícuota de sangre heparinizada y se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se separa el plasma y se congela a -80°C. Las células se transfieren a un tubo cónico de vidrio, se le añade aproximadamente la misma cantidad de agua MiliQ (1,5 mL células + 1,5 mL agua). Posteriormente, se deja a 4°C durante 2 horas para que se hemolice (determinación de hemoglobina). A 1,88 mL del hemolizado se añade 0,8 mL de mezcla cloroformo/etanol (3:5, v/v) frío y 0,3 mL agua MiliQ. Se centrifuga a 4.000 rpm durante 10

minutos y del sobrenadante se determinan los niveles de glutatión reducido (Maral et al., 1977).

IV.2.15. Determinación de la hemoglobina en sangre

A 20 μL de muestra obtenida tras 2 horas de hemolización se le añaden 5 mL de solución Drabkin [Drabkin's reagent 525-2, de Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO, USA)], se mezcla e incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se lee la absorbancia a 540 nm (Drabkin and Austin, 1935).

IV.2.16. Determinación del glutatión reducido

La cuantificación del glutatión reducido (GSH) se llevó a cabo mediante la técnica de Brigelius et al. (1983) de la glutatión S-transferasa. A 50 μL de muestra se le añaden 1,5 mL de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 y 20 μL de dinitroclorobenceno. Se dispara la reacción con 10 μL de glutatión S-transferasa. Y se mide la absorción de GSH hasta que se sature. El complejo formado absorbe luz a una longitud de onda de 340 nm, siendo proporcional el cambio de extinción medido espectrofotométricamente a la cantidad de GSH presente en la muestra.

IV.2.17. Determinación de α -tocoferol en plasma y en homogenado de hígado total

Se utilizó la técnica de HPLC de Arnaud et al. (1991). Se toman 200 μL de muestra y se mezclan con 100 μL de etanol, se añaden 500 μL de hexano, se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se recoge la

fase orgánica, la cual se lleva a secado con N₂ seco; y, finalmente, se resuspende con 200 µL de fase móvil. Se inyectan 50 µL en el HPLC. Las condiciones cromatográficas utilizadas consisten en una columna Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula), mediante un modo isocrático con una mezcla de diclorometano/acetonitrilo/metanol (20:70:10, v/v/v). La velocidad de flujo es de 1,2 mL/min a temperatura ambiente. Los cromatogramas se adquieren a una λ de 291 nm.

IV.2.18. Determinación del ácido ascórbico en plasma

La cuantificación del ácido ascórbico se realizó utilizando la técnica de Martin y Frei (1997). El ácido ascórbico se midió mediante el mismo equipo de HPLC con un detector electroquímico. Para ello, la muestra se mezcla con un volumen igual de ácido metafosfórico al 5% que contiene 1 mmol/L de ácido dietilenetriaminapentaacético. Se centrifuga para eliminar el precipitado de proteínas, obteniendo un sobrenadante que se inyecta en el HPLC. Las condiciones cromatográficas utilizadas consisten en una columna LC8 (150 x 4,6 mm, 3 µm de tamaño de partícula). Usando como fase móvil una mezcla de agua MiliQ y de metanol que contiene 40 mmol/L acetato de sodio y 1,5 mmol/L fosfato de dodeciltrietilamonio (99:1, v/v). Los cromatogramas se adquieren aplicando un potencial de +0,6V.

IV.2.19. Determinación de la actividad NADH-ubiquinona oxidorreductasa (Complejo I) en la cadena de transporte electrónico

La actividad de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa (E.C.1.6.5.3.) se cuantificó espectrofotométricamente siguiendo la oxidación del NADH (Santos et al., 2002). La muestra se somete a 2-3 ciclos de congelación y descongelación con la finalidad de romper las membranas. Se añaden 25 μL de muestra con una concentración de proteína de 1 mg/mL a la cubeta, incubándose durante 1 minuto a 25°C con tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7,4, 1 mM EDTA, 60 μM decilubiquinona disuelta en etanol, 2 $\mu\text{g/mL}$ antimicina A en etanol. La reacción se desencadena con 10 μL de NADH a una concentración final de 75 μM y se mide espectrofotométricamente la disminución de la actividad a 340 nm durante un minuto, considerando un coeficiente de extinción molar $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

IV.2.20. Determinación de la actividad citocromo oxidasa (Complejo IV) en la cadena de transporte electrónico

La medición de la actividad de la citocromo oxidasa (E.C.1.9.3.1.) se basa en la oxidación del citocromo C reducido (Santos et al., 2002). Para obtener el citocromo C reducido, se disuelve el citocromo C oxidado en H_2O con ditionito sódico en exceso, posteriormente se pasa por una columna PD-10-Sephadex G25 M (Farmacia-LKB). Se incuba 3 mL de tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7 con n-dodecil β -D-maltósido al 0,45 mM y citocromo C reducido a una

concentración final de 15 μM a 25°C durante 1 minuto. Se adicionan 25 μL de muestra de mitocondrias a una concentración de proteína de 0,6 mg/mL para iniciar la reacción de la citocromo oxidasa y espectrofotométricamente se mide la disminución de esta actividad a una longitud de onda de 550 nm durante un minuto (coeficiente de extinción molar de 19,1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

IV.2.21. Determinación de los coenzimas Q₉ y Q₁₀ en la mitocondria

Para la cuantificación de los coenzimas Q₉ y Q₁₀ en aislado de mitocondrias se utilizó el método de Takada et al. (1984) modificado por Lass y Sohal (1999). A 250 μL de suspensión (1 mg/mL de proteína) se añaden 750 μL de una mezcla de hexano/etanol (5:2, v/v). Se agita durante 1 minuto y se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos. Se recoge la fase de hexano (400 μL) en un tubo limpio y se añade al resto 750 μL de la mezcla hexano/etanol y se repite de nuevo el proceso dos veces. Finalmente, se evapora el extracto de hexano con N₂ y se resuspende la muestra con 200 μL de etanol. Se inyecta 50 μL en el HPLC. Las condiciones cromatográficas corresponden a una columna C18 de fase reversa 250 x 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula y precolumna de 150 x 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula, con una fase móvil: 7,0 g de NaClO₄.H₂O en 1000 mL de etanol/metanol/70% HClO₄ (900:100:1, v/v/v) y una velocidad de flujo de 1 mL/min. La absorbancia se mide a 275 nm.

IV.2.22. Determinación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Markwell et al. (1978), que constituye una modificación de la de Lowry et al. (1951). La técnica se basa en la formación de un compuesto coloreado al interaccionar el reactivo de Folin-Ciocalteu con los grupos fenólicos e indólicos de los aminoácidos integrantes de las proteínas cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 600 nm.

IV.2.23. Pruebas bioquímicas en humanos

Para la determinación de la glucosa sérica, la insulina y el ácido fólico se emplearon métodos directos automatizados (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania). El índice de evaluación con el modelo homeostático (HOMA-IR) se utilizó para determinar la resistencia a la insulina utilizando la siguiente fórmula: los niveles de insulina en ayunas (IU/L) x glucosa en ayunas (mmol/L) / 22,5.

IV.2.24. Mediciones antropométricas en humanos

En relación con las distintas mediciones realizadas, cabe indicar, en primer lugar, que las de orden antropométrico, tales como peso, altura, circunferencia de cintura y cadera, pliegue del tríceps y subescapular, se obtuvieron utilizando técnicas estándares (Elberg et al., 2004); en segundo lugar, que el grado de obesidad se determinó utilizando el índice de masa corporal z-score calculado con el método de lambda, mu, sigma (LMS) (Cole et al., 2000); y, por último, que el porcentaje

de masa grasa fue determinado mediante impedancia bioeléctrica (BC-418MA, Tanita Europe BV, Hoofddorp, Holanda).

IV.2.25. Determinación de los triglicéridos en suero

Para la determinación de los triglicéridos se empleó el correspondiente test enzimático, utilizando el autoanalizador Modular Analytics Evo comercializado por Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El método se basa en las siguientes reacciones acopladas: los triglicéridos se someten a la acción de la lipoprotein lipasa que produce una hidrólisis rápida y completa a glicerol. Posteriormente, y tras fosfatación, se produce dihidroxiacetonafofato y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de un cromógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol formará un compuesto coloreado (4-fenazona) que es directamente proporcional a la cantidad de triglicéridos presentes en la muestra.

IV.2.26. Determinación del colesterol total en suero

Para la determinación del colesterol total se empleó el correspondiente test enzimático, utilizando el autoanalizador Modular Analytics Evo comercializado por Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El método se basa en la hidrólisis de los ésteres de colesterol presentes en la muestra por la colesterol esterasa dando lugar a colesterol libre y ácidos grasos. Posteriormente, y tras oxidación enzimática con la colesterol oxidasa, se formará peróxido de hidrógeno y colesteroína. Finalmente, este peróxido de hidrógeno se valora por la reacción de Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-aminofenazona, en

presencia de peroxidasa, formando una benzoquinona, cuya coloración es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

IV.2.27. Determinación de la HDL-colesterol en suero

La determinación de HDL-colesterol se realizó con el test Ultra-HDL usando System Architect c800 de Abbott Scientific (Madrid, España). Este método se basa en la aceleración de la reacción de la colesterol oxidasa con colesterol no esterificado no-HDL y la disolución selectiva del HDL usando un detergente específico. Primero, el colesterol no esterificado no-HDL se somete a una reacción enzimática y el peróxido generado se consume por una reacción de peroxidasa con N,N-bis(4-sulfobutil)-m-toluidina-disódica. Después, mediante un detergente (capaz de solubilizar el HDL-colesterol), la colesterol esterasa y el acoplador cromogénico se desarrolla el color para la determinación cuantitativa del HDL-colesterol.

IV.2.28. Determinación de la LDL-colesterol en suero

Para la determinación de las LDL-colesterol se utilizó el test Multigent Direct LDL usando System Architect c800 de Abbott Scientific (Madrid, España). Este método se basa en un polímero polianiónico que solubiliza las lipoproteínas no-LDL, permitiendo que la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa consuman el colesterol ligado a ellas. Un detergente no iónico solubiliza las LDL, permitiendo la reacción completa de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa con desarrollo de color por oxidación copulativa

de la 4-aminofenazona y la N,N-bis(4-sulfobutil)-m-toluidina-disódica. El color formado es directamente proporcional a la concentración del LDL colesterol en la muestra.

IV.2.29. Inmunoensayo enzimático para la determinación de los anticuerpos frente a las LDL oxidadas en suero

Para la determinación de la LDL oxidada se utilizó el kit OLAB anti oxidized LDL de Biomedica Medizinprodukte (Wien, Austria). Se añaden 200 μL de tampón de ensayo en los pocillos de la placa incluyendo el blanco y 20 μL de la pre-dilución (1:5) de estándar/muestra/control en cada pocillo, excepto el blanco. Se cubre la placa y se incuba a 37°C durante 1,5 horas. Después, se lavan los pocillos con tampón de lavado diluido y se añade 100 μL de conjugado en cada pocillo. Se cubre la placa y se incuba a temperatura ambiente (18-26°C) durante 30 minutos. Se lava y se añade 100 μL de sustrato en cada pocillo y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se añade 50 μL de solución stop y, finalmente, se mide la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos fue aplicado el test de la t de Student. Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar, y $p < 0,05$ es considerado estadísticamente significativo.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

V.1. ESTUDIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales (ratas hembra de la raza Wistar) se dividieron en 6 grupos diferentes de 12 ratas cada uno:

Grupos estudios:

- **T1+M:** se les ha administrado por vía oral a través de una cánula el tamoxifeno en dosis equivalente a 50 mg para una persona de 65 kg de peso y día, durante 21 días consecutivos. Una semana antes del tratamiento con tamoxifeno se inició la suplementación dietética con zumo de mandarina concentrado (6 veces) en una cantidad equivalente a 500 mL para una persona de 65 kg de peso y día, que ha continuado durante los 28 días consecutivos.
- **T2+M:** se les ha administrado por vía oral a través de una cánula el tamoxifeno en dosis equivalente a 100 mg para una persona de 65 kg de peso y día, durante 21 días consecutivos. Una semana antes del tratamiento con tamoxifeno se inició la suplementación dietética con zumo de mandarina concentrado (6 veces) en una cantidad equivalente a 500 mL para una persona de 65 kg de peso y día, que ha continuado durante los 28 días consecutivos.

Grupos tamoxifenos:

- **T1:** se les ha administrado el tamoxifeno en dosis equivalente a 50 mg para una persona de 65 kg de peso y día, durante 21 días consecutivos y su dieta se suplementó con agua en vez de zumo de mandarina.

- **T2:** se les ha administrado el tamoxifeno en dosis equivalente a 100 mg para una persona de 65 kg de peso y día, durante 21 días consecutivos y su dieta se suplementó con agua en vez de zumo de mandarina.

Grupo control (Ctrol H₂O): en vez de tamoxifeno se les ha administrado suero fisiológico y la dieta se suplementó con agua.

Grupo testigo (Ctrol M): en vez de tamoxifeno se les ha administrado suero fisiológico y la dieta se suplementó con zumo de mandarina.

Finalmente, se han llevado a cabo los correspondientes ensayos bioquímicos, a nivel plasmático, hepático y mitocondrial.

V.2. ESTUDIO EN HUMANOS

V.2.1. Niños con hipercolesterolemia

Cabe señalar que al colectivo infantil afecto en una patología mediada directa o indirectamente por radicales libres, tal como la hipercolesterolemia, se le ha suplementado su dieta con 500 mL/día de zumo de mandarina, durante un periodo de 28 días. Posteriormente, se han determinado diferentes parámetros bioquímicos y del metabolismo tanto lipídico como oxidativo a nivel plasmático, antes y después de la suplementación.

V.2.2. Niños con obesidad

En cambio, al colectivo infantil afecto en una patología mediada directa o indirectamente por radicales libres, como es la obesidad, se

le ha realizado una intervención dietética durante 4 semanas, distribuyéndose los sujetos en dos grupos apareados de acuerdo a un estudio aleatorio, longitudinal y abierto: uno con dieta hipocalórica y, otro, con dieta hipocalórica suplementada con zumo de mandarina. Adviértase que este último grupo presentará su dieta suplementada con 500 mL/día de zumo de mandarina, durante un periodo de 28 días. Posteriormente, se han determinado medidas antropométricas, así como diversos parámetros bioquímicos, del metabolismo lipídico y oxidativo a nivel plasmático, previa y ulteriormente a la intervención.

VI. RESULTADOS

VI.1. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL ZUMO DE MANDARINA

En primer lugar, se evaluó la capacidad antioxidante total del zumo de mandarina con la finalidad de medir su potencial antioxidante mediante la estabilización de radicales libres sintéticos. De este modo, se comprobó que el zumo de mandarina presenta un elevado potencial antioxidante, como muestran los resultados alcanzados mediante el método del ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] con un valor de $2,26 \pm 0,50$ mmol/L Trolox, así como con el método del FRAP (poder antioxidante de reducción férrica) con un valor de 119 ± 37 μ mol/L Fe, para 100 mL de zumo de mandarina.

Con respecto a la actividad “scavenger” radicalaria del zumo de mandarina, se realizaron ensayos de “scavenging” *in vitro* que demuestran la fuerte capacidad antiradicalaria del zumo de mandarina, en el caso de ambos radicales, tanto con el radical hidroxilo como con el radical superóxido. Y ello dado que el zumo de mandarina disminuía significativamente ($p < 0,05$) la degradación de la desoxirribosa inducida por el radical hidroxilo al actuar como inhibidor del mismo (Figura 20), teniendo que destacar que dicho efecto era dependiente de la concentración de zumo.

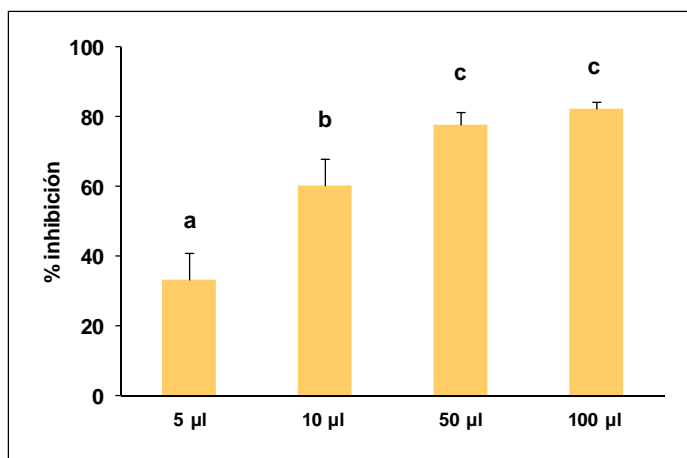


Figura 20. Inhibición del radical hidroxilo. Los valores están expresados en porcentajes de inhibición por media \pm desviación estándar (4 experimentos). Las letras distintas indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

Del mismo modo, el zumo de mandarina también actuaba como inhibidor del radical superóxido respecto a la reducción del nitroazul de tetrazolio (Figura 21) de un modo significativo ($p < 0,05$), siendo dependiente de la concentración de zumo. Sin embargo, es digno de mención que 100 μL de zumo de mandarina inhibió al radical hidroxilo en un 82,5%, mientras que la misma cantidad solamente inhibió al radical superóxido en un 39,3%.

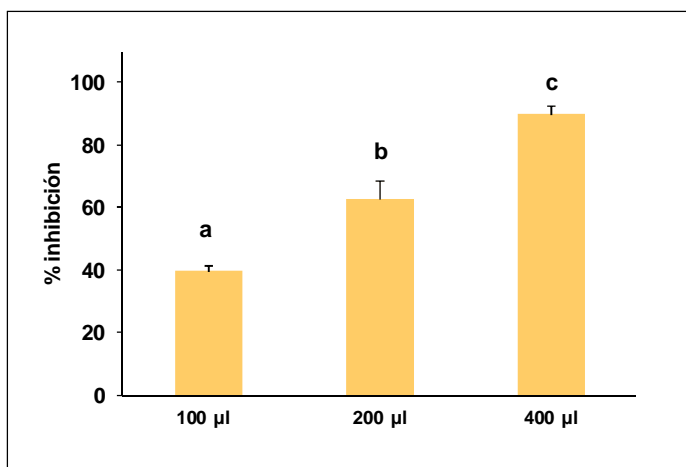


Figura 21. Inhibición del radical superóxido. Los valores están expresados en porcentajes de inhibición por media \pm desviación estándar (4 experimentos). Las letras distintas indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

VI.2. BIODISPONIBILIDAD DEL ZUMO DE MANDARINA

VI.2.1. En animales de experimentación

VI.2.1.1. Determinación de antioxidantes totales en plasma de ratas tras la ingesta de zumo de mandarina

En primer lugar, se evaluaron los niveles de antioxidantes totales (Figura 22) en el plasma de ratas a diferentes tiempos: 0, 30, 60 y 90 minutos tras la suplementación con zumo de mandarina. De esta manera, se observó un incremento significativo ($p < 0,005$) a los 60 minutos de la administración del zumo de mandarina comparado con la situación basal (T0). Sin embargo, a los 90 minutos de la administración del zumo, apareció un descenso de los antioxidantes totales alcanzando valores basales. Estos resultados indicaban que la absorción de los compuestos del zumo de mandarina que presentan

actividad antioxidante se producía de una manera eficaz a los 60 minutos de la suplementación.

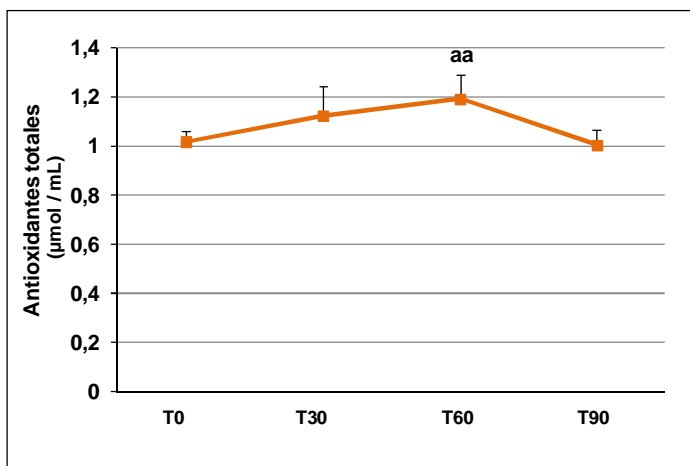


Figura 22. Niveles de antioxidantes totales en plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student.

^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T60 tras la suplementación respecto a T0.

VI.2.1.2. Determinación de la capacidad antioxidante total en plasma de ratas tras la ingesta de zumo de mandarina

La capacidad antioxidante del zumo de mandarina en el plasma, se determinó a diferentes tiempos (0, 30, 60 y 90 minutos) y por diferentes métodos (método del ABTS, método del DPPH y método del FRAP).

Cuando se determinó la capacidad antioxidante con el método del ABTS (Figura 23), se apreció un incremento significativo a los

diferentes tiempos: T30 ($p < 0,05$), T60 ($p < 0,005$) y T90 ($p < 0,05$) con respecto a la situación basal (T0).

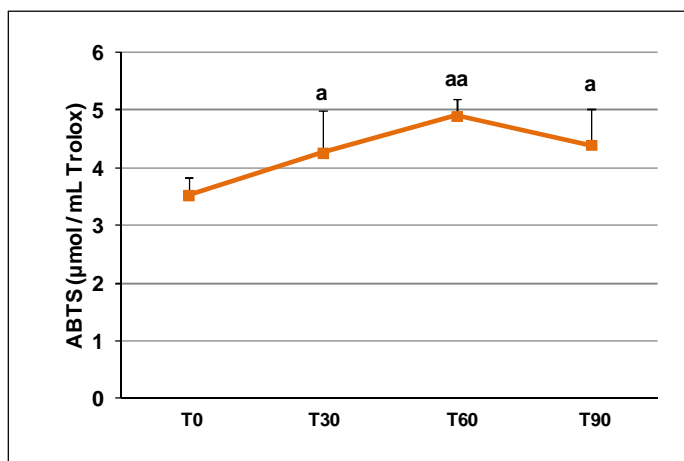


Figura 23. Determinación de la actividad antioxidante total por el método ABTS en el plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student.

^a $p < 0,05$ y ^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T30, T60 y T90 tras la suplementación respecto a T0.

Con respecto al método del DPPH (Figura 24), en los resultados obtenidos también se observó un incremento de la capacidad antioxidante del plasma, siendo significativa ($p < 0,05$) a los 60 minutos de la suplementación con respecto tanto a los 30 minutos como a la situación basal.

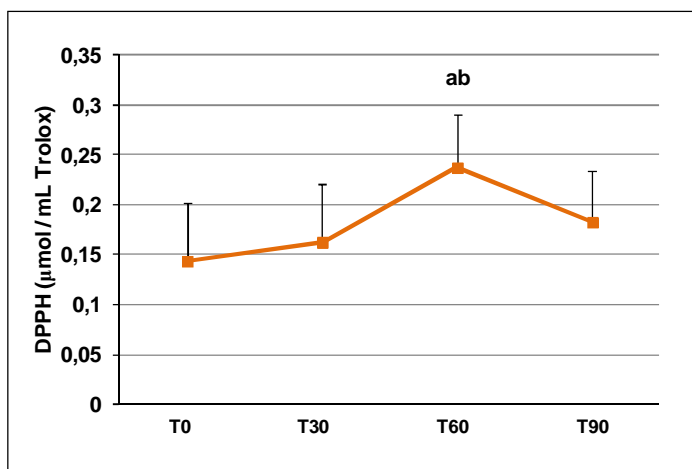


Figura 24. Determinación de la actividad antioxidante total por el método DPPH en el plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student.

^a $p < 0,05$ - Comparando T60 tras la suplementación respecto a T0.

^b $p < 0,05$ - Comparando T60 tras la suplementación respecto a T30.

En cuanto al tercer método utilizado, la técnica del FRAP (Figura 25), también se producía un aumento de la capacidad antioxidante del plasma a los 60 minutos post-ingesta, si bien sin significación estadística.

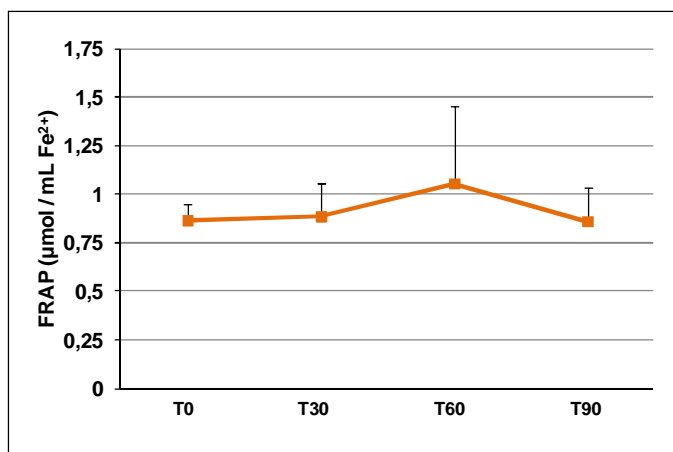


Figura 25. Determinación de la actividad antioxidante total por el método FRAP en el plasma de rata a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student.

La capacidad antioxidante total fue evaluada utilizando tres métodos distintos como consecuencia de las diferencias y limitaciones que presentan las diferentes metodologías analíticas, mostrando con ello determinadas variaciones en sus resultados, pero en definitiva señalando la misma tendencia en los tres casos: un incremento de la capacidad antioxidante total del plasma alcanzando su máximo a los 60 minutos post-ingesta y que va decayendo a medida que alcanza los 90 minutos post-ingesta. Del mismo modo que ocurría con los niveles de antioxidantes totales, dando por tanto concordancia a los resultados obtenidos.

VI.2.2. En humanos

VI.2.2.1. Determinación de antioxidantes totales en plasma humano tras la ingesta de zumo de mandarina

Por otra parte, también se valoró los niveles de antioxidantes totales en plasma humano a diferentes tiempos (0, 45, 90 y 135 minutos) tras la suplementación con zumo de mandarina. En la figura 26, los resultados muestran un incremento a partir de los 45 minutos, siendo éste significativo a los 135 minutos ($p < 0,005$) tras la administración del zumo de mandarina, con respecto a la situación basal (T0) y a los 45 minutos post-ingesta. Estos resultados indican que la absorción de los compuestos del zumo de mandarina que presentan actividad antioxidante se produce de una manera eficaz a los 135 minutos de la suplementación del zumo de mandarina, pero hay que tener en cuenta que, debido al mantenimiento de la tendencia ascendente de la absorción, es posible que todavía no se haya alcanzado a este tiempo una absorción máxima de dichos compuestos.

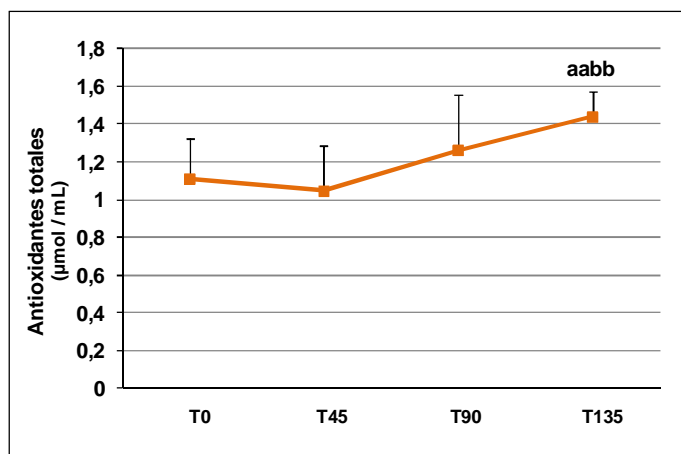


Figura 26. Niveles de antioxidantes totales en plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 9 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student.

^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T0.

^{bb} $p < 0,005$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T45.

VI.2.2.2. Determinación de carotenoides en plasma humano tras la ingesta de zumo de mandarina

Los resultados obtenidos para los carotenoides α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina que se muestran en la figura 27, presentaron un incremento de su concentración con el tiempo tras la ingesta de zumo de mandarina, pero sólo presentaron diferencias significativas el α -caroteno ($0,44 \pm 0,11$ nmol/mL, $p < 0,05$) y el β -caroteno ($1,08 \pm 0,33$ nmol/mL, $p < 0,05$) a los 135 minutos de la suplementación con respecto a la situación basal. Estos resultados muestran una concordancia con los antioxidantes totales, verificando que parte de dichos antioxidantes corresponden con los carotenoides, que son de gran relevancia en el zumo de mandarina, mostrados en la tabla 1. Sin

embargo, teniendo en cuenta la composición del zumo de mandarina donde la β -criptoxantina corresponde con el carotenoide más abundante, estos resultados nos permitirían corroborar que la absorción máxima de los compuestos no se ha producido a los 135 minutos y que, al menos en el caso de la β -criptoxantina, se requeriría de más tiempo para obtenerla.

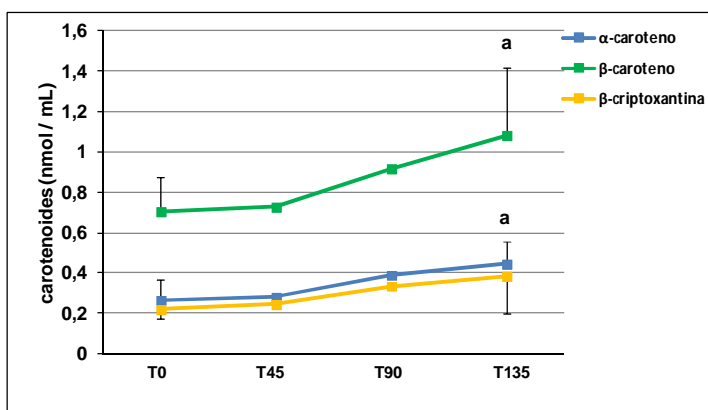


Figura 27. Niveles de carotenoides en plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 9 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student.

^a $p < 0,05$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T0.

VI.2.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total en plasma humano tras la ingesta de zumo de mandarina

Del mismo modo que en los animales de experimentación, se determinó la capacidad antioxidante del zumo de mandarina en el plasma humano a diferentes tiempos: 0, 45, 90 y 135 minutos,

utilizando diferentes métodos: método del ABTS, método del DPPH y método del FRAP.

Cuando se determinó la capacidad antioxidante con el método del ABTS (Figura 28), se apreciaba una diferencia significativa a los 135 minutos de la ingesta del zumo con respecto a la situación basal (T0) ($p < 0,05$), a los 45 ($p < 0,005$) y a los 90 ($p < 0,05$) minutos post-ingesta, que indicaba un incremento de la capacidad antioxidante a los 135 minutos.

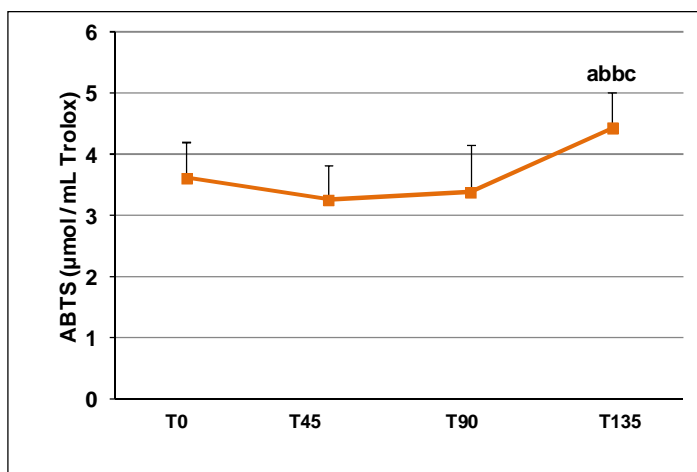


Figura 28. Determinación de la actividad antioxidante total por el método ABTS en el plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 9 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student.

^a $p < 0,05$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T0.

^{bb} $p < 0,005$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T45.

^c $p < 0,05$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T90.

Con respecto al método del DPPH (Figura 29), en los resultados obtenidos también se observó un incremento de la capacidad antioxidante del plasma, siendo significativo ($p < 0,05$) a los 135 minutos de la suplementación en relación tanto con los 45 minutos como con la situación basal.

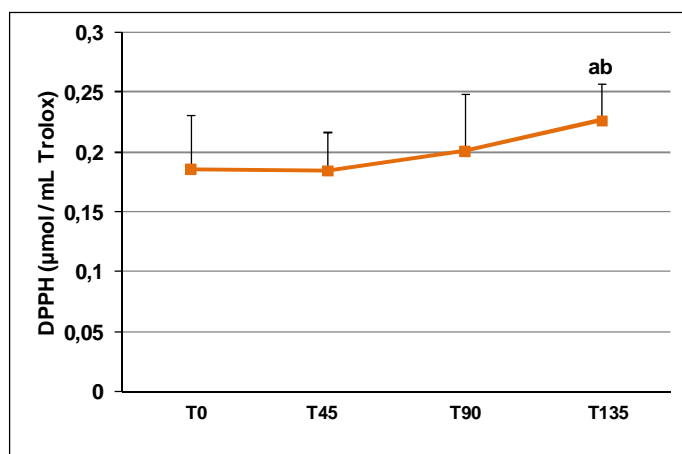


Figura 29. Determinación de la actividad antioxidante total por el método DPPH en el plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 9 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student.

^a $p < 0,05$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T0.

^b $p < 0,05$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T45.

Finalmente, con la técnica del FRAP (Figura 30) también se producía un aumento significativo de la capacidad antioxidante del plasma a los 135 minutos post-ingesta con respecto al T0 ($p < 0,05$) y al T45 ($p < 0,005$).

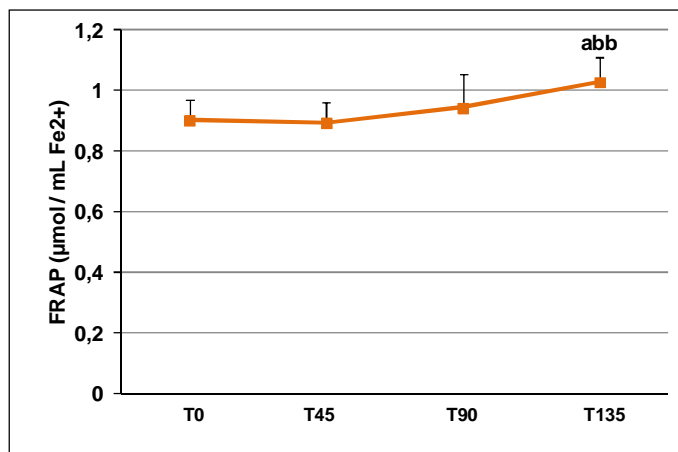


Figura 30. Determinación de la actividad antioxidante total por el método FRAP en el plasma humano a diferentes tiempos, tras la suplementación con zumo de mandarina. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 9 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student.

^a $p < 0,05$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T0.

^{bb} $p < 0,005$ - Comparando T135 tras la suplementación respecto a T45.

La capacidad antioxidante total fue evaluada utilizando los distintos métodos obteniendo similares resultados en todos los casos, mostrando un incremento de la capacidad antioxidante con el paso del tiempo, el cual era significativo al alcanzar los 135 minutos después de la ingesta del zumo de mandarina. Esto indica que los componentes antioxidantes del zumo de mandarina son absorbidos y actúan *in vivo*.

VI.3. ESTUDIOS *IN VIVO* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En primer lugar, se evaluó la respuesta a la inducción de un estrés oxidativo producido por el tamoxifeno, a diferentes dosis, en animales de experimentación (ratas):

- 0,77 mg de tamoxifeno/kg de peso del animal/día (T1), dosis equivalente a 50 mg para una persona de 65 kg de peso y día, durante 21 días consecutivos.
- 1,54 mg de tamoxifeno/kg de peso del animal/día (T2), dosis equivalente a 100 mg para una persona de 65 kg de peso y día, durante 21 días consecutivos.

VI.3.1. Efecto de la administración del tamoxifeno sobre el modelo animal (rata)

Tras la administración del tamoxifeno durante 21 días consecutivos, se procedió a analizar la toxicidad que este fármaco infligía sobre el animal (rata). Para ello, a estos animales se les realizó el seguimiento de la variación de peso corporal durante las semanas que duraba el tratamiento, así como de las enzimas de citólisis, éstas son, la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST), a fin de comprobar el daño hepático producido por parte de este fármaco.

VI.3.1.1. Seguimiento de la variación del peso corporal de los animales de estudio

En relación con los animales cuya dosis de tamoxifeno fue de 0,77 mg/kg/día, tanto con como sin suplementación con zumo de mandarina, no se observó ninguna diferencia significativa con respecto a sus pesos (Figura 31). En cambio, en los animales que habían recibido una dosis doble de tamoxifeno, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en sus pesos al final del tratamiento (28 días).

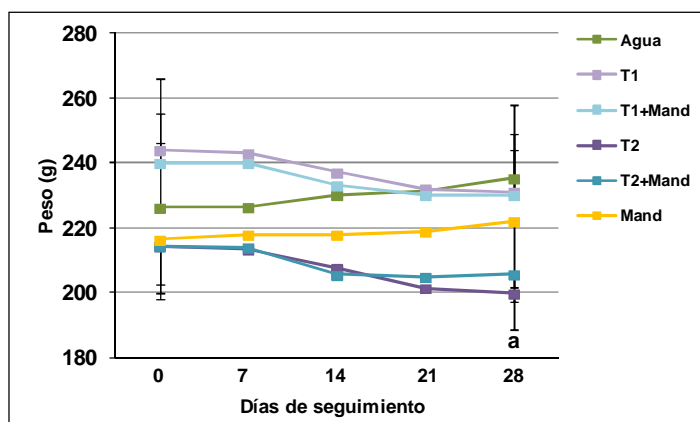


Figura 31. Evolución del peso de las ratas. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. T = tamoxifeno; Mand = mandarina.

^a $p < 0,05$ - Comparando el final con el inicio del tratamiento.

VI.3.1.2. Determinación de los niveles de las aminotransferasas

Con respecto a los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) (Figura 32), se observó un aumento en el grupo de animales al que se le había administrado tamoxifeno siendo éste significativo para la dosis T2 ($50,23 \pm 10,57$ U/L; $p < 0,05$), con respecto a su control ($34,39 \pm 6,61$

U/L). Sin embargo, los grupos que, además de la administración de tamoxifeno, su dieta había sido suplementada con el zumo de mandarina se observó una disminución, siendo significativa ($p < 0,05$) en el grupo T2+M ($38,99 \pm 3,39$ U/L) con respecto al T2.

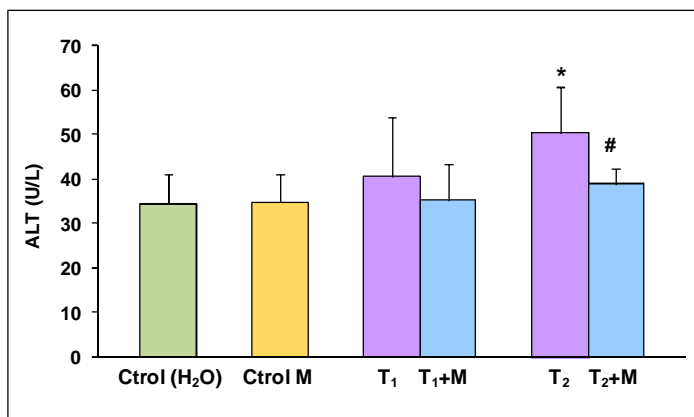


Figura 32. Niveles de la alanina aminotransferasa. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

Por otra parte, en los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) (Figura 33) se observó un aumento significativo tanto para T1 ($69,72 \pm 12,93$ U/L; $p < 0,05$) como para T2 ($75,41 \pm 1,43$ U/L; $p < 0,005$) con respecto a su control ($49,70 \pm 9,67$ U/L). En cambio, los grupos que además del tamoxifeno fueron suplementados con zumo de mandarina se observó una disminución para ambos grupos (T1+M y T2+M) siendo significativa en el grupo T2+M ($52,40 \pm 14,85$ U/L; $p < 0,05$)

con respecto a su correspondiente grupo T2. Lo que indica que existe un efecto hepatotóxico inducido por el tamoxifeno a dosis elevadas.

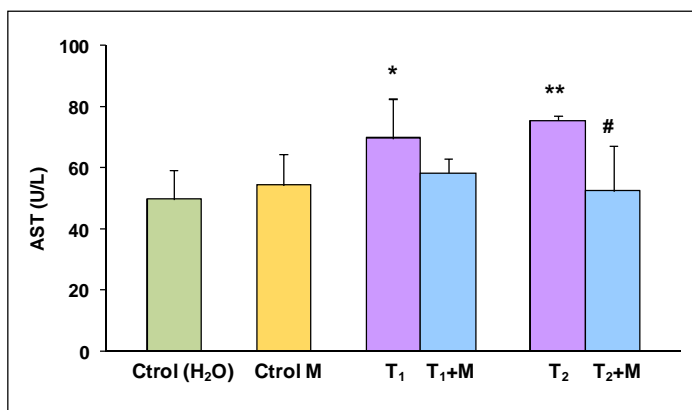


Figura 33. Niveles de la aspartato aminotransferasa. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

VI.3.2. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

VI.3.2.1. En plasma de animales de experimentación (rata)

En calidad de marcadores de estrés oxidativo se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA) como indicador de la peroxidación lipídica y el contenido de grupos carbonilo en proteínas como indicador de oxidación de proteínas.

Los niveles de MDA se muestran en la figura 34, donde se observó que tras el tratamiento con tamoxifeno se producía un aumento significativo ($p < 0,005$) en los grupos T1 ($5,33 \pm 0,60$ nmol/mL) y T2 ($5,82 \pm 0,69$ nmol/mL) con respecto al control ($4,38 \pm 0,41$ nmol/mL),

reflejando el estrés oxidativo originado. Sin embargo, los grupos que, además de ser tratados con tamoxifeno, su dieta se suplementó con zumo de mandarina se observó una disminución significativa ($p < 0,005$) para ambas dosis de tamoxifeno (T1+M: $4,53 \pm 0,32$ nmol/mL y T2+M: $4,44 \pm 0,38$ nmol/mL), con respecto a los grupos tratados T1 y T2 respectivamente, alcanzando valores similares al control. Hecho este que indica que el zumo de mandarina ejerce un efecto protector ante la toxicidad inducida por el tamoxifeno.

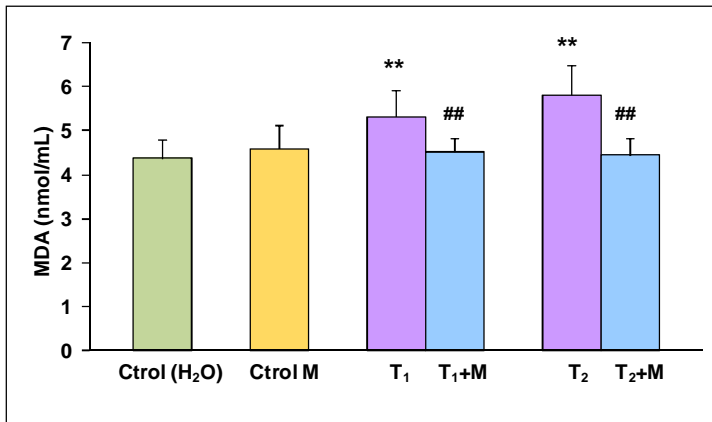


Figura 34. Niveles del malondialdehído en plasma de ratas. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

Con respecto al contenido de grupos carbonilo (CGC) en plasma (Figura 35), se observaron unos niveles de $3,02 \pm 0,46$ nmol/mg prot. y de $3,22 \pm 0,70$ nmol/mg prot. en los grupos tratados con T1 y T2 respectivamente, siendo en ambos casos significativamente más

elevados ($p < 0,005$) que en el grupo control ($1,29 \pm 0,22$ nmol/mg prot.). Sin embargo, en los grupos tratados con tamoxifeno y suplementados con zumo de mandarina, se observó una disminución significativa de sus niveles (T1+M: $1,48 \pm 0,31$ nmol/mg prot., $p < 0,005$ y T2+M: $1,32 \pm 0,32$ nmol/mg prot., $p < 0,005$) con respecto a los grupos tratados T1 y T2 respectivamente, siendo similares al grupo control, mostrando así el efecto protector del zumo de mandarina.

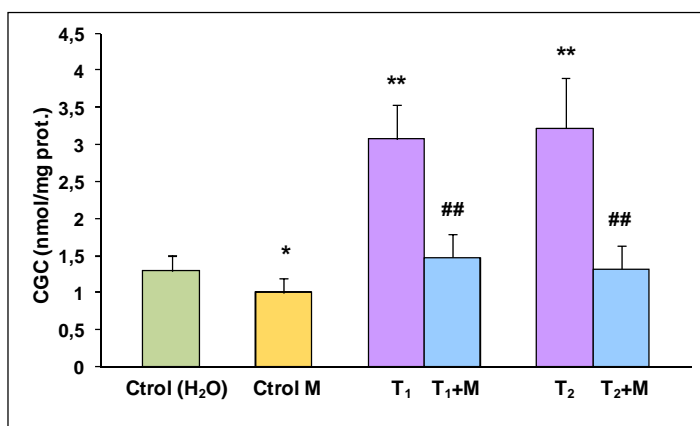


Figura 35. Niveles del contenido de grupos carbonilo en proteínas de plasma de ratas. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno y control mandarina vs control.

$p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

VI.3.2.2. En homogenado de hígado total de animales de experimentación (rata)

En el homogenado de hígado total se analizó el daño que se produce a las macromoléculas, tales como lípidos, proteínas y ADN.

Para valorar el daño oxidativo a lípidos se utilizó como marcador el malondialdehído, ya que se trata de un producto que se forma directamente en la reacción de peroxidación lipídica. En el grupo de tamoxifeno T2 se observó un aumento significativo ($21,02 \pm 2,98$ nmol/mg prot., $p < 0,005$) en los niveles de MDA en el homogenado de hígado total respecto al control ($13,02 \pm 3,00$ nmol/mg prot.) (Figura 36). En cambio, en el grupo suplementado con zumo de mandarina se observó que existía una diferencia significativa (T2+M: $16,91 \pm 2,99$ nmol/mg prot., $p < 0,05$) con respecto al grupo tratado solamente con tamoxifeno (T2). Al comparar el grupo T2 ($21,02 \pm 2,98$ nmol/mg prot.) con respecto a T1 ($14,98 \pm 3,68$ nmol/mg prot.), se observó un aumento significativo ($p < 0,005$) en los niveles de MDA. El mismo efecto fue observado, comparando los grupos tratados con tamoxifeno y suplementados con zumo de mandarina, existiendo un aumento significativo (T2+M: $16,91 \pm 2,99$ nmol/mg prot. y T1+M: $12,73 \pm 1,72$ nmol/mg prot., $p < 0,05$) en los niveles de MDA.

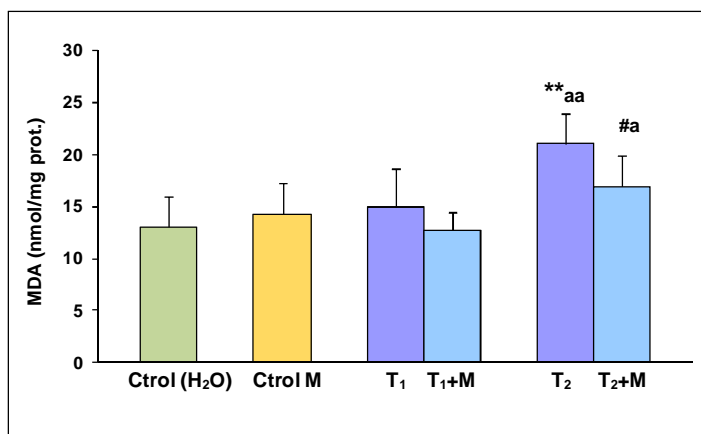


Figura 36. Niveles de malondialdehído en homogenado de hígado total. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^a $p < 0,05$ y ^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T₂ vs T₁ y T₂+M vs T₁+M.

Respecto al contenido de grupos carbonilo (Figura 37) en el homogenado de hígado total, tras la administración de tamoxifeno se observó que aumentaba significativamente (T₁: $3,77 \pm 0,60$ nmol/mg prot., $p < 0,005$ y T₂: $4,28 \pm 0,33$ nmol/mg prot., $p < 0,005$) para ambas dosis administradas con respecto al control ($2,56 \pm 0,28$ nmol/mg prot.). Sin embargo, los animales tratados con tamoxifeno y suplementados con zumo de mandarina, para dicho parámetro disminuían significativamente (T₁+M: $2,42 \pm 0,34$ nmol/mg prot., $p < 0,005$ y T₂+M: $3,08 \pm 0,43$ nmol/mg prot., $p < 0,005$). También existían diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles del CGC, al comparar el grupo T₂ + M con respecto a T₁ + M.

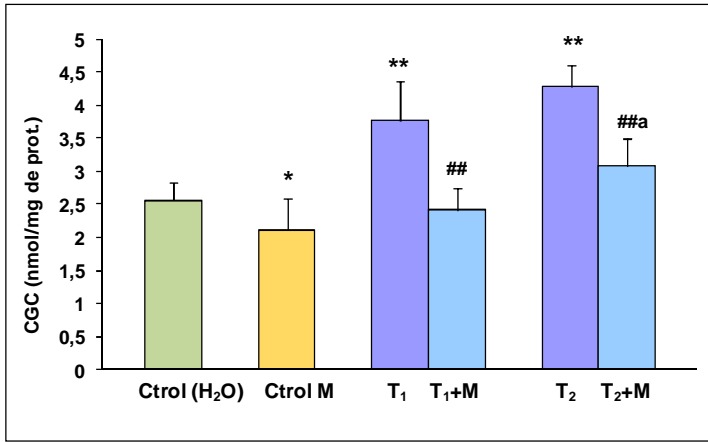


Figura 37. Niveles del contenido de grupos carbonilo en proteínas de homogenado de hígado total. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno y control mandarina vs control.

$p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^a $p < 0,05$ - Comparando T₂+M vs T₁+M.

EL ADN es particularmente susceptible al daño oxidativo por los radicales libres, siendo la modificación oxidativa más frecuente la que suele darse a nivel de la guanosina, dando lugar a la base modificada 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). Por ello, se utilizó este marcador para determinar la oxidación del ADN. En la figura 38, se observa un aumento significativo (T₂: $20,71 \pm 2,45$ ng/mg de ADN total, $p < 0,05$) cuando la dosis de tamoxifeno es elevada. Sin embargo, en las ratas a las que junto a la administración de T₂ se les suplementó su dieta con zumo de mandarina, este incremento no se producía, observándose además una diferencia significativa (T₂+M: $17,98 \pm 1,35$ ng/mg de ADN total, $p < 0,05$) con respecto al grupo tratado sólo

con tamoxifeno (T2) y similares a su control ($17,86 \pm 2,33$ ng/mg de ADN total).

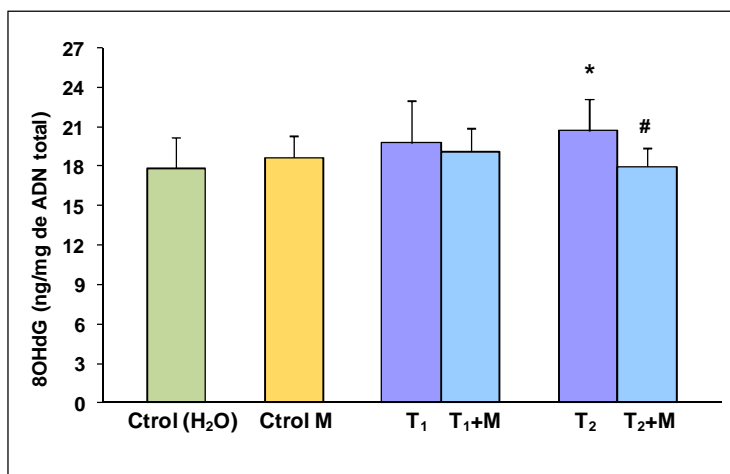


Figura 38. Niveles de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en homogenado de hígado total. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

En resumen, el daño oxidativo a macromoléculas inducido en los animales tratados con tamoxifeno se pone de manifiesto en los resultados obtenidos para los diferentes marcadores de estrés oxidativo. Por otra parte, a los animales a los que se les había aportado como suplemento dietético el zumo de mandarina, este daño se veía contrarrestado, indicando un efecto protector por parte del zumo de mandarina. Esto hecho ocurría de igual modo tanto a nivel plasmático como hepático.

VI.3.3. Defensa antioxidante

Se evaluó el efecto del zumo de mandarina sobre la defensa antioxidante tanto a nivel plasmático como a nivel hepático. En este sentido, se determinó el glutatión reducido (GSH), como el principal antioxidante endógeno y el α -tocoferol, como el más potente antioxidante exógeno.

VI.3.3.1. En plasma de animales de experimentación (rata)

En la figura 39, se muestran los niveles de GSH intraeritrocitario, donde se observa que el grupo al que se le ha administrado el doble de dosis de tamoxifeno (T2: $0,73 \pm 0,18 \mu\text{mol/g Hb}$) presentaba una disminución muy importante ($p < 0,005$) con respecto al grupo control ($2,24 \pm 0,53 \mu\text{mol/g Hb}$). En cambio, en los grupos tratados con tamoxifeno y suplementados con zumo de mandarina los niveles de GSH eran significativamente más elevados para ambas dosis (T1+M: $2,65 \pm 0,72 \mu\text{mol/g Hb}$, $p < 0,05$ y T2+M: $1,22 \pm 0,26 \mu\text{mol/g Hb}$, $p < 0,005$), con respecto a los que no habían recibido este suplemento (T1: $1,57 \pm 0,86 \mu\text{mol/g Hb}$ y T2: $0,73 \pm 0,18 \mu\text{mol/g Hb}$). Al igual que también existían diferencias significativas ($p < 0,005$) en los niveles de GSH, al comparar el grupo T2 + M con respecto a T1 + M.

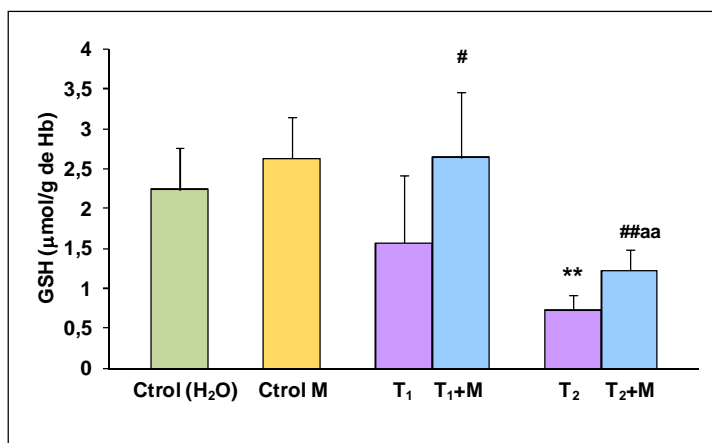


Figura 39. Niveles de glutatión en plasma de ratas. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina; Hb = hemoglobina.

** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ y ## $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T₂+M vs T₁+M.

Cuando se determinaron los niveles de α -tocoferol (Figura 40) se observó una disminución tras el tratamiento de tamoxifeno, siendo significativa para ambas dosis (T₁: $9,63 \pm 3,60$ nmol/mL, $p < 0,05$ y T₂: $5,37 \pm 1,27$ nmol/mL, $p < 0,005$), con respecto al control ($14,85 \pm 3,92$ nmol/mL). En cambio, los valores de este antioxidante eran significativamente más altos ($p < 0,05$) solamente en los animales del grupo T₂+M ($7,04 \pm 1,22$ nmol/mL). El efecto de la doble dosis de tamoxifeno se puede apreciar tanto en los grupos tratados sólo con tamoxifeno, como en los que a su vez fueron suplementados con zumo de mandarina, obteniéndose diferencias significativas ($p < 0,05$) en ambos casos.

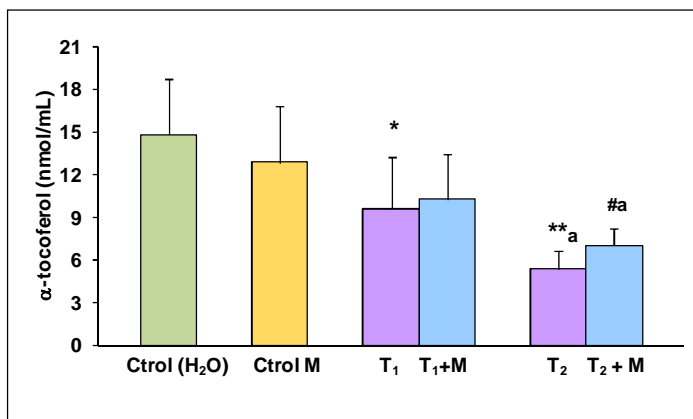


Figura 40. Niveles de α -tocoferol en plasma de ratas. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^a $p < 0,05$ - Comparando T₂ vs T₁ y T₂+M vs T₁+M.

VI.3.3.2. En homogenado de hígado total de animales de experimentación (rata)

Con respecto a los niveles de GSH (Figura 41) se observó que disminuyen significativamente ($p < 0,005$) en los grupos tratados solamente con tamoxifeno (T₁: $3,80 \pm 0,51 \mu\text{mol/g prot.}$ y T₂: $2,48 \pm 0,34 \mu\text{mol/g prot.}$) respecto al control ($5,45 \pm 0,84 \mu\text{mol/g prot.}$). Por otro lado, los grupos que su dieta a su vez se suplementó con zumo de mandarina presentaban valores significativamente superiores (T₁+M: $4,93 \pm 0,84 \mu\text{mol/g prot.}$, $p < 0,05$ y T₂+M: $4,58 \pm 1,18 \mu\text{mol/g prot.}$, $p < 0,05$) a sus correspondientes tratados con tamoxifeno. Asimismo, al comparar ambas dosis de tamoxifeno se observó una diferencia significativa ($p < 0,005$) entre ellas, mostrando el efecto de la doble dosis.

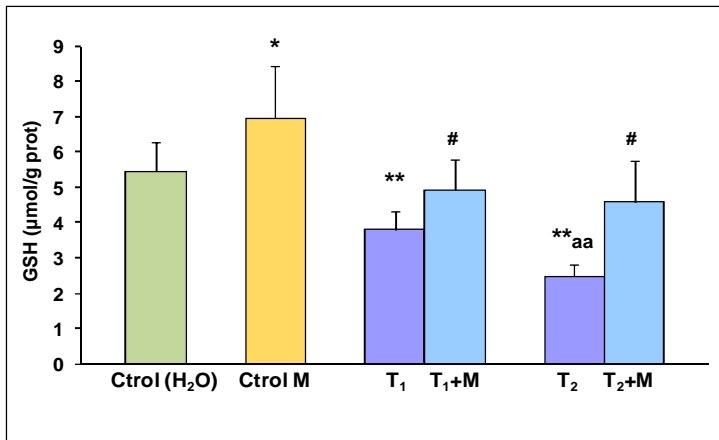


Figura 41. Niveles de glutatión en homogenado de hígado total. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno y control mandarina vs control.

$p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T₂ vs T₁.

Cuando se determinaron los niveles de α -tocoferol (Figura 42) se observó una disminución significativa ($p < 0,005$) en ambas dosis de tamoxifeno (T₁: $95,50 \pm 14,76$ pmol/mg prot. y T₂: $77,56 \pm 11,82$ pmol/mg prot.), con respecto al control ($160,20 \pm 41,47$ pmol/mg prot.). En el caso de los animales que, además del tamoxifeno, fueron suplementados con el zumo de mandarina se apreciaban diferencias significativas en ambas dosis (T₁+M: $148,00 \pm 31,11$ pmol/mg prot., $p < 0,05$ y T₂+M: $117,50 \pm 19,80$ pmol/mg prot., $p < 0,005$), con respecto a los animales tratados solamente con tamoxifeno. Al comparar el grupo T₂ con respecto a T₁, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en los niveles de dicho parámetro.

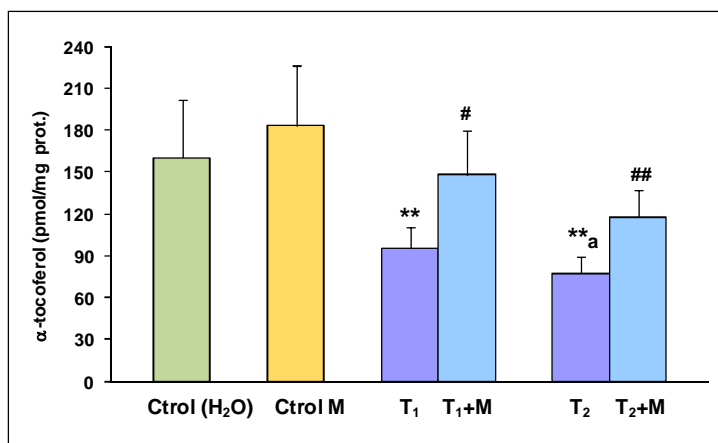


Figura 42. Niveles de α -tocoferol en homogenado de hígado total. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ y ## $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^a $p < 0,05$ - Comparando T2 vs T1.

En suma, a nivel tanto plasmático como hepático se observa un comportamiento similar respecto a la defensa antioxidante: los niveles de antioxidantes disminuyen como consecuencia del estrés oxidativo inducido por el tamoxifeno, siendo este efecto más patente a mayor dosis. Sin embargo, cuando suplementamos con zumo de mandarina se reducen los efectos tóxicos y se mantiene la defensa antioxidante, a consecuencia de los antioxidantes procedentes del zumo de mandarina.

VI.3.4. Daño oxidativo a nivel mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo altamente susceptible al ataque por radicales libres (Kowaltowsky and Vercesi, 1999), entre otras razones

por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, su alto consumo de oxígeno y su baja capacidad antioxidante. Por ello, es importante considerar en qué medida existía estrés oxidativo a nivel mitocondrial como consecuencia de la administración de tamoxifeno a diferentes dosis y cómo el zumo de mandarina podría contrarrestar este efecto.

VI.3.4.1. Actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte electrónico

En primer lugar, con respecto a la actividad del complejo I (Figura 43) se observó una disminución en los grupos tratados con tamoxifeno, siendo ésta significativa ($p < 0,005$) en la del grupo al que se le administró una dosis más elevada de tamoxifeno (T2: $54,34 \pm 21,02$ nmol/mg prot. x min), respecto a su control ($121,66 \pm 37,15$ nmol/mg prot. x min). En cambio en los grupos que, además, habían sido suplementados dietéticamente con zumo de mandarina no se produjo este descenso del complejo I, siendo los valores similares a los del grupo control. Además, en estos grupos suplementados se observaron diferencias significativas para ambas dosis de tamoxifeno (T1+M: $145,40 \pm 29,15$ nmol/mg prot. x min, $p < 0,005$ y T2+M: $106,52 \pm 30,11$ nmol/mg prot. x min, $p < 0,05$), con respecto a los correspondientes grupos tratados con tamoxifeno (T1: $98,40 \pm 24,17$ nmol/mg prot. x min y T2: $54,34 \pm 21,02$ nmol/mg prot. x min). Al comparar los grupos tratados con diferentes dosis de tamoxifeno entre sí, se observó que existían diferencias significativas en la actividad del

complejo I, tanto para los grupos tratados solamente con tamoxifeno como para los que además se suplementaron con zumo de mandarina.

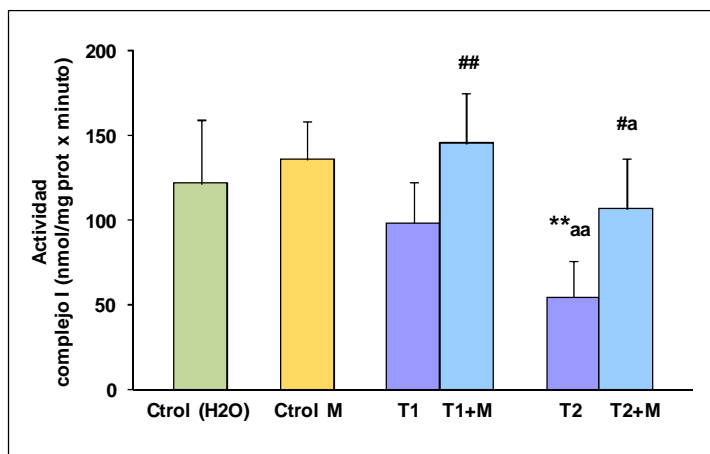


Figura 43. Actividad del complejo I en mitocondrias de hígado de rata. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la *t* de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ y ## $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^a $p < 0,05$ y ^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T2 vs T1 y T2+M vs T1+M.

En segundo lugar, también se determinó la actividad del complejo IV a nivel hepático (Figura 44), donde se observó una disminución significativa en los animales tratados con tamoxifeno (T1: $320,34 \pm 46,93$ nmol/mg prot. x min, $p < 0,005$ y T2: $209,27 \pm 85,63$ nmol/mg prot. x min, $p < 0,005$), siendo dosis dependiente respecto a su control ($476,00 \pm 77,45$ nmol/mg prot. x min). Sin embargo, en los grupos en que, junto al tamoxifeno, su dieta había sido suplementada con zumo de mandarina se apreció un aumento significativo (T1+M: $486,60 \pm$

72,28 nmol/mg prot. x min, $p < 0,005$ y T2+M: $450,46 \pm 87,00$ nmol/mg prot. x min, $p < 0,005$) con respecto a sus correspondientes grupos tratados con tamoxifeno, alcanzando valores similares al grupo control. Es de destacar que del mismo modo que ocurría con el complejo I, en el complejo IV se pone de manifiesto, aunque no significativo estadísticamente, un ligero incremento de la actividad en los animales a los que se les había administrado zumo de mandarina y suero fisiológico con respecto al grupo control.

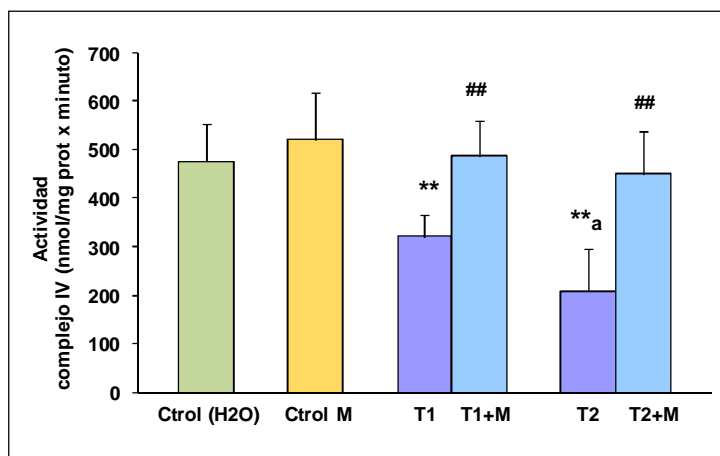


Figura 44. Actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado de rata. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^a $p < 0,05$ - Comparando T2 vs T1.

En definitiva, los resultados obtenidos en los grupos tratados con ambas dosis de tamoxifeno muestran una disminución de la actividad de los complejos I y IV en mitocondrias de hígado, indicativa del

estrés oxidativo inducido por el tamoxifeno. No obstante, esta consecuencia aparece contrarrestada en los grupos suplementados con zumo de mandarina, lo que nos indica el efecto antioxidante de los componentes del propio zumo de mandarina.

VI.3.4.2. Niveles de las coenzimas Q₉ y Q₁₀

El coenzima Q destaca por su papel antioxidante, pudiendo actuar como bloqueante de los radicales libres, inhibiendo la peroxidación lipídica en las membranas biológicas y protegiendo a las proteínas intermembrana mitocondriales y al ADN contra el daño oxidativo, por lo que actúa protegiendo a las células contra los radicales libres. El coenzima Q es un derivado de la quinona con una larga cola consistente en unidades isoprenoides de cinco carbonos. El número de unidades de isopreno en la cola depende de la especie. En mamíferos, la forma más común contiene 10 unidades de isopreno (coenzima Q₁₀), mientras que en roedores es la que contiene 9 unidades de isopreno (coenzima Q₉). Las quinonas pueden existir en tres estados de oxidación: ubiquinona (oxidada), semiquinona y ubiquinol (reducida). La adición de un protón y un electrón al estado oxidado origina la forma semiquinona. La forma semiquinona puede perder un protón para dar lugar al radical aniónico de la semiquinona. La adición de un segundo protón y electrón da lugar al ubiquinol (forma reducida), que retiene sus protones con más intensidad. Por tanto, en las quinonas, las reacciones de transferencia de electrones están acopladas a la unión y liberación de protones, una propiedad clave a la

hora de transportar protones a través de la membrana (Stryer et al., 2008).

Con respecto a los niveles de coenzima Q₉ (Q9), disminuyeron de modo significativo ($p < 0,05$) en las mitocondrias hepáticas de los animales tratados con tamoxifeno, para ambas dosis (T1: $0,97 \pm 0,11$ nmol/mg prot. y T2: $0,96 \pm 0,04$ nmol/mg prot.) con respecto al control ($1,12 \pm 0,18$ nmol/mg prot.). Sin embargo, en los animales suplementados con zumo de mandarina esta disminución no se producía, siendo los niveles similares al grupo control, pero sí presentaban diferencias significativas (T1+M: $1,31 \pm 0,09$ nmol/mg prot., $p < 0,005$ y T2+M: $1,29 \pm 0,11$ nmol/mg prot., $p < 0,005$) al compararse con sus respectivos grupos tratados con tamoxifeno (Figura 45). En este sentido, puede destacarse que los niveles de coenzima Q₉ en los animales a los que se les administró zumo de mandarina y suero fisiológico aumentaban de forma significativa ($1,52 \pm 0,20$ nmol/mg prot., $p < 0,005$) con respecto al grupo control. Estos animales no habían sido sometidos a un estrés oxidativo extra y, en ellos, la cantidad de este antioxidante es mayor tras el aporte dietético de zumo de mandarina.

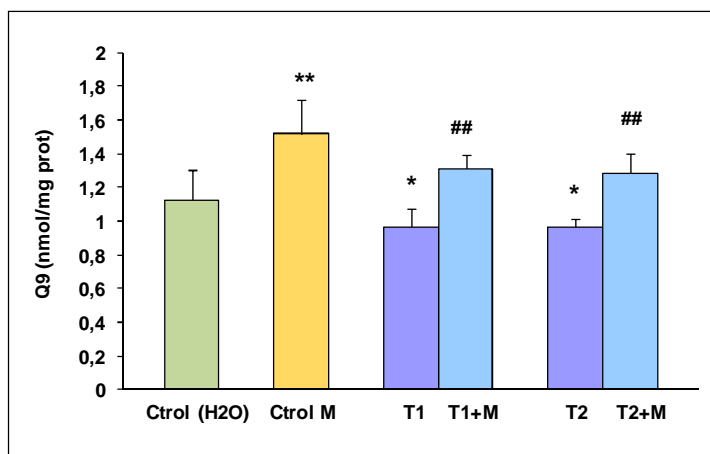


Figura 45. Niveles del coenzima Q_9 en mitocondrias de hígado de rata. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno y control mandarina vs control.

$p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

Para el coenzima Q_{10} (Q_{10}), los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con la anterior coenzima (Figura 46). Así, existía una disminución significativa ($p < 0,005$) en los grupos a los que se les administró tamoxifeno (T1: $0,056 \pm 0,006$ nmol/mg prot. y T2: $0,043 \pm 0,005$ nmol/mg prot.) con respecto al control ($0,059 \pm 0,007$ nmol/mg prot.), mostrando en el caso de la dosis T2, una disminución significativa ($p < 0,005$) con respecto a la dosis T1. En cambio, los grupos a los que se les suplementó con zumo de mandarina no presentaban esta disminución (T1+M: $0,065 \pm 0,006$ nmol/mg prot. y T2+M: $0,059 \pm 0,009$ nmol/mg prot.), siendo los niveles similares al grupo control, pero sí presentaban por contra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos

tratados con tamoxifeno y no suplementados. E igualmente se pone de manifiesto el incremento de los niveles de coenzima Q₁₀, aun cuando no resulta estadísticamente significativo, en los animales a los que se les administró zumo de mandarina y suero fisiológico con respecto al grupo control, de forma similar a lo acontecido en los niveles de coenzima Q₉.

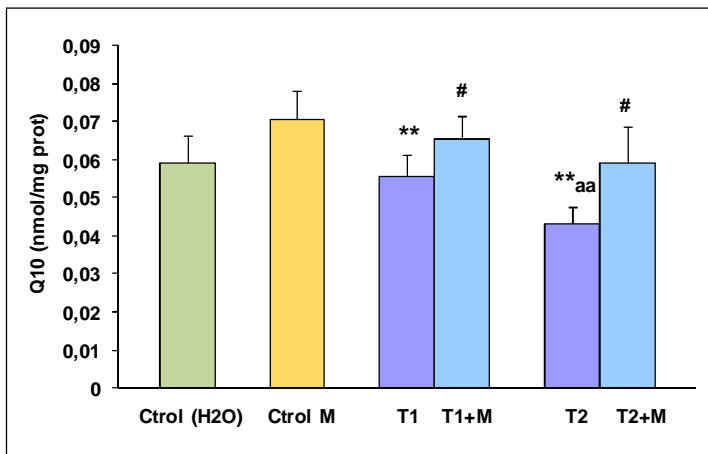


Figura 46. Niveles del coenzima Q₁₀ en mitocondrias de hígado de rata. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar de 12 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t de Student. T = tamoxifeno; M = mandarina.

** $p < 0,005$ - Comparando tamoxifeno vs control.

$p < 0,05$ - Comparando tamoxifeno+mandarina vs tamoxifeno.

^{aa} $p < 0,005$ - Comparando T2 vs T1.

En resumen, los resultados obtenidos muestran una disminución en los niveles de los coenzimas Q₉ y Q₁₀ en los grupos tratados con ambas dosis de tamoxifeno, reflejando la inducción de estrés oxidativo por parte del tamoxifeno, mientras que en los grupos suplementados con zumo de mandarina se muestra el efecto protector del zumo sobre la

toxicidad inducida por el tamoxifeno en las mitocondrias de hígado de rata.

VI.4. ESTUDIO EN HUMANOS

VI.4.1. Estudio de niños con hipercolesterolemia

VI.4.1.1. Características físicas

Las características físicas de los niños estudiados (n=48) aparecen en la tabla 2. Como puede apreciarse, a lo largo del estudio no se observaron diferencias, ni en el peso ni en el índice de masa corporal, en la población objeto del mismo.

Tabla 2. Características físicas de 48 niños hipercolesterolémicos basal y después de la suplementación con zumo de mandarina.

	Basal	Final
Género (niñas/niños)	22/26	
Edad (años)	9,5 ± 0,5	
Peso, kg	35,51 ± 7,04	35,82 ± 7,27
IMC, kg/m²	18,56 ± 0,70	18,61 ± 0,80

Los valores son expresados como media ± desviación estándar. IMC = índice de masa corporal.

VI.4.1.2. Ingesta dietética

De los registros de alimentos, tanto del retrospectivo recordatorio de 24 horas como del relativo a los 7 días, no se desprendieron cambios

significativos, ni en la energía total (Tabla 3) ni en los porcentajes de macronutrientes (Figura 47), tras el período de suplementación con zumo de mandarina en relación con la dieta basal.

Tabla 3. Energía y toma de nutrientes de 48 niños hipercolesterolémicos basal y después de la suplementación con zumo de mandarina.

	Basal	Final
Energía, Kcal	2241 ± 293	2157 ± 248
Colesterol, mg/día	246 ± 83	257 ± 58
Vitamina C, mg/día	85,29 ± 52,59	285,01 ± 120,1**
Vitamina E, mg/día	20,56 ± 4,89	22,76 ± 3,24
Calcio, mg/día	880 ± 316	860 ± 270

Media de recuerdo 24 horas y del registro de alimentos de 7 días. Los valores son expresados como media ± desviación estándar.

***p<0,0001 vs basal.*

Asimismo, tampoco se constataron diferencias significativas en la ingesta de micronutrientes desde el inicio hasta el final del período de estudio (Tabla 3), excepto para los valores de vitamina C que se vieron aumentados significativamente ($p<0,0001$), siendo antes de la suplementación de $85,29 \pm 52,59$ mg/día y, con posterioridad a la misma, de $285,01 \pm 120,1$ mg/día, como cabía esperar tras el consumo de zumo de mandarina.

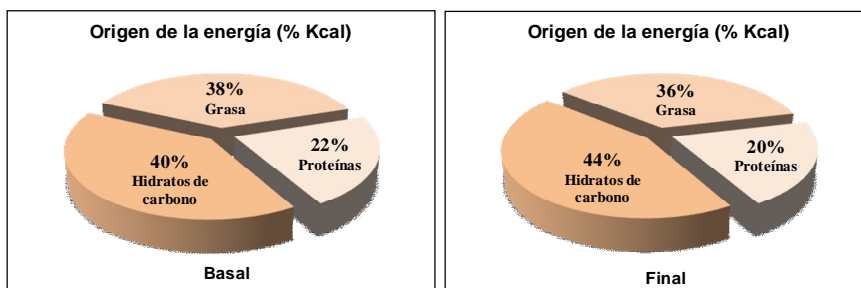


Figura 47. Origen de la energía de los niños hipercolesterolémicos basal y después de la suplementación con zumo de mandarina.

VI.4.1.3. Efecto de la ingesta del zumo de mandarina

VI.4.1.3.1. Valores bioquímicos y perfil lipídico

No se observaron cambios significativos con respecto a los valores glucémicos ni insulínicos (Tabla 4), tras 4 semanas de suplementación con zumo de mandarina. En cambio, sí se observaron diferencias significativas en los niveles de folato, siendo antes de la suplementación de $10,81 \pm 4,44$ y de $12,47 \pm 4,57$ ng/mL después de ésta última ($p < 0,05$).

Tabla 4. Valores de glucosa, insulina y folato antes y después de la suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos.

	Basal	Final
Glucosa, mg/dL	$94,0 \pm 4,6$	$94,3 \pm 3,9$
Insulina, μU/mL	$6,73 \pm 1,38$	$6,31 \pm 1,27$
Folato, ng/mL	$10,81 \pm 4,44$	$12,47 \pm 4,57^*$

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar.

** $p < 0,05$ vs basal.*

También se evaluó el perfil lipídico tras la ingesta del zumo de mandarina durante cuatro semanas. La suplementación no redujo significativamente los niveles séricos de colesterol total ni de triglicéridos (Tabla 5). Así como tampoco disminuyó significativamente los niveles de LDL-c, ni hizo aumentar significativamente los niveles de HDL-c con respecto a la basal (Tabla 5). En el caso del índice aterogénico con respecto a la basal no presentó una disminución significativa, del mismo modo que tampoco presentaron cambios los niveles de autoanticuerpos frente a la LDL oxidada durante el estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil lipídico basal y después de 4 semanas de suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos.

	Basal	Final
Colesterol total, mg/dL	253 ± 42	249 ± 53
Triglicéridos, mg/dL	97 ± 31	94 ± 32
HDL-c, mg/dL	49 ± 12	50 ± 12
LDL-c, mg/dL	184 ± 42	177 ± 54
Colesterol total/HDL-c	5,46 ± 1,21	5,38 ± 1,60
Log LDL-ox	2,79 ± 0,48	2,81 ± 0,43

Los valores son expresados como media ± desviación estándar.

VI.4.1.3.2. Marcadores de estrés oxidativo

Los niveles de los marcadores de estrés oxidativo plasmáticos disminuyeron significativamente en los niños después del período de suplementación de 4 semanas. De hecho, la suplementación con zumo de mandarina inducía la disminución significativa ($p < 0,01$) de los niveles del marcador de peroxidación lipídica, esto es, el malondialdehído (MDA) en comparación con la basal. En la tabla 6 se puede observar que los valores medios de MDA antes de la suplementación con zumo de mandarina fueron de $1,90 \pm 0,48$ nmol/mL respecto a $1,76 \pm 0,41$ nmol/mL después de la misma. Igualmente, los valores de los grupos carbonilo, marcador este correspondiente a la oxidación de proteínas (Tabla 6), disminuían significativamente ($p < 0,01$) durante el mismo período, viendo como antes de la suplementación los valores eran de $1,64 \pm 0,67$ nmol/mg proteína y, con posterioridad a aquella, de $1,28 \pm 0,65$ nmol/mg proteína.

Tabla 6. Niveles de malondialdehído y grupos carbonilo antes y después de las 4 semanas de suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos.

	Basal	Final
Malondialdehído, nmol/mL	$1,90 \pm 0,48$	$1,76 \pm 0,41^*$
Grupos carbonilo, nmol/ mg proteína	$1,64 \pm 0,67$	$1,28 \pm 0,65^*$

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar.

** $p < 0,01$ vs basal.*

VI.4.1.3.3. Marcadores de defensa antioxidante

Los niveles de antioxidantes aumentaron considerablemente después de la suplementación con zumo de mandarina. Los niveles de GSH eritrocitario aumentaron significativamente ($p < 0,00001$), con valores medios basales de $1,99 \pm 0,90$ y de $2,72 \pm 1,02$ $\mu\text{mol/g Hb}$ tras la suplementación, al igual que los niveles de α -tocoferol plasmático que también presentaron un aumento significativo ($p < 0,001$), con valores medios basales de $55,52 \pm 15,34$ y de $62,74 \pm 16,31$ nmol/mL después de la suplementación con zumo de mandarina, mostrados en la tabla 7. Del mismo modo, la concentración plasmática de vitamina C se vio aumentada de un modo significativo ($p < 0,00001$). Como muestra la tabla 7, donde los valores antes de la suplementación con zumo de mandarina eran de $46,08 \pm 5,92$ $\mu\text{mol/L}$ respecto a valores de $77,50 \pm 10,39$ $\mu\text{mol/L}$ después de la suplementación.

Tabla 7. Niveles de glutatión reducido, α -tocoferol y vitamina C antes y después de las 4 semanas de suplementación con zumo de mandarina de 48 niños hipercolesterolémicos.

	Basal	Final
Glutatión reducido, $\mu\text{mol/g Hb}$	$1,99 \pm 0,90$	$2,72 \pm 1,02^{\ddagger}$
α-tocoferol, nmol/mL	$55,52 \pm 15,34$	$62,74 \pm 16,31^{\ddagger}$
Vitamina C, $\mu\text{mol/L}$	$46,08 \pm 5,92$	$77,50 \pm 10,39^{\ddagger}$

*Los valores son expresados como media \pm desviación estándar. Hb = hemoglobina.
 $^{\ddagger} p < 0,00001$ vs basal; $^{\ddagger} p < 0,001$ vs basal.*

VI.4.2. Estudio de niños con obesidad

VI.4.2.1. Características físicas

En la tabla 8 se muestran las características físicas de los niños obesos que participaron en el estudio (n=40). Los datos no difirieron entre niños y niñas. No habiendo diferencias significativas en las características del sujeto con la basal. Todos los niños incluidos sufrían obesidad severa (IMC z-score entre 2 y 5).

Ambos grupos de niños perdieron peso durante la intervención con una reducción significativa en el índice de masa corporal, pero su cantidad no fue estadísticamente diferente entre los dos grupos. La masa grasa no fue significativamente modificada al final del estudio, pero la distribución de la grasa corporal fue modificada significativamente en el grupo suplementado con zumo de mandarina.

Tabla 8. Características físicas de niños obesos.

	Dieta hipocalórica (n=20)		Dieta hipocalórica + zumo de mandarina (n=20)	
	Basal	Final	Basal	Final
Género (niñas/niños)	12/8		11/9	
Edad (años)	11,8 ± 2,4		12,1 ± 1,9	
Peso (kg)	67,9 ± 20,0	67,4 ± 20,2*	71,5 ± 15,3	70,7 ± 15,3*
IMC (kg/m²)	28,7 ± 4,2	28,2 ± 4,1**	29,3 ± 3,5	28,7 ± 3,6 [†]
Masa grasa (%)	28,0 ± 4,9	27,6 ± 4,8	28,6 ± 3,9	28,4 ± 4,2
Circunferencia cintura (cm)	88,9 ± 9,3	87,7 ± 10,7	90,8 ± 9,3	89,5 ± 9,8*
Circunferencia cadera (cm)	97,1 ± 14,2	96,5 ± 13,6	101,3 ± 9,7	100,0 ± 9,6*
Pliegue del tríceps (mm)	22,5 ± 3,2	22,3 ± 3,3	22,2 ± 3,2	21,2 ± 3,3
Pliegue subescapular (mm)	21,4 ± 3,1	20,9 ± 2,7**	22,5 ± 3,9	21,5 ± 3,8**

IMC = índice de masa corporal. Los valores son expresados como media ± desviación estándar.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, [†] $p < 0,001$ vs basal del mismo grupo.

VI.4.2.2. Ingesta dietética

La energía y la toma de nutrientes estimadas de los niños en la basal y durante las semanas 4 del estudio se muestran en la tabla 9 obtenidas de los registros de alimentos tanto del retrospectivo recordatorio de 24 horas como del registro de 3 días. Se observó que en ambos grupos había una reducción significativa ($p < 0,0001$) de su energía total.

Tabla 9. Energía y toma de nutrientes de niños obesos antes y después de la intervención dietética.

	Dieta hipocalórica (n=20)		Dieta hipocalórica + zumo de mandarina (n=20) [§]	
	Basal	Final	Basal	Final
Energía, kcal/día	2292 ± 357	1692 ± 457 [§]	2400 ± 513	1652 ± 349 [§]
Colesterol, mg/día	354 ± 67	263 ± 55 [§]	333 ± 74	242 ± 54 [§]
Vitamina C, mg/día	75 ± 28	77 ± 31	74 ± 35	162 ± 14 [§]
Vitamina E, mg/día	10,9 ± 1,97	10,8 ± 2,4	10,5 ± 2,1	10,6 ± 2,6
Calcio, mg/día	839 ± 185	785 ± 157	836 ± 164	797 ± 195

Media de recuerdo 24 horas y del registro de alimentos de 3 días. Los valores son expresados como media ± desviación estándar.

[§]p<0,0001 vs basal del mismo grupo.

En cuanto a los porcentajes de macronutrientes en los niños obesos con dieta hipocalórica (Figura 48 y Tabla 9) se observó una disminución significativa en el consumo de grasas ($p<0,05$), siendo antes de la intervención de 39% y posteriormente a la intervención de 37%. Con carácter específico, disminuyó significativamente la ingesta de grasas saturadas ($p<0,05$) y de colesterol ($p<0,0001$), mientras que aumentó significativamente el consumo de grasas poliinsaturadas ($p<0,0001$).

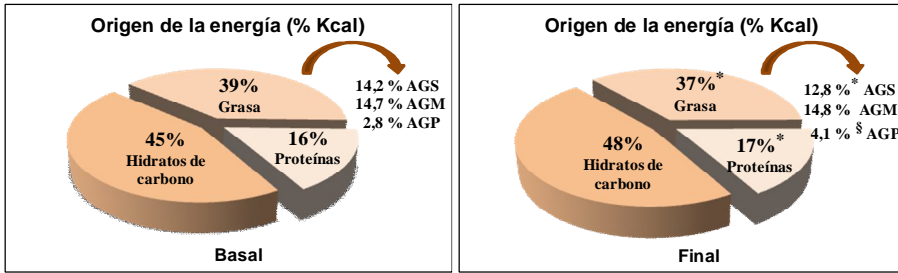


Figura 48. Origen de la energía de los niños obesos basal y después de la dieta hipocalórica. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados, AGP: ácidos grasos poliinsaturados.
* $p < 0,05$, § $p < 0,0001$ vs basal del mismo grupo.

Con respecto a los porcentajes de macronutrientes en los niños obesos con suplementación con zumo de mandarina (Figura 49 y Tabla 9) se observó una disminución significativa en la ingesta de grasas saturadas ($p < 0,001$) y de colesterol ($p < 0,0001$), mientras que aumentó significativamente el consumo de grasas poliinsaturadas ($p < 0,0001$).

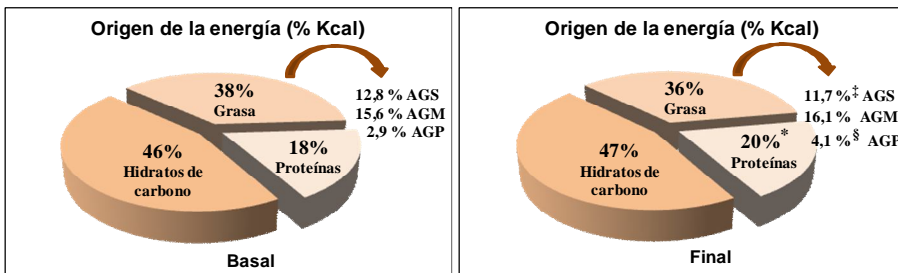


Figura 49. Origen de la energía de los niños obesos basal y después de la dieta hipocalórica + zumo de mandarina. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados, AGP: ácidos grasos poliinsaturados.
* $p < 0,05$, ‡ $p < 0,001$, § $p < 0,0001$ vs basal del mismo grupo.

Asimismo, tampoco se observaron diferencias significativas en la ingesta de micronutrientes desde el inicio al final del período de estudio (Tabla 9), excepto para los valores de vitamina C en el grupo

suplementado con zumo de mandarina que se vieron aumentados significativamente ($p < 0,0001$), siendo antes de la suplementación de 74 ± 35 mg/día y posteriormente a la suplementación de 162 ± 14 mg/día, como era de esperar tras el consumo de zumo de mandarina, reflejando la adhesión a la suplementación.

VI.4.2.3. Efecto de la ingesta del zumo de mandarina

VI.4.2.3.1. Valores bioquímicos y perfil lipídico

En la tabla 10 se muestran los valores bioquímicos de los niños obesos que participaron en el estudio. Todos los niños presentaron sus niveles de glucosa en ayunas normales. Insulinemia y el índice HOMA-IR disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) en los niños suplementados con zumo de mandarina en comparación con aquellos niños no suplementados. Por el contrario, los niveles de ácido fólico aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en los niños suplementados con zumo de mandarina, siendo antes de la suplementación $11,1 \pm 2,7$ nmol/L respecto a $12,8 \pm 2,9$ nmol/L después de la suplementación.

Tabla 10. Valores bioquímicos de niños obesos.

	Dieta hipocalórica (n=20)		Dieta hipocalórica + zumo de mandarina (n=20)	
	Basal	Final	Basal	Final
Glucosa (mmol/L)	4,71 ± 0,35	5,31 ± 0,37	5,62 ± 0,85	5,51 ± 0,44
Insulina (pmol/L)	147,2 ± 73,6	134,0 ± 45,8	144,6 ± 56,9	119,5 ± 55,6*
Índice HOMA-IR	5,0 ± 1,0	4,6 ± 0,6	5,3 ± 0,5	4,3 ± 0,4*
Ácido fólico (nmol/L)	12,6 ± 4,7	12,9 ± 3,4	11,1 ± 2,7	12,8 ± 2,9*

HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance. Los valores son expresados como media ± desviación estándar.

**p<0,05 vs basal del mismo grupo.*

Al determinar las aminotransferasas se observaron valores normales en todos los niños y no se presentaron cambios significativos durante la intervención dietética, indicando que no existían características de daño hepático relacionadas con la obesidad (Tabla 11).

Tabla 11. Niveles de aminotransferasas antes y después de la intervención dietética de niños obesos.

	Dieta hipocalórica (n=20)		Dieta hipocalórica + zumo de mandarina (n=20)	
	Basal	Final	Basal	Final
AST (U/L)	24,5 ± 1,9	22,2 ± 1,1	21,6 ± 0,8	21,8 ± 1,5
ALT (U/L)	24,6 ± 2,9	20,1 ± 1,3	20,0 ± 1,9	18,2 ± 2,5

AST = aspartato aminotransferasa; ALT = alanina aminotransferasa.

Los valores son expresados como media ± desviación estándar.

Asimismo, se evaluó el perfil lipídico tras la intervención dietética durante cuatro semanas. La intervención dietética no redujo significativamente ni los niveles séricos de colesterol total, ni tampoco de triglicéridos (Tabla 12). Así como tampoco disminuyeron significativamente los niveles de LDL-c, ni hizo aumentar significativamente los niveles de HDL-c con respecto a la basal, sino que los hizo disminuir (Tabla 12). En el caso de los niveles de autoanticuerpos frente a la LDL oxidada durante la intervención, no presentaron cambios significativos en ninguno de los casos (Tabla 12).

Tabla 12. Perfil lipídico antes y después de la intervención dietética de niños obesos.

	Dieta hipocalórica (n=20)		Dieta hipocalórica + zumo de mandarina (n=20)	
	Basal	Final	Basal	Final
Colesterol total, mmol/L	4,29 ± 0,13	4,27 ± 1,03	3,96 ± 0,59	3,84 ± 0,61
Triglicéridos, mmol/L	0,99 ± 0,59	0,89 ± 0,42	0,88 ± 0,32	0,80 ± 0,28
HDL-c, mmol/L	1,11 ± 0,21	1,01 ± 0,19*	1,16 ± 0,26	1,03 ± 0,25*
LDL-c, mmol/L	2,62 ± 0,94	2,83 ± 0,93	2,44 ± 0,54	2,47 ± 0,64
LDL-ox, mU/mL	918 ± 1131	875 ± 875	836 ± 928	794 ± 768

Los valores son expresados como media ± desviación estándar.

**p<0,05 vs basal del mismo grupo.*

VI.4.2.3.2. Marcadores de estrés oxidativo

Los marcadores de estrés oxidativo plasmáticos, tanto el malondialdehído (MDA) como el contenido de grupos carbonilo, están mostrados en la tabla 13. Con respecto a los niveles de MDA, la

suplementación con zumo de mandarina indujo una disminución significativa en los niveles de MDA ($p < 0,05$). En la tabla 13 se puede observar que los valores medios de MDA antes de la suplementación con zumo de mandarina fueron de $2,65 \pm 0,18 \mu\text{mol/L}$ respecto a $2,24 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ después de la suplementación. Igualmente, los niveles de grupos carbonilo disminuían significativamente ($p < 0,01$), durante el período de las 4 semanas de intervención con suplementación con zumo de mandarina, viendo como antes de la suplementación los valores eran de $1,81 \pm 0,18 \text{ nmol/mg proteína}$, siendo finalmente de $1,12 \pm 0,16 \text{ nmol/mg proteína}$ (Tabla 13).

Tabla 13. Niveles de malondialdehído y grupos carbonilo antes y después de la intervención dietética de niños obesos.

	Dieta hipocalórica (n=20)		Dieta hipocalórica + zumo de mandarina (n=20)	
	Basal	Final	Basal	Final
Malondialdehído, $\mu\text{mol/L}$	$2,51 \pm 0,16$	$2,32 \pm 0,16$	$2,65 \pm 0,18$	$2,24 \pm 0,14^*$
Grupos carbonilo, nmol/mg proteína	$1,63 \pm 0,18$	$1,92 \pm 0,20$	$1,81 \pm 0,18$	$1,12 \pm 0,16^\dagger$

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar.

** $p < 0,05$ vs basal del mismo grupo; $^\dagger p < 0,01$ vs basal del mismo grupo.*

VI.4.2.3.3. Marcadores de defensa antioxidante

Los niveles de antioxidantes aumentaron significativamente después de la suplementación con zumo de mandarina. Con respecto a los niveles de GSH en la tabla 14 se puede observar que se produjo un aumento significativo tanto en los niños con suplementación con zumo de mandarina ($p < 0,0001$), con valores medios basales de $1,69 \pm$

0,17 y de $2,31 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/g}$ Hb tras la suplementación, como en los niños después de una dieta restringida de energía sin suplementación con zumo ($p < 0,0001$), con valores medios basales de $1,56 \pm 0,16$ y de $2,44 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/g}$ Hb tras la suplementación. También se produjo un aumento significativo de los niveles de α -tocoferol ($p < 0,01$), pero en este caso solo en los niños suplementados con zumo de mandarina, con valores medios basales de $45,93 \pm 2,96$ y de $53,33 \pm 4,74$ nmol/mL después de la suplementación con zumo de mandarina, mostrados en la tabla 14. Y lógicamente se incrementaron los niveles plasmáticos de vitamina C ($p < 0,0001$) en los niños cuya intervención fue suplementada con zumo de mandarina, como muestra la tabla 14, donde los valores antes de la suplementación con zumo de mandarina eran de $41,43 \pm 6,43$ respecto a valores de $81,27 \pm 7,10$ $\mu\text{mol/L}$ después de la suplementación.

Tabla 14. Niveles de glutatión reducido, α -tocoferol y vitamina C antes y después de la intervención dietética de niños obesos.

	Dieta hipocalórica (n=20)		Dieta hipocalórica + zumo de mandarina (n=20)	
	Basal	Final	Basal	Final
Glutatión reducido, $\mu\text{mol/g}$ Hb	$1,56 \pm 0,16$	$2,44 \pm 0,13^{\S}$	$1,69 \pm 0,17$	$2,31 \pm 0,16^{\S}$
α-tocoferol, nmol/mL	$50,37 \pm 4,44$	$47,41 \pm 3,70$	$45,93 \pm 2,96$	$53,33 \pm 4,74^{\ddagger}$
Vitamina C, $\mu\text{mol/L}$	$39,24 \pm 5,01$	$42,16 \pm 5,50$	$41,43 \pm 6,43$	$81,27 \pm 7,10^{\S}$

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar. Hb = hemoglobina.

$^{\S}p < 0,0001$ vs basal del mismo grupo; $^{\ddagger}p < 0,01$ vs basal del mismo grupo.

VII. DISCUSIÓN

VII.1. ZUMO DE MANDARINA

Entre los múltiples compuestos con efectos beneficiosos para la salud, los zumos de cítricos se caracterizan por contener diferentes compuestos bioactivos que actúan como “scavengers” de radicales libres (Sendra et al., 2006), pudiendo considerarse el análisis de esta actividad “scavenger” como una primera aproximación del potencial efecto preventivo del consumo de zumo de mandarina. De este modo, en el presente estudio se ha concluido que el zumo de mandarina posee una elevada capacidad antioxidante, siendo el efecto “scavenger” del zumo de mandarina más efectivo frente a radicales hidroxilo que frente a radicales superóxido. Esta diferencia podría estar relacionada con las diferentes estructuras químicas que presentan los polifenoles y los carotenoides existentes en el zumo de mandarina, ya que la capacidad de actuar como “scavenger” de radicales viene determinada por ciertas características estructurales, junto con otros factores que afectan a la actividad antioxidante de dichos compuestos, tales como la naturaleza y la posición de los sustituyentes, (Bors et al., 1990; Rice-Evans et al., 1996; Moure et al., 2001; Tsao, 2010), pero también de la naturaleza de las especies oxidantes (Young and Lowe, 2001).

Además, se conoce bien que los diversos nutrientes proporcionados por los alimentos pueden tener un efecto sinérgico. Un ejemplo de ello es el efecto protector recíproco que ejercen los flavonoides y el ácido ascórbico frente a su propia oxidación o frente a fenómenos de

oxidación inducida (Gorinstein et al., 2005). Así pues, como otros bioflavonoides, la hesperidina (la principal flavanona de la mandarina) es más eficaz cuando se administra en combinación con vitamina C (Garg et al., 2001), difiriendo el efecto de los compuestos por sí solos del efecto de la mezcla de ellos. De ahí la importancia de la suplementación con un alimento y no de suplementos con antioxidantes aislados.

Según los resultados obtenidos, tanto los polifenoles como los carotenoides podrían ser considerados como los principales compuestos responsables de la protección frente a radicales hidroxilo. Este efecto es de gran relevancia debido a la gran reactividad de estos radicales y su implicación biológica en los procesos de oxidación de biomoléculas. Además, estos resultados podrían apoyar el uso de zumo de mandarina como suplemento dietético.

VII.2. BIODISPONIBILIDAD DEL ZUMO DE MANDARINA

Los beneficios del zumo de mandarina, dependen de la ingesta y de la biodisponibilidad de sus compuestos polifenólicos, así como de los carotenoides, que pueden variar ampliamente de unos a otros. Los estudios sobre la biodisponibilidad de estos compuestos son limitados, realizándose la mayoría con compuestos individuales, o con otros alimentos.

VII.2.1. En animales de experimentación

En el estudio de biodisponibilidad realizado en las ratas, se observó que, asociado al consumo del zumo de mandarina concentrado, se detectaba un aumento significativo del contenido de antioxidantes en plasma a los 60 minutos. Ello implica una significativa capacidad antioxidante en plasma, lo cual fue observado también a los 60 minutos de la ingestión del concentrado de zumo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tong y colaboradores en 2012, los cuales mostraban los perfiles de concentración-tiempo de 5 diferentes glicósidos de flavanona en plasma de rata tras la administración oral de un extracto de un cítrico. Entre dichos glicósidos se encontraba la hesperidina, que se caracteriza por ser la principal flavanona en la mandarina y poseer actividad antioxidante, que obtenía una absorción máxima entre los 30 minutos y los 60 minutos. Por tanto, los resultados obtenidos para los antioxidantes totales y para la actividad antioxidante podían deberse en parte a algunos de estos glicósidos de flavanona que contiene el zumo de mandarina, pero sin olvidar que la mandarina es rica en otros flavonoides, en carotenoides o en vitamina C, sin que consten resultados farmacocinéticos de dichos compuestos antioxidantes en ratas.

VII.2.2. En humanos

En el caso de humanos, tras la ingestión de 500 mL de zumo de mandarina en ayunas, también se observó una asociación con el incremento de manera significativa de los antioxidantes totales a los 135 minutos de la ingesta, así como de la capacidad antioxidante total

plasmática determinada mediante los diferentes métodos. La contribución de los carotenoides por parte del zumo de mandarina sobre el contenido de antioxidantes totales, puede ser, quizás, una de las causas que contribuyen al aumento de la capacidad antioxidante total plasmática en humanos. Apoyando estos resultados existen diferentes estudios, como en el caso de aquél que determina la concentración alcanzada de β -criptoxantina después de la administración de una única dosis procedente de papaya en humanos, donde se observa que existe una absorción de dicho compuesto y que alcanzará su absorción máxima a partir de las 6 horas de la ingestión (Breithaupt et al., 2003). Así como también en el caso de los glicósidos de flavanona, los cuales también presentan su absorción máxima en humanos en torno a las 6 horas de la ingesta de zumo de naranja (Erlund et al., 2001; Manach et al., 2003). O bien la absorción de agliconas de los glicósidos de flavanona, tales como hesperitina y naringenina, cuya administración oral de forma aislada en humanos presenta su absorción máxima a las 4 y 3,5 horas, respectivamente (Kanaze et al., 2007). En consecuencia, estos estudios demuestran que a los 135 minutos todavía no se alcanzado la absorción máxima de los compuestos antioxidantes presentes en el zumo de mandarina. Ello explica que la absorción de la β -criptoxantina no fuera significativa a los 135 minutos tras la ingesta, a pesar de ser el carotenoide más abundante en el zumo de mandarina, puesto que tras la ingesta de éste último la absorción máxima de dichos compuestos se alcanza, aproximadamente, a partir de las 4 horas si se administran de forma aislada, o de las 6 horas si se administra el alimento. Además, los

resultados obtenidos de antioxidantes totales se encuentran correlacionados con los obtenidos para la capacidad antioxidante total, pudiendo ser debida a la absorción de dichos compuestos antioxidantes presentes en el zumo de mandarina o como consecuencia de que el consumo del zumo incremente la capacidad antioxidante de otros compuestos del plasma, como ocurre con otros alimentos (Modun et al., 2008).

VII.3. ESTUDIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

VII.3.1. Efecto del tamoxifeno

El tamoxifeno a dosis elevadas produce hepatotoxicidad como consecuencia de la producción o inducción de especies oxigénicas reactivas (Hard et al. 1993), también actúa como hepatocarcinogénico en ratas (Ahotupa et al., 1994; Karki et al., 2000; Caballero et al., 2001), como consecuencia de la formación de aductos de ADN (Hemminki et al., 1995; Hellmann-Blumberg et al., 2000).

Se decidió comprobar el daño producido por el TAM mediante el seguimiento de la variación del peso corporal durante el tratamiento, puesto que la disminución del peso del animal puede ser un signo indirecto de daño hepático. Los resultados mostraron, en primer lugar, una disminución significativa del peso corporal de las ratas que pertenecían al grupo tratado con doble dosis de tamoxifeno (T2: 1,54 mg/kg/día); en segundo lugar, una disminución considerable en el grupo tratado con la dosis de tamoxifeno T1 (0,77 mg/kg/día); y, en

tercer lugar, una aparente estabilización en los dos grupos suplementados con zumo de mandarina, de modo que el zumo de mandarina podría mitigar la pérdida de peso provocada por el TAM. Dichos resultados se encuentran apoyados por otro estudio con resultados similares realizado por El-Beshbishy en 2005b. Por otro lado, para evaluar de manera directa el daño a nivel hepático, se determinaron los niveles de las aminotransferasas, donde se observó que el tratamiento con tamoxifeno en ambas dosis iba acompañado de un incremento de sus niveles, indicando daño hepático. Sin embargo, la suplementación con el zumo de mandarina mantenía los niveles próximos a los valores basales mostrando, pues, tener capacidad en la prevención de daño hepático inducido por tamoxifeno. Estudios similares realizados con tamoxifeno como inductor de estrés oxidativo muestran unos efectos preventivos similares, cuando se realiza un cotratamiento con compuestos con capacidad hepatoprotectora y antioxidante procedentes de bayas de schizandra o del té verde (El-Beshbishy, 2005a,b).

VII.3.2. Daño oxidativo a biomoléculas y defensa antioxidante

El tamoxifeno ha mostrado provocar algunos efectos secundarios graves, entre los que se encuentra una actividad genotóxica fuerte (Greaves et al., 1993; Phillips, 2001; Martin et al., 2003; Poirier and Schild, 2003), que se deben a una activación metabólica del TAM, convirtiéndose en un epóxido genotóxico o bien en 4 y 2-hidroxi metabolitos, mediante la activación enzimática hepática del citocromo P450 monooxidasa o de diferentes peroxidases o por oxidación

hepática del grupo etilo del TAM (Poon et al., 1993; Lim et al., 1994; Phillips, 2001). Y son estos metabolitos los que se pueden unir covalentemente con el ADN, los lípidos y las proteínas, induciendo el daño irreversible a estas moléculas biológicamente activas y a las estructuras de membrana. Asimismo, los metabolitos del TAM pueden ser oxidados por el oxígeno molecular, dando lugar a la formación de ROS en el proceso cíclico de reducción-oxidación (Han and Liehr, 1992; Pagano et al., 2001).

Consecuentemente, se evaluó el estrés oxidativo mediante biomarcadores tanto de daño oxidativo como de defensa antioxidante. En este sentido, el daño oxidativo a macromoléculas se determinó, en primer lugar, mediante el malondialdehído (MDA), que refleja peroxidación lipídica; en segundo lugar, a través de los grupos carbonilo, generados por la oxidación de los aminoácidos; y, por último, mediante la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), como marcador de la oxidación del ADN. Mientras que la defensa antioxidante se determinó mediante el antioxidante endógeno GSH, y los antioxidantes exógenos α -tocoferol y vitamina C, lo que nos permitió una mejor estimación del estado oxidativo.

En este estudio, se ha comprobado que el suplemento de zumo de mandarina durante 4 semanas ejerce un efecto significativo sobre el estado de estrés oxidativo producido después de la administración con TAM, como puede apreciarse en los distintos biomarcadores de daño oxidativo, así como en los de la defensa antioxidante.

Los resultados obtenidos a nivel plasmático muestran como los niveles de MDA en los grupos suplementados con zumo de mandarina para ambas dosis de TAM se mantienen en niveles similares al grupo control, lo que implicaría una menor presencia de peróxidos lipídicos y un menor daño a membranas celulares (Ameen et al., 2004; Navarro et al., 2004; Sahin and Gumuslu, 2004; Husain et al., 2005). Esto podría ser explicado por la presencia de flavonoides en el zumo de mandarina, ya que existen evidencias de que se localizan cerca de la superficie de la membrana lipídica para captar los radicales libres y, por tanto, prevenir la peroxidación lipídica de la membrana expuesta a radicales oxigénicos acuosos (Terao et al., 1994). Recientemente, se ha observado que las interacciones de los polifenoles con las membranas (con lípidos y proteínas) pueden ocurrir en concentraciones de flavonoides bajas, existiendo interacciones flavonoide-lípido o flavonoide-proteína, ya que se atribuyen a una mayor especificidad molecular. En dichas interacciones con los lípidos y proteínas de membrana podrían mediar ciertos efectos biológicos de los polifenoles, porque la presencia de ambos dominios, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, en la mayoría de las moléculas polifenólicas les permiten localizarse a diferentes niveles en la membrana: o en la superficie de la bicapa adsorbida en la cabeza polar de los lípidos y/o insertado en la bicapa e interactuando con las cadenas hidrofóbicas de los lípidos. De modo que, por una parte, cuando los polifenoles son adsorbidos en la superficie de membrana, los polifenoles podrían proporcionar una barrera física para los radicales hidrosolubles; y, por otra parte, cuando los polifenoles son

insertados en la bicapa lipídica, estarían en estrecha proximidad para actuar como “scavenger” del radical lipídico, radical peroxilo lipídico, y de otros radicales. En definitiva, sería así como los flavonoides pueden proteger las membranas y sus componentes de la oxidación, proporcionando una protección antioxidante a través de mecanismos no completamente relacionados con la acción “scavenger” de radicales libres o acciones quelantes de metales (Fraga et al., 2010).

Asimismo, la presencia de carotenoides en el zumo de mandarina nos permitiría explicar los resultados obtenidos, ya que aquellos se localizan en el plasma, el cual constituye el medio de distribución de estos pigmentos, manteniendo siempre una reserva de carotenoides circulante, transportados en lipoproteínas (Michaud et al., 1998; El-Sohemy et al., 2002). De este modo, los carotenoides presentes en el plasma son capaces de atrapar al oxígeno singlete, un potencial iniciador de la peroxidación lipídica (Clinton, 1998). Además, el zumo de mandarina presenta un alto contenido en vitamina C, que desempeña un papel antioxidante en la defensa extracelular contra los radicales libres, inactivando directamente estos compuestos activos en medio acuoso e, indirectamente también, reduciendo la peroxidación lipídica al participar en la regeneración de la vitamina E reducida (Packer, 1991). En suma, los resultados obtenidos son apoyados por otros estudios concluyentes de que una dieta rica en frutas y verduras puede proteger contra la peroxidación lipídica *in vivo* (Fremont et al., 1998; Miller et al., 1998; Bub et al., 2000; Álvarez-Suarez et al., 2011; Keles et al., 2012).

La toxicidad del tamoxifeno radica en la capacidad de reaccionar con las distintas biomoléculas generando daños oxidativos permanentes. En el caso de las proteínas, se produce a través de la formación de grupos carbonilo, que afectará a la conformación y, por tanto, al funcionamiento de las proteínas.

Del mismo modo que ocurre para el MDA, los resultados obtenidos a nivel plasmático para el contenido de grupos carbonilo (CGC) reflejan como la suplementación con zumo de mandarina, para las dos dosis estudiadas, mantenía niveles similares a su control e, incluso, la suplementación de zumo de mandarina con el tratamiento con suero fisiológico reducía de manera significativa el contenido de grupos carbonilo con respecto al control. Esto pudiera ser debido al hecho de que algunos polifenoles, tales como la hesperidina (la flavanona más abundante en el zumo de mandarina), tienen una gran afinidad por las proteínas como, por ejemplo, la albúmina, sirviendo de base para poder explicar la acción protectora que presenta frente a las proteínas el zumo de mandarina (Hegde et al., 2011).

La selección del tejido hepático como tejido analizado en este estudio se debe al hecho de que se ha demostrado que el TAM produce hepatotoxicidad (Desai et al., 2002). De hecho, el tratamiento con tamoxifeno produjo un aumento de los marcadores de daño oxidativo en homogenado de hígado total, siguiendo la misma conducta que los obtenidos en el plasma.

Se cree que la peroxidación lipídica mediada por especies oxigénicas reactivas, es una importante causa de la destrucción y del daño a las membranas celulares, sugiriéndose como factor contributivo al desarrollo del daño tisular mediado por TAM (Stanley et al., 2001). La peroxidación lipídica puede ser atribuida a la circunstancia de que la vía hexosa monofosfato (HMP) en hígado es fuertemente inhibida por altas dosis de tamoxifeno, por lo que disminuye el nivel de NADPH dentro de las células, siendo más sensibles a ROS (Tabassum et al., 2006).

Así, los resultados obtenidos en este estudio reflejan, de un lado, un estado de estrés oxidativo tras la administración de tamoxifeno que fue acompañada por el incremento de los niveles de MDA en homogenado de hígado total, encontrándose apoyados dichos resultados por otros estudios (Ahotupa et al., 1994; Stanley et al., 2001); y, de otro lado, como la administración conjunta con zumo de mandarina (es decir, un suplemento con actividad antioxidante) es capaz de mantener los niveles de MDA similares a los del grupo control, existiendo algunos estudios que reflejan resultados similares (El-Beshbishy, 2005a, El-Beshbishy, 2005b, Tabassum et al., 2006).

En este estudio se puede observar el papel protector del zumo de mandarina frente al estrés oxidativo inducido por tamoxifeno, puesto que del mismo modo que ocurre con los resultados obtenidos para el MDA, los resultados reflejan que los niveles del CGC en homogenado de hígado total tras la suplementación conjunta con zumo de

mandarina para ambas dosis de TAM se presentan similares al grupo control e, incluso, la suplementación con zumo de mandarina, de la misma manera que ocurría en plasma, es capaz de reducir los niveles del CGC por debajo del grupo control. Estos resultados confirman la capacidad del zumo de mandarina de combatir las ROS. Existen muchos tipos diferentes de modificaciones oxidativas a proteínas que pueden ser inducidas directamente por ROS o, indirectamente, por reacciones secundarias por subproductos de estrés oxidativo. Así pues, los grupos carbonilo podrían introducirse en las proteínas por reacción con aldehídos, como por ejemplo con el 4-hidroxi-2-nonenal, es decir, el malondialdehído, producidos durante la peroxidación (Berlett and Stadtman, 1997). Por tanto, el incremento del MDA por acción del TAM podría, a su vez, provocar un aumento de los niveles del CGC. Hecho este que en principio estaría de acuerdo con los resultados obtenidos, puesto que los efectos del TAM sobre el contenido de grupos carbonilo en proteínas se hacen claramente notorios en este estudio. Claramente, el zumo de mandarina actuaría evitando el aumento del contenido de grupos carbonilo inducido por TAM, evitando el daño provocado por oxidación a las proteínas y, por tanto, la pérdida de permeabilidad de membrana y la disfunción de las proteínas celulares.

Por otra parte, los metabolitos del TAM pueden ser oxidados por el oxígeno molecular, dando lugar a la formación de ROS en el proceso cíclico de reducción-oxidación (Han and Liehr, 1992; Pagano et al., 2001). Los ROS formados, en particular, los radicales hidroxilo,

conducen a daño oxidativo al ADN monitorizado por la formación de 8-OHdG (Shigenaga and Ames, 1991; Winn and Wells, 1995). Los estudios realizados *in vivo* han demostrado una fuerte correlación entre la producción de 8-OHdG y el desarrollo de tumores (Kim and Wells, 1996) o carcinogénesis (Floyd, 1990).

En concordancia con los anteriores resultados en homogenado de hígado total, los resultados obtenidos para la 8-OHdG muestran como el TAM induce daño al ADN y como la suplementación con zumo de mandarina es capaz de mitigar los efectos del TAM hasta alcanzar valores normales. Sin embargo, los metabolitos del TAM pueden reaccionar con el ADN para formar aductos de ADN, siendo más conveniente la medición de estos aductos mediante métodos como ³²P-postlabeling y espectrometría de masas, adecuados para ver el daño del ADN por parte del tamoxifeno (Gaikwad and Bodell; 2012).

De este modo, se subraya una protección antioxidante por parte del zumo de mandarina con respecto al daño oxidativo a macromoléculas a nivel hepático. Esta protección antioxidante podría verse justificada por el hecho de que la hesperitina (la aglicona de la hesperidina) de la que es rico el zumo de mandarina, a pesar de que se encuentra distribuida de manera desigual en los diferentes tejidos y en el plasma, presenta una mayor concentración en el hígado, como corrobora un estudio realizado por Takumi y colaboradores en 2011, tras la suplementación con hesperitina durante 4 semanas en ratas Wistar.

El GSH es un importante antioxidante intracelular que forma parte de los principales sistemas de defensa, actuando directa o indirectamente como “scavenger” de las ROS, tales como hidroperóxidos, peroxinitrito y H_2O_2 a través de reacciones enzimáticas, evitando que actúen sobre los lípidos, proteínas y ADN. El GSH en la dieta puede ser parcialmente absorbido en el intestino delgado y puede ser sintetizado de novo, por tanto, el GSH es un antioxidante tanto endógeno como exógeno. Además, el GSH puede reaccionar con una amplia variedad de compuestos xenobióticos electrofílicos, formando aductos mediante una reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (Hayes and Pulford, 1995; Sies, 1999).

En los resultados obtenidos en este estudio se puede apreciar que los niveles de GSH, tanto a nivel plasmático como hepático, disminuyen respecto al control en los grupos a los que se les administró tamoxifeno. Existiendo diferentes estudios que, por una parte, muestran que los metabolitos del TAM, pueden formar aductos con el GSH (Fan and Bolton, 2001), provocando la depleción del GSH; y, por otra parte, sugieren que el tamoxifeno podría inhibir la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, contribuyendo, tanto a un descenso de la disponibilidad de NADPH como a una inhibición de la actividad de la glutatión reductasa y, finalmente, provocando una inhibición del ciclo del GSH. La reducción significativa de los niveles de GSH provocado por el TAM representa una alteración en el estado redox celular, lo que puede sugerir que las células puedan ser más sensibles a ROS,

resultando subsecuentemente en la reducción de la efectividad del sistema de defensa antioxidante enzimático (Tabassum et al., 2006).

Sin embargo, cuando se les suplementó al mismo tiempo con zumo de mandarina, estos niveles se aproximaban de manera significativa a los niveles del grupo control. Resultados similares fueron encontrados por otros autores, donde diferentes antioxidantes protegían frente al tamoxifeno (El-Beshbishy, 2005a,b; Tabassum et al., 2006). Y en otro estudio donde se inducía daño a tejidos, la administración oral de hesperidina en ratas actuaba manteniendo los niveles de GSH intracelular y, a su vez, la acción de la glutatión peroxidasa, cuya principal función es proteger al organismo de los hidroperóxidos formados de forma endógena y, por tanto, previniendo la peroxidación lipídica y subsecuente daño celular (Pradeep et al., 2012). Por lo que, teniendo en cuenta además que en los resultados obtenidos los niveles de GSH son aumentados con la suplementación con zumo de mandarina, se podría deducir que sus compuestos bioactivos pueden actuar en la prevención de la disminución de los niveles de GSH, no limitando la actuación de los enzimas de su metabolismo, reduciéndose el daño a los tejidos.

La vitamina E se halla en medio lipídico debido a su hidrofobicidad, sobre todo en lipoproteínas de baja densidad y en lípidos de membrana. Es ahí donde ejerce fundamentalmente su acción antioxidante, protegiendo a los lípidos del ataque de los radicales libres, puesto que inhibe la peroxidación lipídica al imposibilitar la

propagación de los mismos (Ricciarelli et al., 2001). De hecho, la vitamina E constituye el principal antioxidante liposoluble que protege a los lípidos contra el daño oxidativo, tanto en plasma (Burton et al., 1982) como en eritrocitos (Burton et al., 1983). El contenido de esta vitamina determina la susceptibilidad al daño causado por radicales hidroxilo, alcoxilo, peroxilo y oxígeno singlete, entre otros, en lipoproteínas de baja densidad, microsomas, hepatocitos, u órganos enteros (Cadenas et al., 1984; Reed et al., 1986; Wang and Quinn, 1999; Hong et al., 2004).

En este estudio, los resultados muestran que el tamoxifeno reduce de manera significativa los niveles de α -tocoferol con respecto al grupo control tanto en plasma como en hígado, provocando que el hígado sea vulnerable al daño oxidativo producido por depleción de vitamina E, ya que como describen otros autores existe daño oxidativo hepático y alteraciones asociadas como consecuencia de la deficiencia en vitamina E (Saypil et al., 1991; Ramírez-Tortosa et al., 2001; Morante et al., 2005). En cambio, los animales suplementados con zumo de mandarina mantendrían los niveles de α -tocoferol similares al grupo control, contrarrestando el efecto del tamoxifeno. En consecuencia, el zumo de mandarina podría inhibir la peroxidación lipídica en las membranas puesto que, al mantener los niveles de α -tocoferol, evitaría la acumulación de hidroperóxidos, ya que funciona como un “canal molecular” a través del cual los radicales abandonan la zona hidrocarbonada de las membranas. El tocoferol, al ser oxidado, forma radicales hidroquinona estables que no perturban la química celular y,

posteriormente, son regenerados a vitamina E mediante la aceptación de un electrón proveniente de agentes reductores como la vitamina C (Azzi et al., 1995; Sies and Stahl, 1995; Niki et al., 1995).

Además, es conveniente destacar que en un estudio realizado por Chen y colaboradores en 2010 se evaluó la capacidad de la hesperidina (glicósido de flavanona más abundante en el zumo de mandarina) para atenuar el daño celular inducido por el peróxido de hidrógeno en hepatocitos, al incrementar la defensa antioxidante celular. Dicho estudio demostró que la hesperidina estimulaba la expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1) para proteger a los hepatocitos contra el estrés oxidativo. Además, la hesperidina también promovía la translocación nuclear del factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2-related factor), que es un factor de transcripción que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (Antioxidant Response Element), que puede ser activado por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa o por productos endógenos del estrés oxidativo tales como el 4-hidroxinonenal (Numazawa et al., 2003; Ishii et al., 2004). Asimismo, la hesperidina mostraba la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2). Además, el inhibidor de ERK1/2 inhibía significativamente la estimulación de HO-1 mediada por hesperidina y la translocación nuclear de Nrf2. Tomados en conjunto todos estos hallazgos anteriores, sugirieron que la hesperidina

aumentaba la capacidad de la defensa antioxidante celular a través de la inducción de HO-1, mediante la señalización por ERK/Nrf2. Por tanto, se concluía que la hesperidina presentaba un elevado potencial como agente terapéutico en el tratamiento de daño hepático relacionado con estrés oxidativo y en disfunciones hepáticas (Chen et al., 2010), protegiendo así las células del estrés oxidativo.

En definitiva, a pesar de que la disminución de la defensa antioxidante en animales los hace más susceptibles a la hepatotoxicidad (Palomero et al., 2001), como sería el caso de los animales tratados con tamoxifeno, se puede observar como el zumo de mandarina protege la integridad del tejido hepático por la estabilización de la peroxidación lipídica y de la formación de grupos carbonilo mediada por las especies oxigénicas reactivas. Igualmente, el mecanismo de protección del zumo de mandarina también podría estar relacionado con el incremento del GSH intracelular, así como del α -tocoferol.

VII.3.3. Daño oxidativo a nivel mitocondrial

El tamoxifeno (y el 4-hidroxitamoxifeno) actúa como un agente de desacoplamiento y como un inhibidor potente del transporte electrónico. El tamoxifeno trae consigo un colapso del potencial de membrana (Tuquet et al., 2000). De ahí que se determinen dos complejos de la cadena de transporte electrónico: primero, el complejo I o NADH deshidrogenasa, ya que es la primera ruta donde se pueden formar radicales libres en la mitocondria, como el ión superóxido (Murphy, 2009), que tras la dismutación dará lugar a otras especies

oxigénicas entre ellas, el radical hidroxilo; y, segundo, el complejo IV o citocromo oxidasa, que junto al complejo I, son particularmente vulnerables al ataque de las especies oxigénicas reactivas, pudiendo alterar dichas especies los lípidos de la membrana mitocondrial interna, con la consiguiente pérdida de función de los complejos respiratorios, sobre todo del I y IV (Zhang et al., 1990). Sirva como ejemplo la citotoxicidad del óxido nítrico, atribuida a la inhibición de la respiración mitocondrial por unión al complejo IV mitocondrial (Bolaños et al., 1994) y al complejo I, provocando así tanto la inhibición de la fosforilación oxidativa como un descenso en la síntesis de ATP (Clementi et al., 1998).

Al estudiar la actividad del complejo I en las mitocondrias de hígado de rata, se observa una disminución significativa en la actividad del complejo a dosis altas de TAM, pero a menor dosis no provoca tal efecto, del mismo modo que reflejan los resultados obtenidos por otro estudio llevado a cabo por Tuquet y colaboradores en 2000. En cambio, en el caso del complejo IV, se puede observar para ambas dosis de tamoxifeno el efecto sobre la actividad de dicho complejo, mostrando una disminución significativa con respecto al grupo control. Del mismo modo, otro estudio obtiene similares resultados (Tuquet et al., 2000), mostrando distintos ensayos enzimáticos y estudios espectroscópicos que indican que el tamoxifeno inhibe la transferencia de electrones en la cadena respiratoria en los niveles del complejo IV (citocromo-c oxidasa). Estos datos implican que la membrana mitocondrial interna representa una diana para el

tamoxifeno, localizándose uno de los sitios más sensibles para el tamoxifeno en el complejo IV.

Tanto para el complejo I como para el complejo IV, el zumo de mandarina protege a la cadena de transporte evitando la disfunción mitocondrial provocada por el tamoxifeno. Pudiendo ser explicado por otro resultado encontrado por otro grupo de investigación, donde la hesperidina presentaba actividad antiperoxidativa y siendo susceptible de haber ayudado a proteger la membrana mitocondrial del ataque de los radicales libres. Asimismo, más resultados obtenidos desde estudios microscópicos de transmisión de electrones revelan, de un lado, daño mitocondrial caracterizado por la pérdida de integridad mitocondrial, crestas distorsionadas y partículas densas de electrones; y, de otro lado, como el tratamiento con hesperidina mantiene la integridad mitocondrial, protegiéndola contra el daño mitocondrial (Kamaraj et al., 2011).

En definitiva, es conocido que los cambios en la actividad de los complejos dan lugar a una alteración de la cadena de transporte de electrones con un aumento en la producción de radicales libres. Además, los cambios o alteraciones en la membrana mitocondrial podrían asociarse a un aumento del estrés oxidativo y a la conducción hacia la necrosis celular o apoptosis (Ott et al., 2007). En este estudio, observamos como el zumo de mandarina puede prevenir alteraciones tanto en el complejo I como en el complejo IV. Por lo que estos resultados podrían ser indicativos de que el zumo de mandarina

desempeñe un importante papel no sólo en la protección de la mitocondria frente al daño oxidativo, sino también en la modulación de la apoptosis o necrosis.

El coenzima Q tiene una importante función en la cadena de transporte de electrones mitocondrial como portador de electrones. En la membrana mitocondrial interna, una frecuencia respiratoria normal requiere el mantenimiento de una alta concentración de coenzima Q, por lo que incluso una disminución limitada de dicha concentración es perjudicial para el mantenimiento de una función normal. El coenzima Q constituye un componente endógeno el cual puede proporcionar beneficios protectores como antioxidante (Crane, 2001; Quiles et al., 2005; Lenaz et al., 2007). Se ha demostrado que el coenzima Q es un antioxidante que protege a las células tanto directamente, evitando la peroxidación lipídica (Tang et al., 2004), como indirectamente, mediante la regeneración otros antioxidantes tales como ascorbato y α -tocoferol (Quiles et al., 2002; Genova et al., 2003). De modo que nos permite comprobar si la mitocondria se encuentra protegida frente a los radicales libres.

Los resultados de este estudio muestran que los niveles del coenzima Q₉ y del coenzima Q₁₀ disminuyeron significativamente con respecto al grupo control en las mitocondrias de hígado de rata, como resultado del tratamiento con tamoxifeno. Resultados similares fueron encontrados en otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación pero, en este caso, con un tratamiento con adriamicina

(Valls-Bellés et al., 2010). La suplementación con zumo de mandarina presenta un efecto protector evitando la oxidación de ambas coenzimas Q y, en consecuencia, su disminución. Este efecto protector podría ser debido a la disminución del estrés oxidativo en presencia de antioxidantes como resultado de la ingesta de zumo de mandarina o para la regeneración de coenzimas por efecto de la vitamina E (Kagan et al., 1990). En este sentido, se ha observado que los niveles de α -tocoferol se encuentran incrementados en las ratas suplementadas con zumo de mandarina.

En definitiva, los resultados obtenidos a nivel mitocondrial nos proporcionan evidencias de la restauración de la respiración mitocondrial después de la inhibición inducida por tamoxifeno a través del consumo de zumo de mandarina. Así, el zumo de mandarina puede desempeñar un rol importante en la modulación de las consecuencias bioenergéticas y funcionales negativas asociadas con el tratamiento de tamoxifeno.

VII.4. ESTUDIO EN HUMANOS

VII.4.1. Niños con hipercolesterolemia

En el presente estudio se ha demostrado que el consumo de zumo de mandarina durante 4 semanas ejerce un importante efecto sobre los biomarcadores de estrés oxidativo, así como una mejora en las defensas antioxidantes de niños hipercolesterolémicos. Los datos epidemiológicos indican que una dieta rica en frutas y verduras

protege contra las enfermedades cardiovasculares, siendo los antioxidantes los que se consideran los responsables de esta protección (Lairon, 2007). Las poblaciones cuyos hábitos dietéticos comprenden un gran consumo de alimentos vegetales, incluyendo cítricos, tienen un menor riesgo de enfermedad cardíaca isquémica (Kaliora et al., 2006).

En cuanto al perfil lipídico, la ingestión de 500 mL de zumo de mandarina diariamente durante 28 días no afectó significativamente en el colesterol total, ni en la HDL-c, ni en la LDL-c, ni en el índice aterogénico, ni en los autoanticuerpos frente LDL oxidada. Es posible que un período más prolongado de suplemento o una mayor ingesta diaria de zumo de mandarina pudieran tener un efecto beneficioso sobre los perfiles de lipoproteínas. De hecho, otro estudio refleja que 750 mL/día de zumo de naranja durante 28 días tuvo el efecto de reducir el colesterol en adultos (Kurowska et al., 2000). Sin embargo, es difícil garantizar el cumplimiento de estas grandes cantidades en los niños. La oxidación de la LDL es otro factor de riesgo de enfermedad coronaria. En efecto, este proceso desencadena los acontecimientos que conducen a la acumulación de lípidos en macrófagos, que es un paso temprano crítico en la formación de placas ateroscleróticas. La prevención de la oxidación de LDL puede ser esencial en las primeras etapas del proceso aterosclerótico, en lugar de en la enfermedad bien establecida, pudiendo retrasar la aparición y progresión de la lesión vascular. Obviamente, la prevención es particularmente importante en los niños. Sin embargo, en los resultados obtenidos los suplementos de

zumo de mandarina no afectan el título de anticuerpos de LDL oxidada. Aunque, cabe señalar que en el periodo basal, sólo el 20% de los niños tenían niveles de anticuerpos frente a la LDL oxidada considerados patológicos. Además, el título de anticuerpos anti-LDL oxidada no puede ser una medida precisa de LDL oxidada, porque está influenciado por la formación de complejos inmunes y por el aumento de la producción de anticuerpos (Miller et al., 2005).

Otro resultado a destacar del presente estudio es la reducción de los biomarcadores que reflejan la oxidación de lípidos y proteínas después de 28 días de suplementación con zumo de mandarina. Los niveles de MDA, marcador de peroxidación lipídica, disminuyeron significativamente después de la suplementación con zumo de mandarina. Una disminución de los niveles de MDA, que refleja una disminución en la liberación de radicales libres promotores de la oxidación de los lípidos de membrana, puede ayudar a reducir el riesgo de proceso aterosclerótico en niños hipercolesterolémicos. Igualmente, los niveles de grupos carbonilo se redujeron después de la suplementación con zumo de mandarina. La carbonilación proteica juega un papel importante en la etiología y en la progresión de la aterosclerosis, porque puede conducir a un cambio en la actividad o función de la proteína oxidada (Nguyen and Donaldson, 2005).

Con respecto a la defensa antioxidante, se observó que la suplementación con zumo de mandarina aumenta significativamente los niveles GSH. Este antioxidante celular ubicuo mejora la protección intracelular frente a una amplia variedad de especies prooxidantes y

aumenta la resistencia al daño oxidativo. Una posible explicación de dicho resultado es que otros antioxidantes (vitamina C y flavonoides) podrían inhibir la oxidación, evitando así la pérdida de glutatión. Además, se incrementaron los niveles de α -tocoferol plasmáticos al final del estudio. Se sabe que los compuestos antioxidantes ejercen efectos sinérgicos. Por ejemplo, los reactivos redox activos de la vitamina C y de los polifenoles presentes en el zumo reducen el radical tocoferoxilo y así se restauran los niveles de tocoferol (Mukai et al., 2005). Esto puede explicar el aumento de α -tocoferol identificado en el presente estudio. Cualquiera que sea el mecanismo de reacción de los antioxidantes, los distintos compuestos antioxidantes en el zumo de mandarina (por ejemplo, los flavonoides, los carotenoides, la vitamina C) parecen actuar de forma sinérgica, incrementando el efecto protector (Hassimotto et al., 2005).

En este estudio se presentan varias limitaciones. En primer lugar, es difícil asegurar el cumplimiento de las instrucciones de la dieta. Sin embargo, la adhesión a la suplementación es buena a juzgar por las medidas objetivas (vitamina C plasmática). De hecho, uno de los puntos fuertes de este estudio es que los niños no tuvieron que cambiar sus hábitos alimenticios. El período de estudio relativamente corto no se puede considerar una limitación importante debido a que para los efectos de la intervención dietética normalmente no es necesario un período largo de inducción. De hecho, otro estudio refleja que los efectos del zumo de naranja frente a la peroxidación lipídica en adultos se hizo evidente después de 14 días (Sánchez-

Moreno et al., 2003b). No obstante, no se han encontrado cambios clínicos pertinentes en los niños, tal vez porque éstos podrían necesitar más tiempo o una mayor cantidad de antioxidantes para manifestarse. Últimamente, se ha demostrado que la inyección intravenosa de una dosis alta de vitamina C reduce la disfunción endotelial y los marcadores inflamatorios (Böhm et al., 2007). En el presente estudio también se ha encontrado que el suplemento de mandarina provocó un aumento de los niveles de folato séricos, pudiendo evitar un aumento de la homocisteína, un factor importante de riesgo cardiovascular.

Por otra parte, el peso de los pacientes no cambió durante el transcurso del presente estudio, pero el consumo de energía disminuyó ligeramente aunque los niños no cambiaron sustancialmente su dieta. Los resultados obtenidos en el presente estudio respaldan un artículo anterior en que el consumo de fruta en forma de zumo no se asoció con sobrepeso y no afectó negativamente al consumo de calcio (O'Connor et al., 2006). Estos resultados obtenidos tienen implicaciones importantes porque los zumos de frutas se han considerado durante mucho tiempo como bebidas energéticas y bajas en nutrientes, habiéndose estimado como una de las causas del aumento de la prevalencia de la obesidad en los niños (Striegel-Moore et al., 2006).

De acuerdo con las recomendaciones actuales, no más de un tercio de porciones de frutas debe ser en forma de zumo de fruta 100% y al menos dos tercios debe ser fruta fresca porque sus efectos positivos se

correlacionan con su alto contenido de fibras dietéticas y antioxidantes (Gidding et al., 2006). Sin embargo, los consumidores (especialmente niños) cada vez más prefieren zumos de fruta fresca (Serra-Majem et al., 2001). En los últimos años, los niños han aumentado el consumo de alimentos con un alto contenido en energía y nutrientes de mala calidad (por ejemplo, refrescos, pasteles, dulces), con lo que aumenta el riesgo de enfermedades degenerativas como obesidad, diabetes y aterosclerosis. Es concebible que beber zumo de mandarina 100% natural puede reducir el consumo de bebidas azucaradas con concentrados de frutas o productos de bollería, mejorando el balance antioxidante.

Por último, para evitar los factores de riesgo cardiovascular, las estrategias dietéticas deberían centrarse en la prevención y gestión del sobrepeso y la obesidad y en cómo prevenir o reducir los efectos de la aterosclerosis. Los datos del presente estudio demuestran que los suplementos dietéticos con zumo de mandarina 100% puro disminuyen los biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo y aumentan la concentración de “scavengers” plasmáticos importantes. Este estudio subraya que las intervenciones preventivas pueden disminuir o paliar el estrés oxidativo. En definitiva, el zumo de mandarina es una excelente fuente de antioxidantes, pudiendo ayudar a prevenir la enfermedad aterosclerótica cuando se combina con otros factores dietéticos y de estilo de vida.

VII.4.2. Niños con obesidad

Este estudio ofrece nuevas ideas sobre cambios en los biomarcadores de estrés oxidativo durante un período de intervención breve en niños obesos. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la ingesta de zumo de mandarina añadido a la dieta hipocalórica influye positivamente en la defensa antioxidante y disminuye los biomarcadores de estrés oxidativo.

El aumento de masa grasa expone a los niños a una mayor producción de especies oxigénicas reactivas (Mohn et al., 2005; Vincent et al., 2007; Codoñer-Franch et al., 2010) que pueden ser un mecanismo subyacente a la iniciación y progresión de enfermedades potencialmente relacionadas con la obesidad. Por tanto, para evitar el desarrollo de los trastornos secundarios, las estrategias intervencionistas deberían centrarse en la atenuación del estrés oxidativo. El estrés oxidativo también aumenta con la edad, por lo que contrarrestarlo de un modo precoz debería considerarse para prevenir enfermedades que pudieran aparecer más adelante en la vida.

Diversos estudios en adultos obesos han mostrado una reducción de los biomarcadores de estrés oxidativo después de la pérdida de peso inducida por modificaciones dietéticas (Vincent et al., 2007), pero los datos disponibles son limitados en niños. Las recomendaciones dietéticas son un componente fundamental de cualquier programa de pérdida de peso. Aunque diversas intervenciones dietéticas pueden ser propuestas (Demol et al., 2009), un bajo consumo de grasa o una dieta

restringida energéticamente es lo más comúnmente recomendado para los niños. Estudios recientes han encontrado una disminución en los marcadores de estrés oxidativo en niños obesos tras un período de intervención con pérdida de peso y restricción dietética (Mohn et al., 2005). Una disminución en los niveles de LDL oxidada y de MDA y una función endotelial mejorada se encontraron después de un programa de pérdida de peso que incluía dieta y ejercicio (Kelishadi et al., 2008). En contraste, en el presente estudio no se ha encontrado una disminución en los niveles de MDA o de LDL oxidada en los niños tras la dieta hipocalórica sin suplementación de zumo de mandarina. Esta diferencia puede ser atribuible a la menor duración del período de intervención, los cambios más mínimos se observaron en la pérdida de peso y masa grasa, o a la ausencia de un programa de ejercicios en el presente estudio, a pesar de que el estrés oxidativo puede exacerbase con el ejercicio físico agudo. Por otra parte, otro estudio mostró una reducción más pronunciada en el daño oxidativo a proteínas en los niños obesos con suplementos de salvado de la dieta hipocalórica (Krzystek-Korpacka et al., 2008), destacando la importancia de algunos alimentos en el estrés oxidativo (Baur, 2007). Del mismo modo, se ha obtenido un resultado relevante en el presente estudio que muestra que la reducción de biomarcadores que reflejan la oxidación de lípidos y de proteínas estuvo presente sólo en el grupo de niños con suplemento de zumo de mandarina. No podemos excluir que una dieta rica en otro tipo de frutas y verduras también pudiera contrarrestar la oxidación de lípidos y proteínas (Schroder, 2010), pero el zumo de

mandarina presenta la ventaja de un consumo fácil y una buena aceptación por parte de los niños.

Con respecto a los niveles de GSH en eritrocitos, los resultados obtenidos mostraron una elevación significativa durante la intervención en ambos grupos de niños, lo que podría estar vinculado a la pérdida de peso (Uzun et al., 2007). Sin embargo, el hallazgo de un mayor incremento en los niños tras la dieta hipocalórica sin suplementación es intrigante. Es posible que el mayor nivel de insulina en este grupo podría mejorar la síntesis GSH a lo largo de la activación de γ -glutamylcisteína sintetasa (Wu et al., 2004).

Del mismo modo que en el estudio con niños hipercolesterolémicos, los niveles plasmáticos de α -tocoferol aumentaron al final del estudio. Otros estudios intervencionistas con dieta hipocalórica no encontraron este incremento (Mohn et al., 2005). Sugiriéndose, en este sentido, que el mantenimiento de los niveles de antioxidantes en el presente estudio podría explicar esta discrepancia.

Por otra parte, el aumento en plasma de los niveles de vitamina C tras el consumo de zumo de mandarina observado en este estudio indica, al menos, un buen cumplimiento de los niños y puede explicar parcialmente los efectos antioxidantes. No obstante, la supresión de la generación de especies oxigénicas reactivas puede ser debido, principalmente, a los principales flavonoides de los zumos de cítricos, hesperidina y naringenina, en lugar del ácido ascórbico (Ghanim et al.,

2007). Así como también a la presencia de otros componentes del zumo de mandarina como los carotenoides, en concreto la β -criptoxantina que también podría dar cuenta de los efectos antioxidantes (Sugiura et al., 2006; Unno et al., 2011). Probablemente es la combinación de componentes lo que produce los efectos beneficiosos.

No se conocen otros estudios que hayan investigado los efectos de una dieta suplementada con zumo de mandarina 100% natural en relación con el estado oxidativo en niños obesos. Estudios previos de suplementación llevados a cabo principalmente en adultos con bebidas como el té o el vino muestran una disminución en el estrés oxidativo (Vincent et al., 2007). Por otro lado, se ha planteado la preocupación en lo referente al zumo de frutas 100% como un factor dietético asociado con el sobrepeso en niños (Wang et al., 2008), pudiendo ser una contradicción su recomendación. Sin embargo, en el presente estudio se ha registrado una reducción en la ingesta diaria de energía en el grupo suplementado, mostrando también este grupo una modificación favorable en la distribución de grasa. Por otra parte, el índice HOMA-IR disminuyó en los niños que consumieron zumo de mandarina. Estudios recientes realizados en niños sanos no mostraron ninguna asociación entre el zumo de fruta 100% y el sobrepeso (Nicklas et al., 2008). Además, en el presente estudio se encontró una pérdida de peso significativa. La toma de energía desde el consumo de zumo de fruta en los niños puede compensarse, al menos en parte, por una disminución en la energía desde otras fuentes (Vagstrand et al.,

2009). A este respecto, se ha encontrado una disminución en la toma de snacks entre las comidas por parte de los niños del presente estudio. Además, la piel o la pared de los gajos proporcionada durante el exprimido de las frutas de mandarina posee una actividad lipolítica (Dragull et al., 2008) que también podría ejercer un efecto antiobesidad. Con respecto a las aminotransferasas, en el presente estudio no se observó una mejora de sus valores tras la intervención dietética sin o con suplemento de zumo de mandarina. A diferencia de otro estudio realizado en pacientes obesos donde tras 3 meses de intervención dietética se reducían de manera significativa los niveles de aminotransferasas (de Luis et al., 2008), pudiendo ser explicada esta diferencia por la menor duración del período de intervención. Así como también por el corto período de la suplementación con zumo de mandarina, puesto que en un estudio realizado con bayas, ricas en antioxidantes y vitamina C, en mujeres con sobrepeso durante 20 semanas se reducían de manera significativa los niveles de transaminasas tras la intervención (Lehtonen et al., 2010), aunque no se conocen resultados obtenidos en niños con obesidad.

No obstante, este estudio también presenta sus limitaciones. En primer lugar, la pérdida de peso fue modesta en ambos grupos, por lo que no podemos descartar algunas irregularidades en la recogida de la información de la dieta. Sin embargo, se ha realizado un seguimiento estricto de los niños, y se han realizado continuos esfuerzos para lograr la mejora a la adhesión de la dieta. Además, la adhesión a la suplementación fue buena como se juzga por las mediciones objetivas

(vitamina C plasmática). Otra limitación es la corta duración del período de intervención. Se desconoce si se hubieran observado efectos diferentes durante períodos más largos.

En los últimos años han surgido algunas dietas para tratar la obesidad que pueden incrementar los marcadores de estrés oxidativo y comprometer funciones endoteliales (Buscemi et al., 2009). Hay estudios experimentales con varios fitoquímicos que muestran efectos beneficiosos sobre la obesidad (Baur et al., 2006), pero altas dosis no fisiológicas de suplementos individuales pueden ser potencialmente dañinas, considerándose que los efectos adversos para la salud es improbable que surjan del consumo de alimentos naturales. Así, la identificación de un enfoque dietético seguro para tratar la obesidad se ha convertido en una prioridad médica (Epstein et al., 2008). Mientras que los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan resultados alentadores con respecto a la dieta hipocalórica suplementada con zumo de mandarina en niños obesos y su relación con marcadores del estado de estrés oxidativo, no se pueden traducir estos resultados en una disminución del riesgo de las enfermedades degenerativas crónicas. Además, se requieren estudios a largo plazo. Obviamente, se debe continuar la investigación sobre los alimentos que pueden reducir el estrés oxidativo y que sean fácilmente consumidos por los niños.

VIII. CONCLUSIONES

1. El zumo de mandarina presenta una capacidad antioxidante y antiradicalaria significativa.
2. La ingesta de zumo de mandarina tanto en animales de experimentación como en humanos incrementa la capacidad antioxidante plasmática.
3. La suplementación dietética con zumo de mandarina en los animales de experimentación tratados con tamoxifeno, inductor de estrés oxidativo, reduce significativamente el daño oxidativo en las macromoléculas (lípidos, proteínas y ADN) y aumenta significativamente los niveles de GSH y α -tocoferol, marcadores de defensa antioxidante, a nivel tanto plasmático como hepático.
4. La suplementación dietética con zumo de mandarina en los animales de experimentación reduce significativamente los efectos tóxicos del tamoxifeno en los diferentes complejos de la cadena de transporte electrónico.
5. La suplementación dietética con zumo de mandarina reduce significativamente los biomarcadores plasmáticos de oxidación tanto lipídica como proteica y aumenta el estado antioxidante de niños hipercolesterolémicos.
6. La suplementación dietética con zumo de mandarina, junto con una dieta hipocalórica, reduce significativamente los

biomarcadores de estrés oxidativo y aumenta la defensa antioxidante en niños obesos.

7. El zumo de mandarina es una excelente fuente de antioxidantes, cuyo consumo regular puede ayudar a prevenir enfermedades degenerativas crónicas, asociado con otros factores dietéticos y estilo de vida.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abudu N, Miller JJ, Attaelmannan M, Levinson SS. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta*. 2004; 339(1-2): 11-25.
2. AESAN: Estudio de prevalencia de la obesidad infantil: Estudio ALADINO (Alimentación, Actividad física, Desarrollo Infantil y Obesidad, (disponible en: www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/estudio_aladino.shtml).
3. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007; 74(4): 324-9.
4. Ahotupa M, Hirsimaki P, Parssinen R, Mantyla E. Alterations of drug metabolizing and antioxidant enzyme activities during tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*. 1994; 15(5): 863-8.
5. Albanes D, Malila N, Taylor PR, Huttunen JK, Virtamo J, Edwards BK, et al. Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on colorectal cancer: results from a controlled trial (Finland). *Cancer Causes Control*. 2000; 11(3): 197-205.
6. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 936486.
7. Alvarez-Suarez JM, Dekanski D, Ristić S, Radonjić NV, Petronijević ND, Giampieri F, et al. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PLoS One*. 2011; 6(10): e25878.
8. Ameen M, Ahamad I, Musthapa MS, Rahman Q. Cytotoxic effect and role of exogenous antioxidants in carpet dust mediated toxicity in rat hepatocytes in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(4): 419-25.
9. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the

- degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(17): 7915-22.
10. Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Etienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr*. 2012; 108(9): 1532-49.
 11. Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1991; 572(1-2): 103-16.
 12. Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B, et al. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol*. 1999; 87(6): 2032-6.
 13. Athoupa M, Hirsimaki P, Parssinen R, Mantyla E. Alterations of drug metabolizing and antioxidant enzyme activities during tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*. 1994; 15(5): 863-8.
 14. Azzi A, Boscoboinik D, Mariley D, Ozer NK, Stauble B, Tasinato A. Vitamin E: a sensor and an information traducer of the cell oxidation state. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62(6 Suppl): 1337S-1346S.
 15. Babal P, Kristova V, Cerna A, Janega P, Pechanova O, Danihel L, et al. Red wine polyphenols prevent endothelial damage induced by CCl4 administration. *Physiol Res*. 2006; 55(3): 245-51.
 16. Ballabriga A. Estilo de vida, medioambiente y enfermedades en la infancia. *An Esp Pediatr*. 1990; 33 (Suppl 42): 1-19.
 17. Bao W, Srinivasan SR, Wattigney WA, Berenson GS. Persistence of multiple cardiovascular risk clustering related to Syndrome X from

- childhood to young adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Arch Intern Med.* 1994; 154(16): 1842-7.
18. Barton JP, Parker JE. The radiolysis of oxygenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O₂⁻. *Int J Radiat Phys Chem.* 1970; 2(3): 159-66.
 19. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006; 444(7117): 337-42.
 20. Baur JA. Obesity: do grapes hold the answer? *Pediatr Res.* 2007; 61(6): 633.
 21. Bazzano LA, He J, Orden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(1): 93-9.
 22. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 1): C1424-37.
 23. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1994; 375(2): 81-8.
 24. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 245-313.
 25. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3248S-3254S.

26. Behar D, Czaspski G, Rabami J, Dorfman LM, Schwarz HA. The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical. *J Phys Chem.* 1979; 74: 3209-15.
27. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1): 70-6.
28. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998, 338(23): 1650-6.
29. Berlett BS, Stadtman ER. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J Biol Chem.* 1997; 272(33): 20313-6.
30. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49(2 Suppl 1): 3-8.
31. Block G, Norkus E, Hudes M, Mandel S, Helzlsouer K. Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption? *Am J Epidemiol.* 2001; 154(12): 1113-8.
32. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* 1992; 18(1): 1-29.
33. Böhm F, Edge R, Truscott G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: potential effects for human health. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56(2): 205-16.
34. Böhm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis.* 2007; 190(2): 408-15.

35. Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A. Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernahrungswiss.* 1998; 37(2): 147-63.
36. Bolaños JP, Peuchen S, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 1994; 63(3): 910-6.
37. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem.* 2012; 68(4): 701-11.
38. Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, et al. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 80(1): 61-74.
39. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 343-55.
40. Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial generation of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 1975; 54(3): 311-4.
41. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972; 128(3): 617-30.
42. Bowen PE, Mobarhan S, Smith JC Jr. Carotenoid absorption in humans. *Methods Enzymol.* 1993; 214: 3-17.
43. Brandt K, Christensen LP, Hansen-Moller J, Hansen SL, Haraldsdottir J, Jespersen L, et al. Health promoting compounds in vegetables and fruits: a systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends Food Sci Tech.* 2004; 15(7-8): 384-93.

44. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 1995; 28(1): 25-30.
45. Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem.* 2009; 55(10): 1770-82.
46. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56(11): 317-33.
47. Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991; 351(6329): 714-8.
48. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(6): 1033-77.
49. Breithaupt DE, Weller P, Wolters M, Hahn A. Plasma response to a single dose of dietary β -cryptoxanthin esters from papaya (*Carica papaya* L.) or non-esterified β -cryptoxanthin in adult human subjects: a comparative study. *Br J Nutr.* 2003; 90(4): 795-801.
50. Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol.* 1983; 32(17): 2529-34.
51. Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 1999; 13(10): 1145-55.
52. Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem.* 2006; 387(10-11): 1329-35.
53. Bub A, Watzl B, Abrahamse L, Delincée H, Adam S, Wever J, et al. Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men. *J Nutr.* 2000; 130(9): 2200-6.

54. Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med.* 2011; 208(3): 519-33.
55. Burns J, Fraser PD, Bramley PM. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry.* 2003; 62(6): 939-47.
56. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet.* 1982; 2(8293): 327.
57. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys.* 1983; 221(1): 281-90.
58. Buscemi S, Verga S, Tranchina MR, Cottone S, Cerasola G. Effects of hypocaloric very-low-carbohydrate diet vs. Mediterranean diet on endothelial function in obese women. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39(5): 339-47.
59. Caballero F, Gerez E, Oliveri L, Falcoff N, Batlle A, Vazquez E. On the promoting action of tamoxifen in a model of hepatocarcinogenesis induced by p-dimethylaminoazobenzene in CF1 mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(7): 681-90.
60. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(3-4): 222-30.
61. Cadenas E, Ginsberg M, Rabe U, Sies H. Evaluation of α -tocopherol antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation as detected by low-level chemiluminescence. *Biochem J.* 1984; 223(3): 755-9.
62. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58: 79-110.

63. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J.* 2010; 9: 3.
64. Carpenter KL, Taylor SE, Ballantine JA, Fussell B, Halliwell B, Mitchinson MJ. Lipids and oxidised lipids in human atheroma and normal aorta. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1167 (2): 121-30.
65. Carthew P, Lee PN, Edwards RE, Heydon RT, Nolan BM, Martin EA. Cumulative exposure to tamoxifen: DNA adducts and liver cancer in the rat. *Arch Toxicol.* 2001; 75(6): 375-80.
66. Cassano A, Drioli E, Galaverna G, Marchelli R, Di Silvestro G, Cagnasso P. Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. *J Food Eng.* 2003; 57(2): 153-63.
67. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Millar OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 340(8828): 1111-5.
68. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3): 527-605.
69. Cheal SM, Ng M, Barrios B, Miao Z, Kalani AK, Meares CF. Mapping protein-protein interactions by localized oxidation: consequences of the reach of hydroxyl radical. *Biochemistry.* 2009; 48(21): 4577-86.
70. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49(3): 481-93.
71. Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, Rembold CM, et al. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond).* 2012; 123(2): 73-91.

72. Chen MC, Ye YY, Ji G, Liu JW. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(6): 3330-5.
73. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxiguanine an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-T substitutions. *J Biol Chem*. 1992; 267(1): 166-172.
74. Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*. 2003; 22(47): 7316-39.
75. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(13): 7631-6.
76. Clinton SK. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev*. 1998; 56(2 Pt 1): 35-51.
77. Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, Del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V. Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes*. 2010; 5(1): 56-63.
78. Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res*. 2011; 158(6): 369-84.
79. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000; 320(7244): 1240-3.
80. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*. 2001; 20(6): 591-8.

81. Crewe HK, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53(2): 171-8.
82. Dalmau Serra J, Alonso Franch M, Gómez López L, Martínez Costa C, Sierra Salinas C. Obesidad Infantil. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Parte II. Diagnóstico. Comorbilidades. Tratamiento. *An Pediatr (Barc).* 2007; 66(3): 294-304.
83. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 1995; 61: 1-31.
84. de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem.* 2008; 54(6): 945-55.
85. de Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol.* 1998; 12(3): 249-55.
86. de la Asunción JG, Del Olmo ML, Gomez-Cambronero LG, Pallardo FV, Viña JV. AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: protective effect of vitamins C and E. *Life Sci.* 2004; 76: 47-56.
87. de Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Gonzalez JM. Effect of a hypocaloric diet in transaminases in nonalcoholic fatty liver disease and obese patients, relation with insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 79(1): 74-8.
88. de Pee S, West CE. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr.* 1996; 50(3): S38-S53.
89. de Rufino-Rivas P, Redondo Figuero C, Viadero Ubierna MT, Amigo Lanza T, González-Lamuño D, García Fuentes M. Aversiones y

- preferencias alimentarias de los adolescentes de 14 a 18 años de edad, escolarizados en la ciudad de Santander. *Nutr Hosp.* 2007; 22(6): 695-701.
90. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991; 14(3): 173-94.
91. Demol S, Yackobovitch-Gavan M, Shalitin S, Nagelberg N, Gillon-Keren M, Phillip M. Low-carbohydrate (low & high-fat) versus high-carbohydrate low-fat diets in the treatment of obesity in adolescents. *Acta Paediatr.* 2009; 98(2): 346-51.
92. Desai P, Nallani S, Sane R, Moore L, Goodwin B, Buckley D, et al. Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30(5): 608-12.
93. Dhuique-Mayer C, Caris-Veyrat C, Ollitrault P, Curk F, Amiot MJ. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(6): 2140-5.
94. Dietz WH. The obesity epidemic in young children. Reduce television viewing and promote playing. *BMJ.* 2001; 322(7282): 313-4.
95. Drabkin D, Austin H. Spectrophotometric studies: preparations from washed blood cells. *J Biol Chem.* 1935; 112: 51-5.
96. Dragull K, Breska AP 3rd, Cain B. Synephrine content of juice from Satsuma mandarins (*Citrus unshiu* Marcovitch). *J Agric Food Chem.* 2008; 56(19): 8874-8.
97. Drehmer E, Valls V, Muñoz P, Cabo J, Sáez GT. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and antioxidant status in rat liver fed with

- olive and corn oil diets: Effect of ascorbic acid supplementation. *J Food Lipids*. 2001; 8(4): 281-94.
98. Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 748: 145-69.
99. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826(2): 443-57.
100. Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen / nitrogen species. *Glycobiology*. 2011; 21(4): 401-9.
101. Duthie GG. Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proc Nutr Soc*. 1999; 58(4): 1015-24.
102. Echelin P. Phytochemical phylogenic. Ed. by JB Holborne. New York: Academic Press; 1970.
103. Elberg J, McDuffie JR, Sebring NG, Salaita C, Keil M, Robotham D, et al. Comparison of methods to assess change in children's body composition. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(1): 64-9.
104. El-Beshbishy HA. The effect of dimethyl dimethoxy biphenyl dicarboxylate (DDB) against tamoxifen-induced liver injury in rats: DDB use is curative or protective. *J Biochem Mol Biol*. 2005a; 38(3): 300-6.
105. El-Beshbishy HA. Hepatoprotective effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract against tamoxifen-induced liver injury in rats. *J Biochem Mol Biol*. 2005b; 38(5): 563-70.
106. El-Gorab MI, Underwood BA, Loerch, JD. The roles of bile salts in the uptake of beta-carotene and retinol by rat everted gut sacs. *Biochim Biophys Acta*. 1975; 401(2): 265-77.

107. Ellingsen I, Hjerkin EM, Seljeflot I, Arnesen H, Tonstad S. Consumption of fruit and berries is inversely associated with carotid atherosclerosis in elderly men. *Br J Nutr*. 2008; 99(3): 674-81.
108. Ellingsen I, Seljeflot I, Arnesen H, Tonstad S. Vitamin C consumption is associated with less progression in carotid intima media thickness in elderly men: A 3-year intervention study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009; 19(1):8-14.
109. El-Sohemy A, Baylin A, Kabagambe E, Ascherio A, Spiegelman D, Campos H. Individual carotenoid concentrations in adipose tissue and plasma as biomarkers of dietary intake. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(1): 172-9.
110. Epplein M, Shu XO, Xiang YB, Chow WH, Yang G, Li HL, et al. Fruit and vegetable consumption and risk of distal gastric cancer in the Shanghai Women's and Men's Health studies. *Am J Epidemiol*. 2010; 172(4): 397-406.
111. Epstein LH, Paluch RA, Beecher MD, Roemmich JN. Increasing healthy eating vs. reducing high energy-dense foods to treat pediatric obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16(2): 318-26.
112. Erdman JW Jr, Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 691, 76-85.
113. Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr*. 2001; 131(2): 235-41.
114. Fan PW, Bolton JL. Bioactivation of tamoxifen to metabolite E quinone methide: reaction with glutathione and DNA. *Drug Metab Dispos*. 2001; 29(6): 891-6.

115. Fanciullino AL, Dhuique-Mayer C, Luro F, Casanova J, Morillon R, Ollitrault P. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(12): 4397-406.
116. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18(10): 872-9.
117. Feig DI, Reid TM, Loeb LA. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* 1994; 54(Suppl.7): 1890-1894.
118. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Trans.* 1894; 65: 899-910.
119. Fernández Segura, ME. Experiencias de tratamiento integral de la obesidad infantil en pediatría de Atención Primaria. *Rev Pediatr Aten Primaria.* 2005; 7 (Suppl 1): 35-47.
120. Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions.* 1991; 32(3-4): 283-8.
121. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006; 36(4): 327-58.
122. Fisher B, Costantino JP, Wickerman DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst.* 1998, 90(18): 1371-88.
123. Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1990; 11(9): 1447-50.
124. Floyd RA, West MS, Eneff KL, Hogsett WE, Tingey DT. Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanosine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys.* 1988; 262(1): 266-72.

125. Floyd RA, Watson JJ, Wog PK, Altmiller DH, Rockard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine. Sensitive and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun*. 1986; 1(3): 163-172.
126. Forastiere F, Pistelli R, Sestini P, Fortes C, Renzoni E, Rusconi F, et al. Consumption of fresh fruit rich in vitamin C and wheezing symptoms in children. SIDRIA Collaborative Group, Italy (Italian Studies on Respiratory Disorders in Children and the Environment). *Thorax*. 2000; 55(4): 283-8.
127. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012; 33(7): 829-37.
128. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med*. 2010; 31(6): 435-45.
129. Franke AA, Cooney RV, Henning SM, Custer LJ. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(13): 5170-8.
130. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol*. 1990; 264: 155-63.
131. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994; 97(3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.
132. Frémont L, Gozzélino MT, Franchi MP, Linard A. Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *J Nutr*. 1998; 128(9): 1495-502.
133. Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. Pryor WA, editor. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press; 1986.

134. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997; 272(30): 18515-7.
135. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978; 201(4359): 875-80.
136. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1974; 41(0): 35-97.
137. Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J.* 1998; 333(Pt 3): 519-25.
138. Gaikwad NW, Bodell WJ. Peroxidase-mediated dealkylation of tamoxifen, detected by electrospray ionization-mass spectrometry, and activation to form DNA adducts. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(2): 340-7.
139. Gamboa da Costa G, McDaniel-Hamilton LP, Heflich RH, Marques MM, Beland FA. DNA adduct formation and mutant induction in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen and its derivatives. *Carcinogenesis.* 2001; 22(8): 1307-15.
140. Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 320(1-2): 25-33.
141. Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* 2000; 68: 471-4.
142. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res.* 2001; 15(8): 655-69.

143. Genova ML, Pich MM, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C, et al. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003; 228(5): 506-13.
144. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr*. 1991; 53(1 Suppl): 326S-334S.
145. Ghanim H, Mohanty P, Pathak R, Chaudhuri A, Sia CL, Dandona P. Orange juice or fructose intake does not induce oxidative and inflammatory response. *Diabetes Care*. 2007; 30(6): 1406-11.
146. Gidding SS, Dennison BA, Birch LL, Daniels SR, Gillman MW, Lichtenstein AH, et al. Dietary recommendations for children and adolescents: a guide for practitioners. *Pediatrics*. 2006; 117(2): 544-59.
147. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willet WC. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87(23): 1767-76.
148. González ML, Muñoz P, Valls V. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud; 2001.
149. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Krzeminski R, Gralak M, Delgado-Licon E, et al. Changes in plasma lipid and antioxidant activity in rats as a result of naringin and red grapefruit supplementation. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(8): 3223-8.
150. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Gil-Martínez E, Rojas-Hidalgo E. Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: a user's point of view. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997; 37(7): 621-33.

151. Greaves P, Goonetilleke R, Nunn G, Topham J, Orton T. Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Res.* 1993; 53(17): 3919-24.
152. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(9-10): 922-35.
153. Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, et al. Biomarkers. *Mol Aspects Med.* 2002; 23(1-3): 101-208.
154. Griffiths HR, Unsworth J, Blake DR, Lunec J. Free radicals in chemistry, pathology and medicine. London: Richeliue, 1988.
155. Grisham MB, Jourd'Heuil D, Wink DA. Nitric Oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol.* 1999; 276(2 Pt 1): G315-21.
156. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986; 320(6061): 454-6.
157. Gutteridge JM, Quinlan GJ. Free radical damage to deoxyribose by anthracycline, aureolic acid and aminoquinone antitumour antibiotics. An essential requirement for iron, semiquinones and hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol.* 1985; 34(23): 4099-103.
158. Gupta RC. Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81(22): 6943-7.
159. Haber F, Weiss J. The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London.* 1934; 147: 332-51.
160. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012; 70(5): 257-65.

161. Halliwell B. Free radical and antioxidants-quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32(3): 125-30.
162. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996; 16: 33-50.
163. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994; 344(8924): 721-4.
164. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 1989; 70(6): 737-57.
165. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.
166. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 1987; 165(1): 215-9.
167. Han XL, Liehr JG. Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen. *Cancer Res.* 1992; 52(5): 1360-3.
168. Harborne JB. The flavonoids: Advances in research since 1986. London: Chapman and Hall; 1994.
169. Hard GC, Iatropoulos MJ, Jordan K, Radi L, Kaltenberg OP, Imondi AR, et al. Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl:CD(BR) rats. *Cancer Res.* 1993; 53(19): 4534-41.
170. Harman D. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 928: 1-21.
171. Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(8): 2928-35.

172. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30(6): 445-600.
173. Hegde AH, Sandhya B, Seetharamappa J. Evaluation of binding and thermodynamic characteristics of interactions between a citrus flavonoid hesperitin with protein and effects of metal ions on binding. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(8): 4921-9.
174. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002; 13(10): 572-584.
175. Heinecke JW. Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander? *J Exp Med.* 2006; 203(4): 813-6.
176. Heinecke JW. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(11): 1090-101.
177. Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. *FASEB J.* 1999; 13(10): 1113-20.
178. Hellmann-Blumberg U, Taras TL, Wurz GT, DeGreorio MW. Genotoxic effects of the novel antiestrogenic FC-1271a in comparison to tamoxifen and toremifene. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 60(1): 63-70.
179. Hemminki K, Widlak P, Hou SM. DNA adducts caused by tamoxifen and toremifene in human microsomal system and lymphocytes in vitro. *Carcinogenesis.* 1995; 16(7): 1661-4.

180. Herrera E, Jiménez R, Aruoma OI, Hercberg S, Sánchez-García I, Fraga C. Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutr Rev.* 2009; 67(Suppl 1): S140-4.
181. Hertog MG, Feskens EJM, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer.* 1994; 22(2): 175-84.
182. Hertog MG, Feskens EJ, Hollmann PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993; 342(8878): 1007-11.
183. Hollander D, Ruble PE Jr. beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. *Am J Physiol.* 1978; 235(6): E686-91.
184. Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 2004; 340(1-2): 107-15.
185. Hopkins FG. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem J.* 1921; 15(2): 286-305.
186. Husain K, Mejía J, Lalla J, Kazim S. Dose response of alcohol-induced in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharmacol Res.* 2005; 51(4): 337-43.
187. Isa F, Xie LP, Hu Z, Zhong Z, Hemelt M, Reulen RC, et al. Dietary consumption and diet diversity and risk of developing bladder cancer: results from the South and East China case-control study. *Cancer Causes Control.* 2013; 24(5): 885-95.
188. Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in

- murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res.* 2004; 94(5): 609-16.
189. Jackson MJ, Papa S, Bolaños J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, et al. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med.* 2002; 23(1-3): 209-85.
190. Jacques PF, Chylack LT Jr, Hankinson SE, Khu PM, Rogers G, Friend J, et al. Long-term nutrient intake and early age-related nuclear lens opacities. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119(7): 1009-19.
191. Jacques PF, Hartz SC, Chylack JT, McGandy RB, Sadowski JA. Nutritional status in persons with and without senile cataract: blood vitamin and mineral levels. *Am J Clin Nutr.* 1988; 48(1): 152-8.
192. Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci.* 2012; 37(3): 503-17.
193. Jensen PK. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. *Biochim Biophys Acta.* 1966; 122(2): 157-74.
194. John JH, Ziebland S, Yudkin P, Roe LS, Neil HA, et al. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002; 359(9322): 1969-74.
195. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(3): 205-13.
196. Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol.* 1977; 75(2): 305-16.

197. Kagan V, Serbinova E, Packer L. Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 169(3): 851-7.
198. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2006; 187(1): 1-17.
199. Kamaraj S, Anandakumar P, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T. Hesperidin attenuates mitochondrial dysfunction during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in mice. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011; 25(1): 91-8.
200. Kamiya H, Kasai H. Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation. *J Biol Chem.* 1995; 270(33): 19446-50.
201. Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61(4): 472-7.
202. Karki A, Mantyla E, Hirsimaki Y, Karlsson S, Toikkanen S, Hirsimaki P. Comparison of the effects of tamoxifen and toremifene on rat hepatocarcinogenesis. *Arch Toxicol.* 2000; 74(4-5): 249-56.
203. Kasahara T, Hashiba M, Harada T, Degawa M. Change in the gene expression of hepática tamoxifen-metabolizing enzymes during the process of tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis in female rats. *Carcinogenesis.* 2002; 23(3): 491-8.
204. Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Fukada S. DNA modifications by the mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis.* 1998; 19(8): 1459-65.

205. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12(4): 2137-45.
206. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* 1994; 350(1): 9-12.
207. Keles H, Ince S, Küçükkurt I, Tatlı II, Akkol EK, Kahraman C, et al. The effects of Feijoa sellowiana fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. *Pharm Biol.* 2012; 50(3): 318-25.
208. Kelishadi R, Hashemi M, Mohammadifard N, Asgary S, Khavarian N. Association of changes in oxidative and proinflammatory states with changes in vascular function after a lifestyle modification trial among obese children. *Clin Chem.* 2008; 54(1): 147-53.
209. Khachick F, Spangler CJ, Smith JC Jr, Canfield LM, Steck A, Pfander H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem.* 1997; 69(10): 1873-81.
210. Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR, Smith JC Jr. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal Chem.* 1992; 64(18): 2111-22.
211. Kim C, Kim JY, Kim JH. Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep.* 2008; 41(8): 555-9.
212. Kim PM, Wells PG. Genoprotection by UDP-glucuronosyltransferases in peroxidase-dependent, reactive oxygen species-mediated micronucleus initiation by the carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene. *Cancer Res.* 1996; 56(7): 1526-32.

213. Kim YJ, Kim EH, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 27(6): 1004-10.
214. Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest*. 1995; 73(1): 3-19.
215. Kiyotani K, Mushiroda T, Nakamura Y, Zembutsu H. Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012; 27(1): 122-31.
216. Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Whelton PK, Liang KY, et al. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1993; 328(5): 313-8.
217. Klaunig JE, Xu Y, Bachowski S, Jiang J. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. Wallace KB, editor. *Free Radical Toxicology*. London: Taylor & Francis; 1997.
218. Kones R. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey. *Drug Des Devel Ther*. 2011; 5: 325-80.
219. Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschütter A, Beisiegel U. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 1996; 37(7): 1436-48.
220. Korycka-Dahl M, Richardson T. Initiation of oxidative changes in food. *J Dairy Sci*. 1980; 63(7): 1181-98.
221. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(3-4): 463-71.

222. Kritchevsky SB, Tell GS, Shimakawa T, Dennis B, Li R, Kohlmeier L, et al. Provitamin A carotenoid intake and carotid artery plaques: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68(3): 726-33.
223. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, Berdowska I, Zielinski B, Noczynska A. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem.* 2008; 41(12): 943-9.
224. Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piche LA, et al. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(5): 1095-100.
225. Lacroix S, Rosiers CD, Tardif JC, Nigam A. The role of oxidative stress in postprandial endothelial dysfunction. *Nutr Res Rev.* 2012; 25(2): 288-301.
226. Lairon D. Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(10): 1209-14.
227. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA.* 2002; 288(21): 2709-16.
228. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(14): 6348-52.
229. Lamers D, Schlich R, Greulich S, Sasson S, Sell H, Eckel J. Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signaling in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(5): 1177-88.

230. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(3 Suppl): 475S-490S.
231. Lass A, Sohal RS. Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(1-2): 220-6.
232. Lauer RM, Lee J, Clarke WR. Predicting adult cholesterol levels from measurements in childhood and adolescence: the Muscatine Study. *Bull N Y Acad Med.* 1989; 65(10): 1127-42.
233. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42(9): 1673-81.
234. Law MR, Morris JK. By how much does fruit and vegetable consumption reduce the risk of ischaemic heart disease? *Eur J Clin Nutr.* 1998; 52(8): 549-56.
235. Le Moullec N, Deheeger M, Preziosi P, Monteiro P, Valeix P, Rolland-Cachera MF, et al. Validation du manuel-photos utilise pour l'enquete alimentaire de l'etude SU.VI.MAX. *Cah Nutr Diet.* 1996; 31(3): 158-64.
236. Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 2001; 61(10): 3894-901.
237. Lee HC, Wei YH. Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 942: 311-27.
238. Lee S, Ra J, Song JY, Gwak C, Kwon HJ, Yim SV, et al. Extracts from Citrus unshiu promote immune-mediated inhibition of tumor growth in

- a murine renal cell carcinoma model. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(3): 973-9.
239. Lehtonen HM, Suomela JP, Tahvonen R, Vaarno J, Venojärvi M, Viikari J, et al. Berry meals and risk factors associated with metabolic syndrome. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64(6): 614-21.
240. Lenaz G, Fato R, Formiggini G, Genova ML. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion.* 2007; 7 Suppl: S8-33.
241. Leo MA, Ahmed S, Aleynik SI, Siegel JH, Kasmin F, Lieber CS. Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions. *J Hepatol.* 1995; 23(5): 550-6.
242. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-479.
243. Lichtenthaler R, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(1): 103-10.
244. Lim CK, Yuan Z-X, Lamb JH, White IN, De Matteis F, Smith LL. A comparative study of tamoxifen metabolism in female rat, mouse and human liver microsomes. *Carcinogenesis.* 1994; 15(4): 589-93.
245. Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation.* 1997; 21(3): 347-56.
246. Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Mol Aspects Med.* 2002; 23(1-3): 1-38.

247. Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* 1994; 16(1): 29-33.
248. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* 1997; 60(10): 763-71.
249. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
250. Lymar SV, Hurst JK. Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants. *Chem Res Toxicol.* 1995; 8(6): 833-40.
251. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(1): 29-38.
252. Magnussen CG, Raitakari OT, Thomson R, Juonala M, Patel DA, Viikari JS, et al. Utility of currently recommended pediatric dyslipidemia classifications in predicting dyslipidemia in adulthood: evidence from the Childhood Determinants of Adult Health (CDAH) study, Cardiovascular Risk in Young Finns Study, and Bogalusa Heart Study. *Circulation.* 2008; 117(1): 32-42.
253. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, et al. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(47): 18525-30.
254. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9(12): 2277-93.
255. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1 Suppl): 230S-242S.

256. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727-47.
257. Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57(2): 235-42.
258. Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977; 77(4): 1525-35.
259. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17(1): 24-38.
260. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978; 87(1): 206-10.
261. Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(8): 1583-90.
262. Martin EA, Brown K, Gaskell M, Al-Azzawi F, Garner RC, Boocock DJ, et al. Tamoxifen DNA damage detected in human endometrium using accelerator mass spectrometry. *Cancer Res.* 2003; 63(23): 8461-5.
263. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005; 16(10): 577-86.
264. Maserejian NN, Giovannucci E, Rosner B, Zavras A, Joshipura K. Prospective study of fruits and vegetables and risk of oral premalignant lesions in men. *Am J Epidemiol.* 2006; 164(6): 556-66.

265. Mataix J. Tabla de composición de alimentos. 4ª ed. Granada: Editorial Universidad de Granada; 2003.
266. Mataix J. Nutrición y alimentación humana. Situaciones fisiológicas y patológicas. Vol II. 1ª edición. Madrid: Ergón; 2002.
267. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 827(1): 76-82.
268. Mathews CK, van Holde KE. Bioquímica. 2ª ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 1998.
269. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(7-8): 1034-53.
270. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 108(8): 652-9.
271. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22): 6049-55.
272. McGill HC, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(5 Suppl): 1307S-1315S.
273. Michaud DS, Giovannucci EL, Ascherio A, Rimm EB, Forman MR, Sampson L, et al. Associations of plasma carotenoid concentrations and dietary intake of specific carotenoids in samples of two prospective cohort studies using a new carotenoid database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7(4): 283-90.

274. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4): 673-751.
275. Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem.* 1996; 271(1): 40-7.
276. Miller ER 3rd, Erlinger TP, Sacks FM, Svetkey LP, Charleston J, Lin PH, et al. A dietary pattern that lowers oxidative stress increases antibodies to oxidized LDL: results from a randomized controlled feeding study. *Atherosclerosis.* 2005; 183(1): 175-82.
277. Miller ER 3rd, Appel LJ, Risby TH. Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trial. *Circulation.* 1998; 98(22): 2390-5.
278. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radic Res.* 1997; 26(3): 195-9.
279. Mira L, Fernández MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* 2002; 36(11): 1199-208.
280. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, et al. Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 1998; 437(1-2): 24-8.
281. Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Obad A, et al. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis.* 2008; 197(1): 250-6.

282. Moe KT, Aulia S, Jiang F, Chua YL, Koh TH, Wong MC, et al. Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells. *J Cell Mol Med.* 2006; 10(1): 231-9.
283. Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75(4): 767-72.
284. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(8): 2970-3.
285. Mohn A, Catino M, Capanna R, Giannini C, Marcovecchio M, Chiarelli F. Increased oxidative stress in prepubertal severely obese children: effect of a dietary restriction-weight loss program. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(5): 2653-8.
286. Morante M, Sandoval J, Gómez-Cabrera MC, Rodríguez JL, Pallardó FV, Viña JR, et al. Vitamin E deficiency induces liver nuclear factor-kappaB DNA-binding activity and changes in related genes. *Free Radic Res.* 2005; 39(10): 1127-38.
287. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001; 72(2): 145-171.
288. Mukai K, Mitani S, Ohara K, Nagaoka S. Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(9): 1243-56.
289. Mulvihill EE, Assini JM, Lee JK, Allister EM, Sutherland BG, Koppes JB, et al. Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2011; 60(5): 1446-57.

290. Muñiz P, Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR, Saez GT. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(4): 747-55.
291. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009; 417(1): 1-13.
292. Nagura J, Iso H, Watanabe Y, Maruyama K, Date C, Toyoshima H, et al. Fruit, vegetable and bean intake and mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women: the JACC Study. *Br J Nutr.* 2009; 102(2): 285-92.
293. Nathan C, Xien QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994; 269(19): 13725-8.
294. Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286(3): R505-11.
295. Navarro P, Pérez-López AJ, Mercader MT, Carbonell-Barrachina AA, Gabaldon JA. Antioxidant activity, color, carotenoids composition, minerals, vitamin C and sensory quality of organic and conventional mandarin juice, cv. Orogrande. *Food Sci Technol Int.* 2011; 17(3): 241-8.
296. Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J, et al. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1282-90.
297. Nguyen AT, Donaldson RP. Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 439(1): 25-31.

298. Nicklas TA, O'Neil CE, Kleinman R. Association between 100% juice consumption and nutrient intake and weight of children aged 2 to 11 years. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2008; 162(6): 557-65.
299. Nicotra A, Pierucci F, Parvez H, Senatori O. Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology.* 2004; 25(1-2): 155-65.
300. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Goto N. Interaction among vitamin C, vitamin E and β -carotene. *J Am Clin Nutr.* 1995; 62(6 Suppl): 1322S-1326S.
301. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science.* 2003; 299(5608): 896-9.
302. Numazawa S, Ishikawa M, Yoshida A, Tanaka S, Yoshida T. Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285(2): C334-42.
303. O'Connor TM, Yang SJ, Nicklas TA. Beverage intake among preschool children and its effect on weight status. *Pediatrics.* 2006; 118(4): e1010-8.
304. O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL 3rd. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *Nutr J.* 2012; 11: 107.
305. Obama T, Kato R, Masuda Y, Takahashi K, Aiuchi T, Itabe H. Analysis of modified apolipoprotein B-100 structures formed in oxidized low-density lipoprotein using LC-MS/MS. *Proteomics.* 2007; 7(13): 2132-41.

306. Olson JA, Krinsky NI. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J.* 1995; 9(15): 1547-50.
307. Organización Mundial de la Salud. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. Ginebra: OMS; 2003. Serie de Informes Técnicos: n° 916.
308. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007; 12(5): 913-22.
309. Ozgova S, Hermanek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(7): 1127-37.
310. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 315-424.
311. Packer L. Membrane stabilization by antioxidant recycling. In: Gómez-Fernández/Chapman/Packer, editors. *Progress in membrane biotechnology.* Basel; Boston, Berlin: Birkhäuser; 1991.
312. Pagano G, de Biase A, Deeva IB, Degan P, Doronin YK, Iaccarino M, et al. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sci.* 2001; 68(15): 1735-49.
313. Palomero J, Galán AI, Muñoz ME, Tuñón MJ, González-Gallego J, Jimenez R. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporine A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(8): 836-45.
314. Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1777(10): 1249-62.

315. Pan MH, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52(1): 43-52.
316. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas Y, Stefanidis C. The association between food patterns and the metabolic syndrome using principal components analysis: The ATTICA Study. *J Am Diet Assoc.* 2007; 107(6): 979-87.
317. Park SG, Kim JH, Xia Y, Sung JH. Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin Ther Targets.* 2011; 15(11): 1297-306.
318. Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 1996; 10(5): 542-51.
319. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* 2000; 304(1): 55-68.
320. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, Sia CL, Viswanathan P, Mohanty P, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(11): 4476-9.
321. Phillips DH. Understanding the genotoxicity of tamoxifen? *Carcinogenesis.* 2001; 22(6): 839-49.
322. Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem Mol Biol Int.* 1998; 46(5): 895-903.
323. Pi-Sunyer FX. Obesity: criteria and classification. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59(4): 505-9.

324. Poirier MC, Schild LJ. The genotoxicity of gamoxifen: extent and consequences, Kona, Hawaii, January 23, 2003. *Mutagenesis*. 2003; 18(4): 395-9.
325. Poiroux-Gonord F, Bidel LP, Fanciullino AL, Gautier H, Lauri-Lopez F, Urban L. Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches. *J Agric Food Chem*. 2010; 58 (23): 12065-82.
326. Polesel J, Negri E, Serraino D, Parpinel M, Barzan L, Libra M, et al. Dietary intakes of carotenoids and other nutrients in the risk of nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Italy. *Br J Cancer*. 2012; 107(9): 1580-3.
327. Poon GK, Chui YC, McCague R, Llinning PE, Feng R, Rowlands MG, et al. Analysis of phase I and phase II metabolites of tamoxifen in breast cancer patients. *Drug Metab Dispos*. 1993; 21(6): 1119-24.
328. Porkka KV, Viikari JSA, Taimela S, Dahl M, Akerblom HK. Tracking and predictiveness of serum lipid and lipoprotein measurements in childhood: a 12-year follow-up. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Am J Epidemiol*. 1994; 140(12): 1096-110.
329. Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A. NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19(5): 553-63.
330. Pradeep K, Ko KC, Choi MH, Kang JA, Chung YJ, Park SH. Protective Effect of Hesperidin, a Citrus Flavanoglycone, Against γ -Radiation-Induced Tissue Damage in Sprague-Dawley Rats. *J Med Food*. 2012; 15(5): 419-27.
331. Pryor WA. Free radicals in Biology. In Pryor WA, editor. New York: Academic press; 1976.

332. Quiles JL, Ochoa JJ, Battino M, Gutierrez-Rios P, Nepomuceno EA, Frías ML, et al. Life-long supplementation with a low dosage of coenzyme Q10 in the rat: effects on antioxidant status and DNA damage. *Biofactors*. 2005; 25(1-4): 73-86.
333. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*. 2002; 180(1): 79-95.
334. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991; 288(2): 481-7.
335. Ramirez-Tortosa C, Andersen OM, Gardner PT, Morrice PC, Wood SG, Duthie SJ, et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Rad Biol Med*. 2001; 31(9): 1033-7.
336. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(9-10): 1231-7.
337. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37(12): 1595-607.
338. Reed DJ, Fariss MW, Pascoe GA. Mechanism of chemical toxicity and cellular protective systems. *Fundam Appl Toxicol*. 1986; 6(4): 591-7.
339. Reed GA. Co-oxidation of xenobiotics: lipid peroxy derivatives as mediators of metabolism. *Chem Phys Lipids*. 1987; 44(2-4): 127-48.
340. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(11): 1603-16.

341. Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E: role of a Janus molecule. *FASEB J.* 2001; 15(13): 2314-25.
342. Riccioni G, D'Orazio N, Palumbo N, Bucciarelli V, Ilio E, Bazzano LA, et al. Relationship between plasma antioxidant concentrations and carotid intima-media thickness: the Asymptomatic Carotid Atherosclerotic Disease In Manfredonia Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009; 16(3): 351-7.
343. Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res.* 1993; 32(1): 71-110.
344. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(7): 933-56.
345. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85(17): 6465-7.
346. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994; 65(1): 27-33.
347. Rivero D, Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML, Valls-Bellés V, Codoñer P, Muñiz P. Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(9): 3637-42.
348. Rubbo H. Nitric oxide and peroxynitrite in lipid peroxidation. *Medicina (B Aires).* 1998; 58(4): 361-6.
349. Rumsey SC, Levine M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans - Chemistry, Metabolism, and Uses. *J Nutr Biochem.* 1998; 9(3): 116-130.

350. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, et al. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol.* 2000; 16(2): 91-8.
351. Rytter SW, Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen ((1)O₂): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(9): 1520-34.
352. Sahin E, Gumuslu S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res.* 2004; 155(2): 241-8.
353. Salas Salvadó J, García Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fioi M et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62(5): 651-9.
354. Sánchez-Moreno C, Plaza L, de Ancos B, Cano MP. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice. *J Sci Food Agr.* 2003a; 83: 430-9.
355. Sánchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granado F, et al. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr.* 2003b; 78(3): 454-60.
356. Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 185(3): 218-27.
357. Sarma U, Brunner E, Evans J, Wormald R. Nutrition and the epidemiology of cataract and age-related maculopathy. *Eur J Clin Nutr.* 1994; 48(1): 1-8.

358. Sartori AA, Jiricny J. Enzymology of base excision repair in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem*. 2003; 278(27): 24563-76.
359. Sawyer DT. The Redox Thermodynamics for Dioxygen Species (O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HOO^{\cdot} , $HOOH$ and $HOO^{\cdot-}$) and Monooxygen Species (O , $O^{\cdot-}$, $\cdot OH$, and $\cdot OH$) in Water and Aprotic Solvents. In: Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C, editors. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Basic Life Sciences, volume 49. New York: Plenum Press; 1988. p. 11-20.
360. Saypil WH, Shimasaki H, Ueta N. Free radical- induced liver injury. I. Effects of dietary vitamin E deficiency on triacylglycerol level and its fatty acid profile in rat liver. *Free Radic Res Commun*. 1991; 14(5-6): 315-22.
361. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 2000; 130(8S Suppl): 2073S-85S.
362. Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. *Trends Food Sci. Tech*. 2001; 12(11): 401-13.
363. Schroder KE. Effects of fruit consumption on body mass index and weight loss in a sample of overweight and obese dieters enrolled in a weight-loss intervention trial. *Nutrition*. 2010; 26(7-8): 727-34.
364. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*. 2010; 704(1-3): 152-9.
365. Sendra JM, Sentandreu E, Navarro JL. Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur Food Res Technol*. 2006; 223(5): 615-624.

366. Sener G, Ozer Sehirli A, Ipçi Y, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, et al. Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005; 19(2): 155-64.
367. Sentandreu E, Izquierdo L, Sendra JM. Differentiation of juices from clementine (*Citrus clementina*), clementine-hybrids and satsuma (*Citrus unshiu*) cultivars by statistical multivariate discriminant analysis of their flavanone-7-O-glycosides and fully methoxylated flavones content as determined by liquid chromatography. *Eur Food Res Technol*. 2007; 224: 421-9.
368. Serra-Majem L, García-Closas R, Ribas L, Pérez-Rodrigo C, Aranceta J. Food patterns of Spanish schoolchildren and adolescents: the enKid Study. *Public Health Nutr*. 2001; 4(6A): 1433-8.
369. Servais S, Boussousar A, Molnar A, Douki T, Pequignot JM, Favier R. Age-related sensitivity to lung oxidative stress during ozone exposure. *Free Radic Res*. 2005; 39(3): 305-16.
370. Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L, Hochstein P. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8(2): 145-52.
371. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*. 2001; 360(Pt 1): 1-16.
372. Shen B, Jensen RC, Bohnert HJ. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol*. 1997; 115(2): 527-532.
373. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 1991; 349(6308): 431-4.

374. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(23): 10771-8.
375. Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10(3-4): 211-6.
376. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(9-10): 916-21.
377. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *J Am Clin Nutr*. 1995; 62(6 Suppl): 1315S-1321S.
378. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. Sies H, editor. *Oxidative Stress*. Orlando: Academic Press; 1985.
379. Simon JA, Hudes ES, Tice JA. Relation of serum ascorbic acid to mortality among US adults. *J Am Coll Nutr*. 2001; 20(3): 255-63.
380. Simopoulos AP. The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J Nutr*. 2001; 131(11 Suppl): 3065S-73S.
381. Slattery ML, Benson J, Curtin K, Ma KN, Schaeffer D, Potter JD. Carotenoids and colon cancer. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(2): 575-82.
382. Spiteller G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49(11): 999-1013.
383. Spiteller G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med Hypotheses*. 2003; 60(1): 69-83.

384. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003; 25(3-4): 207-18.
385. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science*. 1992; 257(5074): 1220-4.
386. Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, et al. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med*. 2002; 23(1-3): 39-100.
387. Stahl W, Schwarz W, Sies H. Human serum concentrations of all-trans beta- and alpha-carotene but not 9-cis beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). *J Nutr*. 1993; 123(5): 847-51.
388. Stanley LA, Carthew P, Davies R, Higginson F, Martin E, Styles JA. Delayed effects of tamoxifen in hepatocarcinogenesis-resistant Fischer 344 rats as compared with susceptible strains. *Cancer Lett*. 2001; 171(1): 27-35.
389. Steffen LM, Kroenke CH, Yu X, Pereira MA, Slattery ML, Van Horn L, et al. Associations of plant foods, dairy product, and meat intakes with 15 years incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82(6): 1169-77.
390. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320(14):915-24.
391. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*. 1996; 96(10): 1027-39.
392. Striegel-Moore RH, Thompson D, Affenito SG, Franko DL, Obarzanek E, Barton BA, et al. Correlates of beverage intake in adolescent girls:

- the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *J Pediatr.* 2006; 148(2): 183-7.
393. Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. Bioquímica. 6ª edición. Barcelona: Editorial Reverté; 2008.
394. Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1): 46-58.
395. Sudheesh S, Sandhya C, Sarah Koshy A, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res.* 1999; 13(5): 393-6.
396. Sugiura M, Ohshima M, Ogawa K, Yano M. Chronic administration of Satsuma mandarin fruit (*Citrus unshiu* Marc.) improves oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29(3): 588-91.
397. Svilaas A, Sakhi AK, Andersen LF, Svilaas T, Strom EC, Jacobs DR Jr, et al. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J Nutr.* 2004; 134(3): 562-7.
398. Tabassum H, Rehman H, Banerjee BD, Raisuddin S, Parvez S. Attenuation of tamoxifen-induced hepatotoxicity by taurine in mice. *Clin Chim Acta.* 2006; 370(1-2): 129-36.
399. Takada M, Ikenoya S, Yuzuriha T, Katayama K. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 147-55.
400. Takayanagi K, Morimoto S, Shirakura Y, Mukai K, Sugiyama T, Tokuji Y, et al. Mechanism of visceral fat reduction in Tsumura Suzuki obese, diabetes (TSOD) mice orally administered β -cryptoxanthin from

Satsuma mandarin oranges (Citrus unshiu Marc). *J Agric Food Chem.* 2011; 59(23): 12342-51.

401. Takumi H, Mukai R, Ishiduka S, Kometani T, Terao J. Tissue distribution of hesperetin in rats after a dietary intake. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011; 75(8): 1608-10.
402. Talwar D, Ha TK, Cooney J, Brownlee C, O'Reilly DS. A routine method for the simultaneous measurement of retinol, alpha-tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. *Clin Chim Acta.* 1998; 270(2): 85-100.
403. Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M, Kuno T. Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of β -Cryptoxanthin and hesperidin. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 516981.
404. Tang PH, Miles MN, Miles L, Quinlan J, Wong B, Wenisch A, et al. Measurement of reduced and oxidized coenzyme Q9 and coenzyme Q10 levels in mouse tissues by HPLC with coulometric detection. *Clin Chim Acta.* 2004; 341(1-2): 173-84.
405. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity. British children, 1965. Part I. *Arch Dis Child.* 1966; 41(219): 454-71.
406. Taverne YJ, Bogers AJ, Duncker DJ, Merkus D. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013: 862423.
407. Terao J, Piskulan L, Yao Q. Protective effect of epicatequin, epicatequin gallate, and quercetin lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 308(1): 278-84.
408. Thomas SM, Moreno RF, Tilzer LL. DNA extraction with organic solvents in gel barrier tubes. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(13): 5411.

409. Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(9): 1477-84.
410. Tolbert NE, Essner E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol.* 1981; (3 Pt 2): 271s-283s.
411. Tong L, Zhou D, Gao J, Zhu Y, Sun H, Bi K. Simultaneous determination of naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin and hesperetin of *Fractus aurantii* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 58: 58-64.
412. Topuz A, Topakci M, Canakci M, Akinici I, Ozdemir F. Physical and nutritional properties of four orange varieties. *J Food Eng.* 2005; 66: 519-23.
413. Tounsi MS, Wannes WA, Ouerghemmi I, Jegham S, Ben Njima Y, Hamdaoui G, et al. Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *J Sci Food Agric.* 2011; 91(1): 142-51.
414. Tribble DL. Further evidence of the cardiovascular benefits of diet enriched in carotenoids. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68(3): 521-2.
415. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010; 2(12): 1231-46.
416. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol.* 2004; 164(3): 341-6.
417. Tulard A, Hoffschir F, de Boisferon FH, Luccioni C, Bravard A. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35(1): 68-77.

418. Tuquet C, Dupont J, Mesneau A, Roussaux J. Effects of tamoxifen on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biol Toxicol.* 2000; 16(4): 207-19.
419. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980; 191(2): 421-7.
420. Unno K, Sugiura M, Ogawa K, Takabayashi F, Toda M, Sakuma M, et al. Beta-cryptoxanthin, plentiful in Japanese mandarin orange, prevents age-related cognitive dysfunction and oxidative damage in senescence-accelerated mouse brain. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34(3): 311-7.
421. Uzun H, Konukoglu D, Gelisgen R, Zengin K, Taskin M. Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. *Obes Surg.* 2007; 17(10): 1367-73.
422. Vagstrand K, Linne Y, Karlsson J, Elfhag K, Lindroos AK. Correlates of soft drink and fruit juice consumption among Swedish adolescents. *Br J Nutr.* 2009; 101(10): 1541-8.
423. Valavanidis A, Vlahoyianni T, Fiotakis K. Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'- deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox activity. *Free Radic Res.* 2005; 39(10): 1071-81.
424. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1): 1-40.
425. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004; 266(1-2): 37-56.

426. Valls-Bellés V, Torres C, Muñiz P, Codoñer-Franch P. Effect of beer consumption on levels of complex I and complex IV liver and heart mitochondrial enzymes and coenzymes Q9 and Q10 in adriamycin-treated rats. *Eur J Nutr.* 2010; 49(3): 181-7.
427. Valls-Bellés V, Torres MC, Boix L, Muñiz P, González-Sanjosé ML, Codoñer-Franch P. alpha-Tocopherol, MDA-HNE and 8-OHdG levels in liver and heart mitochondria of adriamycin-treated rats fed with alcohol-free beer. *Toxicology.* 2008; 249(2-3): 97-101.
428. Valls-Bellés V, Torres MC, Muñiz P, Beltrán S, Martínez-Álvarez JR, Codoñer-Franch P. Defatted milled grape seed protects adriamycin-treated hepatocytes against oxidative damage. *Eur J Nutr.* 2006; 45(5): 251-8.
429. Valls-Bellés V, Codoñer-Franch P, González San José ML, Muñiz Rodríguez P. Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante “in vivo”. Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud; 2005.
430. Valls V, Peiró C, Muñiz P, Sáez GT. Age-related changes in antioxidant status and oxidative damage to lipid and DNA in mitochondria of rat liver. *Proc Biochem.* 2005; 40(2): 903-908.
431. Valls-Bellés V, González P, Muñiz P. Epicatechin effect on oxidative damage induced by tert-BOOH in isolated hepatocytes of fasted rats. *Proc Biochem.* 2004; 39: 1525-1531.
432. van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(3): 331-42.
433. Van Duyn MA, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruits and vegetables consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc.* 2000; 100(12): 1511-21.

434. Van Hoorn DE, Nijveld RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB, et al. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol.* 2002; 451(2): 111-8.
435. Varga Z, Ujhelyi L, Kiss A, Balla J, Czompa A, Antus S. Effect of silybin on phorbol myristate acetate-induced protein kinase C translocation, NADPH oxidase activity and apoptosis in human neutrophils. *Phytomedicine.* 2004; 11(2-3): 206-12.
436. Varma SD, Devamanoharan PS, Morris SM. Prevention of cataracts by nutritional and metabolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995; 35(1-2): 111-29.
437. Viña J, Saez GT, Wiggins D, Roberts AF, Hems R, Krebs HA. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem J.* 1983; 212(1): 39-44.
438. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9(6): 813-39.
439. Vioque J, Weinbrenner T, Castelló A, Asensio L, Garcia de la Hera M. Intake of fruits and vegetables in relation to 10-year weight gain among Spanish adults. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16(3): 664-70.
440. Virtamo J, Edwards BK, Virtanen M, Taylor PR, Malila N, Albanes D, et al. Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on urinary tract cancer: incidence and mortality in a controlled trial (Finland). *Cancer Causes Control.* 2000; 11(10): 933-9.
441. Vladimirov YA. Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences. Johnson JE, Walford R, Harman D, Miquel J, Liss AR, editors. Free radicals, aging and degenerative diseases. New York: Liss; 1986.

442. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifen on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of tamoxifen and raloxifen (STAR) P-2 trial. *JAMA*. 2006; 295(23): 2727-41.
443. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res*. 1999; 38(4): 309-36.
444. Wang Y, Ge K, Popkin BM. Tracking of body mass index from childhood to adolescence: a 6-y follow-up study in China. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(4): 1018-24.
445. Wang Y, Lloyd B, Yang M, Davis CG, Lee SG, Lee W, et al. Impact of orange juice consumption on macronutrient and energy intakes and body composition in the US population. *Public Health Nutr*. 2012; 15(12): 2220-7.
446. Wang YC, Bleich SN, Gortmaker SL. Increasing caloric contribution from sugar-sweetened beverages and 100% fruit juices among US children and adolescents, 1988-2004. *Pediatrics*. 2008; 121(6): e1604-14.
447. Webber LS, Srinivasan SR, Wattigney WA, Berenson GS. Tracking of serum lipids and lipoproteins from childhood to adulthood. The Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol*. 1991; 133(9): 884-99.
448. Wefers H, Sies H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem*. 1983; 137(1-2): 29-36.
449. Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*. 1982; 47(1): 5-18.

450. Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med.* 1997; 337(13): 869-73.
451. Williamson G. Protective effects of fruits and vegetables in the diet. *Nutr Food Sci.* 1999; 1: 6-10.
452. Winn LM, Wells PG. Phenytoin-initiated DNA oxidation in murine embryo culture, and embryo protection by the antioxidative enzymes superoxide dismutase and catalase: evidence for reactive oxygen species-mediated DNA oxidation in the molecular mechanism of phenytoin teratogenicity. *Mol Pharmacol.* 1995; 48(1): 112-20.
453. Wozniak K, Kolacinska A, Blasinska-Morawiec M, Morawiec-Bajda A, Morawiec Z, Zadrozny M, et al. The DNA-damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. *Arch Toxicol.* 2007; 81(7): 519-27.
454. Wright CM, Parker L, Lamont D, Craft AW. Implications of childhood obesity for adult health: findings from thousand families cohort study. *BMJ.* 2001; 323(7324): 1280-4.
455. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004; 134(3): 489-92.
456. Xiao H, Yang CS, Li S, Jin H, Ho CT, Patel T. Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53(3): 398-406.
457. Xu G, Liu D, Chen J, Ye X, Ma Y, Shi J. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chem.* 2008; 106: 545-51.

458. Yamada T, Hayasaka S, Shibata Y, Ojima T, Saegusa T, Gotoh T, Ishikawa S, Nakamura Y, Kayaba K. Frequency of Citrus Fruit Intake Is Associated With the Incidence of Cardiovascular Disease: The Jichi Medical School Cohort Study. *J Epidemiol.* 2011; 21(3): 169-75.
459. Yamaguchi M. Role of carotenoid β -cryptoxanthin in bone homeostasis. *J Biomed Sci.* 2012; 19: 36.
460. Yang H, Mohamed AS, Zhou SH. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:85.
461. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta.* 2010; 411(23-24): 1875-82.
462. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 385(1): 20-7.
463. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54(3): 176-86.
464. Yu BP. Membrane alteration as a basis of aging and the protective effects of calorie restriction. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126(9): 1003-10.
465. Yuan JM, Stram DO, Arakawa K, Lee HP, Yu MC. Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(9): 890-8.
466. Yuan Q, Zhu X, Sayre LM. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem Res Toxicol.* 2007; 20(1): 129-39.
467. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(3): 337-49.

468. Zhang CX, Ho SC, Chen YM, Fu JH, Cheng SZ, Lin FY. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *Int J Cancer*. 2009; 125(1): 181-8.
469. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008; 454(7203): 455-62.
470. Zhang M, Brewer AC, Schroder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(42): 18121-6.
471. Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem*. 1990; 265(27): 16330-6.
472. Zmijewski JW, Landar A, Watanabe N, Dickinson DA, Noguchi N, Darley-Usmar VM. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33(Pt 6): 1385-9.

X. DOCUMENTOS ADJUNTOS

Mandarin Juice Improves the Antioxidant Status of Hypercholesterolemic Children

*Pilar Codoñer-Franch, *Ana B. López-Jaén, †Pilar Muñoz, ‡Enrique Sentandreu, and
*Victoria Valls Bellés

*Department of Pediatrics, Obstetrics, and Gynecology, University of Valencia, Spain, †Unit of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biotechnology and Nutritional Science, Science Faculty, University of Burgos, Spain, and ‡Institute of Agrochemical and Food Technology, Valencia, Spain

ABSTRACT

Background: Oxidative stress has been linked to such degenerative diseases as atherosclerosis, and it has been suggested that increased dietary intake of antioxidants may reduce its progression.

Objective: To determine the effect of mandarin juice consumption on biomarkers related to oxidative stress in hypercholesterolemic children.

Materials and Methods: The diet of 48 children with plasma cholesterol >200 mg/dL and low-density lipoprotein cholesterol >130 mg/dL was supplemented for 28 days with 500 mL/day of pure (100%) mandarin juice (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.). The composition of the mandarin juice was analyzed, and its antioxidant antiradical activity was evaluated in vitro. Malondialdehyde, carbonyl groups, vitamins E and C, erythrocyte-reduced glutathione, and plasma lipids were measured at the onset and at the end of the supplementation period. The paired Student *t* test was used to compare values before and after supplementation.

Results: Mandarin juice exerted a strong antioxidant effect mainly due to its high hydroxyl activity and, to a lesser extent, to its superoxide scavenger activity. At the end of the study, levels of the plasma biomarkers of oxidative stress were significantly decreased (malondialdehyde –7.4%, carbonyl groups –29.1%, $P < 0.01$), whereas the plasma antioxidants vitamin E and C (13.5%, $P < 0.001$ and 68.2%, $P < 0.00001$, respectively) and intraerythrocyte glutathione level (36.7%, $P < 0.00001$) were significantly increased. Plasma lipids and antibodies to oxidized low-density lipoproteins remained unchanged.

Conclusions: Regular ingestion of mandarin juice significantly reduces plasma biomarkers of lipid and protein oxidation and enhances the antioxidant status of consumers. *JPGN* 47:349–355, 2008. **Key Words:** Antioxidants—Cholesterol—Citrus juice—Oxidative stress. © 2008 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

The onset of atherosclerosis is undetectable, and the disease progresses asymptotically until it reaches a clinical threshold, at which point it can manifest as coronary heart disease, stroke, or peripheral artery problems. Oxygen free radicals have been implicated in this process. Thus, the oxidative modification of low-density lipoproteins (ox-LDL) contributes to atherosclerotic plaque formation; it also causes endothelium damage that plays a key role in the pathogenesis of cardiovascular diseases (1). Recently it has been emphasized that oxidative stress is important in the initiation and pro-

gression of various pediatric diseases and of diseases that can be traced back to childhood, such as arteriosclerosis (2).

Antioxidants exert their protective effects primarily by scavenging free radicals (3). Consequently, to prevent cardiovascular risk the American Dietetic Association has recommended, starting from childhood, the consumption of 5 servings of fruits and vegetables per day to ensure an adequate antioxidant intake (4). However, this recommendation is frequently disregarded because of individual or collective dietary habits or preferences. For instance, in Westernized countries preschool and school-age children tend to consume beverages labeled “fruit drinks.” However, these products often are highly energy dense but provide few nutritional benefits when compared with 100% natural fruit juices.

By contrast, natural citrus juices contain vitamin C, folate, and carotenoids, as well as some flavonoids that are almost exclusively found in the citrus species, namely

Received August 25, 2007; accepted January 24, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Pilar Codoñer-Franch, MD, PhD, Departamento POG, Facultad de Medicina y Odontología, Avenida Blasco Ibáñez, 15, 46010 Valencia, Spain (e-mail: pilar.codoner@uv.es).

Research supported by the Conselleria Agricultura, Pesca, y Alimentación (Agroalimed Program), Generalitat Valenciana, Spain.

The authors report no conflicts of interest.

flavanone-7-0-glycosides and fully methoxylated flavones (5), all of which exert antioxidant effects. Sweet orange juice has been reported to exert a beneficial effect in animals (6) and human adults (7) and is, by far, the most frequently studied citrus fruit juice. However, despite the high consumption of mandarin worldwide, there are no data about the potential antioxidant effect of mandarin juice in vivo. In this context, it is noteworthy that whereas other citrus fruits can be sour-tasting, children readily consume mandarin juice because of its sweet taste, attractive color, and aroma.

The aim of this study was to examine the effects of regular consumption of mandarin juice on the antioxidant status of hypercholesterolemic children. To this aim, we measured the plasma levels of biomarkers derived from the oxidation of lipids (malondialdehyde [MDA]) and proteins (carbonyl groups), the antioxidants vitamin C and E, cellular reduced glutathione (GSH), and the blood lipid profile before and after daily supplementation with 500 mL of commercial mandarin juice for 28 days.

MATERIALS AND METHODS

Mandarin Juice

We used a commercial pure (100%) juice obtained from *Citrus clementina* Hort. ex Tan., which is the most widely cultivated mandarin variety in Spain. This was supplied by Agricultura y Conservas, S.A. (Valencia, Spain) in 1-L vacuum-packed containers and kept at 4°C until consumption.

The composition of the juice is reported in Table 1. Energy content and concentrations of protein, carbohydrates, and fat were measured by conventional Association of Analytical Communities methods (8). Total polyphenolic compounds, total carotenoids, and ascorbic acid were determined by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) as reported elsewhere (9). We measured flavanone-7-0-glycoside and fully methoxylated flavone content using the procedure reported by Sentandreu et al (5). The antioxidant capacity of the juice was evaluated according to Re et al (10) using the 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid] assay, and the reduction capacity of the juice was measured with the ferric reducing/antioxidant power assay (11). We evaluated the radical scavenger activity of the mandarin juice by measuring its hydroxyl scavenger activity with the method reported by Halliwell et al (12) with modifications (13). The results are expressed as the percentage of inhibition of deoxyribose degradation induced by juices when compared with mixtures containing blank samples. The superoxide scavenger activity was evaluated according to Liu et al (14). Superoxide anion release in vitro was assessed by measuring the reduction of nitroblue tetrazolium to a blue precipitate. The results are expressed as the percent inhibition of precipitate formation.

Patients

Patients were recruited from the outpatient clinic of the Pediatrics Department of the Dr Peset University Hospital (Valencia, Spain). The study included 48 children (22 girls,

TABLE 1. Composition of mandarin juice

Energy, kcal/100 mL	44.0 ± 2.3
Protein, g/100 mL	0.60 ± 0.05
Carbohydrates, g/100 mL	10.50 ± 0.09
Fat, g/100 mL	< 1
Vitamin C, mg/100 mL	35.05 ± 1.69
Flavanone glycosides, mg/L	31.00 ± 1.46
Narirutin, mg/L	10.53 ± 0.13
Hesperidin, mg/L	19.90 ± 1.33
Didymin, mg/L	0.57 ± 0.01
Fully methoxylated flavones, mg/L	2.80 ± 0.01
Isosinensetin, mg/L	0.079 ± 0.003
Hexamethyl- <i>O</i> -gossypentin, mg/L	0.086 ± 0.006
Sinensetin, mg/L	0.228 ± 0.001
Tetramethyl- <i>O</i> -isoescutellarein, mg/L	0.025 ± 0.001
Hexamethyl- <i>O</i> -quercetagenin, mg/L	0.233 ± 0.009
Nobiletin, mg/L	0.852 ± 0.003
Tetramethyl- <i>O</i> -scutellarein, mg/L	0.138 ± 0.001
Heptamethoxyflavone, mg/L	1.019 ± 0.001
Tangeretin, mg/L	0.144 ± 0.001
Total polyphenols, mg/L	51.83 ± 1.67
Total carotenoids, µg/L	698.01 ± 43.76
Total antioxidant activity	
ABTS, mmol/L Trolox/100 mL	2.26 ± 0.50
FRAP, µmol/L Fe/100 mL	119 ± 37

Values are mean ± standard deviation, n = 4.

ABTS = 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid]; FRAP = ferric reducing/antioxidant power.

26 boys) ages between 8 and 12 years (9.5 ± 0.5 years) referred for hyperlipidemia detected in a familial study. Inclusion criteria were normal nutritional status by anthropometric (body mass index = 18.56 ± 0.76 kg/m²; body mass index z score = 0.60 ± 0.25) and biochemical (serum total proteins, albumin, prealbumin, and iron status) measures, and hypercholesterolemia (plasma cholesterol >200 mg/dL, LDL cholesterol [LDL-c] >130 mg/dL). The children had no other acute or chronic disease, their liver function was normal, and they were not taking medication during the study. A detailed medical family history was obtained for each child, and a complete physical examination was performed, which included anthropometric parameters and staging of puberty according to Tanner et al (15). All of the patients had preadolescent characteristics corresponding to stage 1 and 2. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the hospital. Parents and children received verbal and written information about the study and gave their written consent.

Blood Samples

A venous blood sample was collected in the morning after a 12-hour fast from each child at the study onset (baseline sample) and after 4 weeks of mandarin supplementation (final sample). Blood, collected in gelose and heparin-treated vacuum containers, was processed immediately after collection. Serum and plasma were separated in a refrigerated centrifuge at 4°C. Lipid profile was determined in serum. MDA and carbonyl groups were determined in plasma, and aliquots of serum were stored at -80°C until required for vitamin E and C analyses. Blood cells were hemolyzed with distilled water, and the hemolysate was treated with cold chloroform: ethanol (3:5 v/v) and centrifuged

(3000g, 10 minutes). Reduced glutathione was measured in the supernatant.

Dietary Assessment

Retrospective 24-hour recall and prospective 7-day food records were obtained at baseline, and 2 and 4 weeks after. A validated instruction manual containing photographs of mandarin juice portions in 3 sizes (16) guided the parents. In addition, a dietitian monitored both parents and patients to ensure comprehension and compliance. We calculated nutrient composition using the nutritional database Alimentación y Salud, BitASDE (General Médica Farmacéutica, Granada, Spain), which is based on Spanish food composition tables (17).

Dietetic Supplementation

Children maintained their usual diets during the study. Parents and children were trained in the juice supplementation, which was carried out at home and divided into 2 doses, 250 mL in the morning and 250 mL in the afternoon for 4 consecutive weeks. Compliance was assessed by the dietitian through the food records.

Lipid Profile

Triglycerides and total cholesterol were determined in serum with commercial enzymatic tests using the Modular Analytics Evo autoanalyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) was measured by the Ultra-HDL test, and the quantitative determination of LDL-c was made by Multigent Direct LDL testing, both using System Architect c800 (Abbott Scientific, Madrid, Spain). Autoantibodies against ox-LDL were detected in serum using an enzyme immunoassay (Biomedica Medizinprodukte, Vienna, Austria).

Markers of Oxidative Stress Status

We measured malondialdehyde (as lipid oxidation marker; the most abundant individual aldehyde produced) in plasma according to Mateos et al (18). We used Gilson (Middleton, WI) HPLC equipment with a model 321 loading pump and a 7725i sample manual injector, and a Kontron Instruments (Milan, Italy) model 430 photodiode array detector model set at 310 nm. The aldehyde was isocratically separated on a Kromasil 100 reverse-phase C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size). Control analysis and data were processed using the UniPoint LC system software, version 5.1 (Gilson). To evaluate protein oxidation, we measured the carbonyl groups released during the incubation of plasma with 2,4-dinitrophenylhydrazine using the method reported by Levine et al (19) and modified by Tian et al (20).

Antioxidants

The levels of GSH were determined in red blood cell hemolysate using a procedure based on the glutathione-S-transferase spectrophotometric method reported by Brigelius et al (21) with modifications. We measured α-tocopherol by

liquid chromatography using the HPLC equipment described above and the method reported by Arnaud et al (22). Plasmatic ascorbic acid was measured by HPLC according to Martin and Frei (23). Before quantification of ascorbic acid, a calibration curve was obtained for the subsequent conversion of peak area to ascorbic acid concentration, expressed in micromoles per liter.

Statistical Analysis

The sample size was calculated taking into account previously published values of the standard deviation for MDA (24). This condition requires 48 subjects to detect a difference of 4% with a power of 99% using the paired Student *t* test. Results are presented as mean ± standard deviation (SD), and *P* < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL) for Microsoft Windows XP (Redmond, WA). The paired Student *t* test (2-tailed) was used to compare the values before and after supplementation.

RESULTS

As shown in Table 1, mandarin juice has high antioxidant potential, as shown by the 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid] and ferric reducing/antioxidant power assays and the high levels of phenolics, vitamin C, and carotenoids. Hesperidin was the main flavanone-7-O-glycoside; there was also a high level of fully methoxylated flavone. The *in vitro* scavenging assays demonstrate the strong antiradical capacity of the juice.

Mandarin juice significantly decreased the deoxyribose degradation induced by the hydroxyl radical, and acted as a superoxide inhibitor with regard to nitroblue tetrazolium reduction (Fig. 1). However, it is noteworthy that 100-μL juice inhibited hydroxyl radicals by 82.5%, whereas the same amount inhibited superoxide level by only 39.3%.

The energy and nutrient intakes of the children at baseline and during the 4 weeks of the study are listed in Table 2. These data are derived from the food records. The food energy intakes of the children were within the ranges of mean values reported for children in Spain (25). The energy breakdown of their diets did not differ significantly between baseline and the end of the study (40% vs 44% carbohydrates and 38% vs 35% fat). Fat consumption was slightly higher and carbohydrate consumption slightly lower than recommended intakes. The higher carbohydrate level at the end of the study versus baseline probably results from the mandarin juice consumption. Interestingly, despite the additional energy units provided by mandarin juice, the mean energy intake decreased slightly. This can be explained by the fact that juice intake twice daily deterred the children from snacking between meals, as emerged from their food records. There were no significant differences in nutrient intake

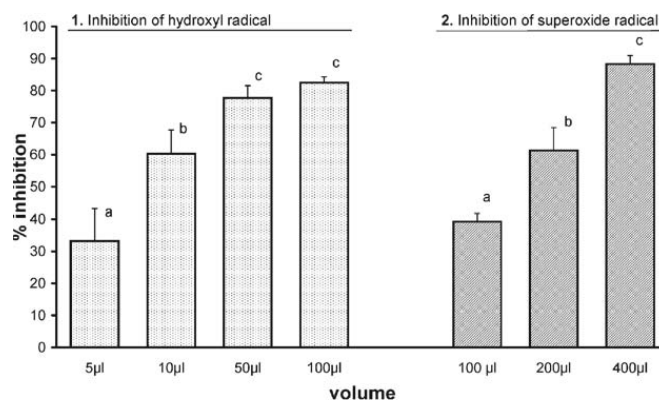


FIG. 1. Radical scavenger activity of mandarin juice. 1, Hydroxyl scavenger activity is expressed as the inhibition of deoxyribose degradation induced by the hydroxyl radical. 2, Superoxide scavenger activity was evaluated from the inhibition of nitroblue tetrazolium reduction to a blue precipitate produced by the ion superoxide. Values are expressed in percentage of inhibition by mean \pm standard deviation ($n = 4$ experiments). The letters (a, b, c) indicate significant differences ($P < 0.05$).

between baseline values and final values, except for an increase in vitamin C levels ($P < 0.001$), as was expected from the consumption of mandarin juice. It is noteworthy that vitamin C intake exceeded the Dietary Reference Intakes (45 mg/d) for children at baseline (85.3 mg/day). On the contrary, calcium intake (880 mg/day at baseline) was lower than age-related recommendations, but did not change during the study (860 mg/day). Indeed, children were encouraged to continue their normal consumption of dairy products.

Table 3 shows the blood lipid profile at baseline and after 4 weeks of juice intake. Supplementation did not significantly decrease the basal serum levels of total cholesterol, triglycerides, LDL-c, or the atherogenic index (total cholesterol/HDL-c). Nor did it augment

HDL-c levels with respect to baseline levels. Similarly, autoantibodies against ox-LDL did not change during the study. It is interesting to note that only 19 children (20%) had ox-LDL values above 500 mU/mL at baseline. Serum folate was elevated at the end of the study, whereas glucose and insulin levels were unchanged.

The levels of plasma biomarkers that reflect the oxidative stress status were decreased significantly in children after the 4-week supplementation period (Table 4). Indeed, juice supplementation induced a significant decrease in the levels of the lipid peroxidation marker MDA (-7.4%) when compared with baseline, as well as in the level of carbonyl groups (-29.1%), the corresponding protein oxidation marker, during the same period.

Antioxidant levels were significantly increased after supplementation with mandarin juice (Table 4). The

TABLE 2. Energy, nutrient intakes, and nutritional status of the 48 hypercholesterolemic children at baseline and after mandarin juice supplementation

	Baseline*	Final [†]
Energy, kcal	2241 \pm 293	2157 \pm 248
Energy, kcal/kg	61.47 \pm 7.09	59.45 \pm 7.01
Carbohydrates, %	40.21 \pm 6.75	44.14 \pm 6.51
Fat, %	38.08 \pm 6.38	35.49 \pm 4.23
Cholesterol, mg/day	246 \pm 83	257 \pm 58
Vitamin C, mg/day	85.29 \pm 52.59	285.01 \pm 120.12 [‡]
Vitamin E, mg/day	20.56 \pm 4.89	22.76 \pm 3.24
Calcium, mg/day	880 \pm 316	860 \pm 270
Weight, kg	35.51 \pm 7.04	35.82 \pm 7.27
BMI, kg/m ²	18.56 \pm 0.70	18.61 \pm 0.80

BMI = body mass index.

* Mean of 24-hour recall and the baseline 7-day food record.

[†] Average of the data collected from the food records at 15 and 28 days of supplementation.

[‡] $P < 0.0001$ vs baseline.

TABLE 3. Blood lipid profile and biochemical values at baseline and after 4 weeks of supplementation with mandarin juice in 48 hypercholesterolemic children

	Baseline	Final
Total cholesterol, mg/dL	253 \pm 42	249 \pm 53
TG, mg/dL	97 \pm 31	94 \pm 32
HDL-c, mg/dL	49 \pm 12	50 \pm 12
LDL-c, mg/dL	184 \pm 42	177 \pm 54
Total cholesterol/HDL-c	5.46 \pm 1.21	5.38 \pm 1.60
Log ox-LDL	2.79 \pm 0.48	2.81 \pm 0.43
Glucose, mg/dL	94.0 \pm 4.6	94.3 \pm 3.9
Insulin, μ U/mL	6.73 \pm 1.38	6.31 \pm 1.27
Folate, ng/mL	10.81 \pm 4.44	12.47 \pm 4.57*

Values are expressed as mean \pm standard deviation. TG = triglycerides; HDL-c = high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c = low-density lipoprotein cholesterol; ox-LDL = antibodies to oxidized low-density lipoprotein.

* $P < 0.05$ vs baseline.

TABLE 4. Blood markers of oxidative stress (malondialdehyde and carbonyl groups) and antioxidants (reduced glutathione, vitamins E and C) before and after 4 weeks of mandarin juice supplementation in 48 hypercholesterolemic children

	Baseline	Final
Malondialdehyde, nmol/mL	1.90 ± 0.48	1.76 ± 0.41*
Carbonyl groups, nmol/mg protein	1.64 ± 0.67	1.28 ± 0.65*
Reduced glutathione, μmol/g Hb	1.99 ± 0.90	2.72 ± 1.02†
Vitamin E, nmol/mL	55.52 ± 15.34	62.74 ± 16.31‡
Vitamin C, μmol/L	46.08 ± 5.92	77.50 ± 10.39†

Values are expressed as mean ± standard deviation. Hb = hemoglobin.

* $P < 0.01$ vs baseline.

† $P < 0.00001$ vs baseline.

‡ $P < 0.001$ vs baseline.

erythrocyte level of GSH increased by 36.7%, and the plasma level of α -tocopherol increased by 13.5%. Also, the plasma concentration of ascorbic acid increased by 68.2%.

DISCUSSION

We demonstrated that the consumption of mandarin juice for 4 weeks exerts a significant positive effect on oxidation biomarkers and enhances the antioxidant defenses of hypercholesterolemic children. Epidemiological findings indicate that a diet rich in fruits and vegetables protects against cardiovascular diseases, and antioxidants have been implicated in this protection (26). Populations whose dietary habits include a large intake of plant foods, including citrus fruits, have a reduced risk for ischemic cardiac disease (27). Citrus juices contain various bioactive compounds that function as free radical scavengers and exert different antiradical activities (28). In line with this observation, we found that mandarin juice has a high antioxidant capacity. Moreover, the scavenger effect of mandarin juice was more effective against hydroxyl compounds than against superoxide radicals. This difference can be related to the different chemical structures of the bioactive compounds ascorbic acid and flavanones in the juice (29). It is well established, however, that the various nutrients provided by foodstuffs can have a relevant synergic effect. A case in point is the reciprocal protective effect that flavonoids and ascorbic acid exert against self-oxidation or induced oxidation phenomena (30). Moreover, like other bioflavonoids, hesperidin (the main mandarin flavanone) is more efficient when administered in combination with vitamin C (31). Thus, the effect of single compounds differs from the effect of their mixture.

The ingestion of 500 mL of mandarin juice daily for 28 days did not significantly affect total cholesterol, HDL-c, LDL-c, the total cholesterol/HDL-c ratio, or

autoantibodies against ox-LDL. It is possible that a more prolonged period of supplementation or a greater daily intake of juice may have a beneficial effect on lipoprotein profiles. In fact, 750 mL/day of orange juice for 28 days had a cholesterol-lowering effect in adults (32). However, it is difficult to ensure compliance with these large amounts in children.

Oxidation of LDL is another risk factor for coronary heart disease. In fact, this process triggers the events leading to the accumulation of lipids within macrophages, which is a critical early step in the formation of atherosclerotic plaques. The prevention of LDL oxidation could be essential in the early stages of the atherosclerotic process, rather than in well-established disease because it could delay the onset and progression of vascular injury. Obviously, prevention is particularly important in children. However, mandarin supplementation did not affect the antibody titer to ox-LDL. It is noteworthy that at baseline, only 20% of children had anti-ox-LDL antibody levels considered to be pathological. In addition, anti-ox-LDL antibody titer may not be an accurate measure of ox-LDL because it is influenced by the formation of immune complexes and by enhanced antibody production (33).

Another interesting result of our study is the reduction of biomarkers that reflect lipid and protein oxidation after 28 days of juice supplementation. The levels of MDA, a biomarker of overall lipid peroxidation, were decreased significantly after mandarin supplementation. A decrease in MDA, which reflects a decreased release of oxygen free radicals that promote lipid membrane oxidation, may help to reduce the risk for an atherosclerotic process in hypercholesterolemic children.

Also, carbonyl group levels were reduced after supplementation with mandarin juice. Protein carbonylation plays a significant role in the etiology and progression of atherosclerosis because it may lead to a change in the activity or function of the oxidized protein (34). We found that supplementation with mandarin juice significantly increased GSH levels. This ubiquitous cellular antioxidant enhances intracellular protection against a wide variety of prooxidant species and increases resistance to oxidative damage. A possible explanation of our result is that other antioxidants (vitamin C and flavonoids) could inhibit oxidation, thus preventing glutathione loss.

Interestingly, plasma levels of vitamin E were increased at the end of the study. Antioxidant compounds are known to exert synergistic effects. For instance, the redox-active reagents vitamin C and polyphenols reduce the tocopheroxyl radical and thus restore the tocopherol level (35). This may account for the increase of vitamin E identified in our study. Whatever their antioxidant reaction mechanism, the various antioxidant agents in mandarin juices (eg, flavonoids, vitamin C, carotenoids, phenolic acids) seem to act synergistically, thereby

enhancing the protective effect derived from their consumption (36).

Our study has several limitations. First, it is difficult to ensure adherence to dietary instructions. However, adherence to supplementation was good as judged by self-report and objective measurements (plasmatic vitamin C). Indeed, one of the strengths of this study is that the children were not required to change their dietary habits. The relatively short study period cannot be considered a major limitation because the effects of dietary intervention usually do not need a long induction period. The effects of orange juice against lipid peroxidation in adults became apparent after only 14 days (37). However, we found no relevant clinical changes in our children, perhaps because clinical changes could need more time or a higher amount of antioxidants to manifest. It has recently been shown that intravenous infusion of a high dose of vitamin C reduces endothelial dysfunction and inflammatory markers (38). We also found that mandarin supplement caused an increase in serum folate, which could prevent an increase of homocysteine, an important cardiovascular risk factor. We are now evaluating the long-term effects of dietary supplementation with mandarin juice.

The weight of our patients did not change during the study, but energy intakes decreased slightly even though the children did not substantially change their diet. Our findings support a previous article in which consumption of 100% fruit juice was not associated with overweight and did not negatively affect calcium intake (39). These findings have important implications because fruit juices have long been considered to be high-energy and low-nutrient beverages that could be one of the causes of the increased prevalence of obesity among young children (40).

According to current recommendations, no more than one third of fruit servings must be 100% fruit juice, and at least two thirds must be fresh fruit because their positive effects are correlated with their high content of dietary fibers and antioxidants (41). However, consumers (especially children) increasingly prefer fruit juices to fresh fruit (25). In recent years, children have increased their consumption of foodstuffs with a high energy content and a low nutrient content (eg, soft drinks, cakes, sweets), thereby increasing the risk for such degenerative diseases as obesity, diabetes, and atherosclerosis. It is conceivable that drinking 100% pure mandarin juice may reduce the intake of "fruit beverages" and snacks, thereby enhancing the antioxidant status of consumers.

Finally, to prevent cardiovascular risk factors, dietary strategies should focus on the prevention and management of excess weight and obesity, and how to prevent or decrease the effects of atherosclerosis. Our data demonstrate that dietary supplementation with 100% pure mandarin juice lowers blood biomarkers of oxidative stress and enhances the concentration of important plas-

matic scavengers. This study emphasizes that preventive interventions can decrease the oxidative stress status. Finally, mandarin juice is an excellent source of antioxidants, which may help to protect against atherosclerotic diseases when combined with other dietary and lifestyle factors.

Acknowledgments: We appreciate the collaboration of the parents whose children have participated in this study, and are grateful to nutritionists Antonio Carrión and Pilar Lillo for their work. We thank Jean Ann Gilder for editing the manuscript.

REFERENCES

1. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29–38.
2. Tsukahara H. Biomarkers for oxidative stress: clinical application in pediatric medicine. *Curr Med Chem* 2007;14:339–51.
3. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84.
4. Nicklas T, Johnson R. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: dietary guidance for healthy children ages 2 to 11 years. *J Am Diet Assoc* 2004;104:660–77.
5. Sentandreu E, Izquierdo L, Sendra JM. Differentiation of juices from clementine (*Citrus clementina*), clementine-hybrids, and satsuma (*Citrus unshiu*) cultivars by statistical multivariate discriminant analysis of their flavanone-7-O-glycosides and fully methoxylated flavones content as determined by liquid chromatography. *Eur Food Res Technol* 2007;224:421–9.
6. Kurowska EM, Borradaile NM, Spence JD, et al. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutr Res* 2000;20:121–9.
7. Riso P, Visioli F, Gardona C, et al. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J Agric Food Chem* 2005;53:941–7.
8. Cuniff P. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, 1997.
9. Franke AA, Custer LJ, Arakaki C, et al. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *J Food Compos Anal* 2004;17:1–35.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231–7.
11. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–6.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987;165:215–9.
13. Rivero D, Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML, et al. Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *J Agric Food Chem* 2005;53:3637–42.
14. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* 1997;60:763–71.
15. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity. British children, 1965. Part I. *Arch Dis Child* 1966;41:454–71.
16. Le Moullec N, Deheeger M, Preziosi P, et al. Validation du manuel photos utilisé par l'enquête alimentaire de l'étude SU.VI.MAX. *Cah Nutr Diét* 1996;31:158–64.
17. Mataix J. *Food Composition Tables*, 4th ed. [in Spanish]. Granada, Spain: University of Granada, 2003.

18. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, et al. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827:76–82.
19. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464–78.
20. Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1477–84.
21. Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, et al. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983;32:2529–34.
22. Arnaud J, Fortis I, Blachier S, et al. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991;572:103–16.
23. Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1583–90.
24. Block G, Dietrich M, Norkus EP, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002;156:274–85.
25. Serra-Majem L, García-Closas R, Ribas L, et al. Food patterns of Spanish schoolchildren and adolescents: the enKid Study. *Public Health Nutr* 2001;4:1433–8.
26. Lairon D. Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1209–14.
27. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;187:1–17.
28. Sendra JM, Sentandreu E, Navarro JL. Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH*) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur Food Res Technol* 2006;223:615–24.
29. Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005;135:2291–4.
30. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, et al. Changes in plasma lipid and antioxidant activity in rats as a result of naringin and red grapefruit supplementation. *J Agric Food Chem* 2005;53:3223–8.
31. Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 2001;15:655–69.
32. Kurowska EM, Spence JD, Jordan JJ, et al. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1095–100.
33. Miller ER III, Erlinger TP, Sacks FM, et al. A dietary pattern that lowers oxidative stress increases antibodies to oxidized LDL: results from a randomized controlled feeding study. *Atherosclerosis* 2005;183:175–82.
34. Nguyen AT, Donaldson RP. Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities. *Arch Biochem Biophys* 2005;439:25–31.
35. Mukai K, Mitani S, Ohara K, et al. Structure–activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1243–56.
36. Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem* 2005;53:2928–35.
37. Sánchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, et al. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr* 2003;78:454–60.
38. Böhm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis* 2007;190:408–15.
39. O'Connor TM, Yang S-J, Nicklas TA. Beverage intake among preschool children and its effect on weight status. *Pediatrics* 2006;118:e1010–8.
40. Striegel-Moore RH, Thompson D, Affenito SG, et al. Correlates of beverage intake in adolescent girls: the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *J Pediatr* 2006;148:183–7.
41. Gidding SS, Dennison BA, Birch LL, et al. Dietary recommendations for children and adolescents: a guide for practitioners. *Pediatrics* 2006;117:544–59.

REGULAR ARTICLE

Oxidative markers in children with severe obesity following low-calorie diets supplemented with mandarin juice

Pilar Codoñer-Franch (pilar.codoner@uv.es)^{1,2}, Ana Belén López-Jaén¹, Agustín de la Mano-Hernández¹, Enrique Sentandreu³, Raquel Simó-Jordá¹, Victoria Valls-Bellés²

1.Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Valencia, Spain

2.Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and Odontology, University of Valencia, Valencia, Spain

3.Institute of Agrochemical and Food Technology, Valencia, Spain

Keywords

Antioxidants, Citrus juice, Hypocaloric diet, Obese children, Oxidative stress

Correspondence

Pilar Codoñer-Franch, Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avenida Gaspar Aguilár, no 90, 46017 Valencia, Spain.
Tel: +34961622389 |
Fax: +34963864815 |
Email: pilar.codoner@uv.es

Received

8 March 2010; revised 15 May 2010;
accepted 26 May 2010.

DOI:10.1111/j.1651-2227.2010.01903.x

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effect of supplementing a hypocaloric diet with mandarin juice, a food with a high content of antioxidants (vitamin C, flavonoids and carotenoids), on biomarkers of oxidant/antioxidant status of severe obese children.

Methods: Forty obese children were randomized into two groups pair-wise in a 4-week controlled intervention study. Both groups followed a hypocaloric diet. One group received additionally a supplementation of 500 mL of 100% mandarin juice daily. Clinical data, anthropometry, dietary intake and fasting blood samples were collected at baseline and after the intervention. Lipid peroxidation was assessed by circulating levels of malondialdehyde, and protein oxidation was determined by the concentration of plasma carbonyl groups. The antioxidant defence was evaluated by red cell-reduced glutathione and plasma levels of α -tocopherol and vitamin C.

Results: The supplemented group experienced a decrease in the levels of malondialdehyde (-9.6% , $p = 0.014$) and carbonyl groups (-36.1% , $p = 0.006$) and an increase in antioxidants (α -tocopherol $+16.1\%$, $p = 0.006$, glutathione $+36.1\%$, $p < 0.0001$, and vitamin C $+94.6\%$, $p < 0.0001$).

Conclusion: The mandarin juice consumption with a reduced calorie diet positively affects the antioxidant defence and produces a decrease in biomarkers of oxidative stress in obese children.

INTRODUCTION

The rising number of children with obesity is a major health concern, principally because of its association with comorbid conditions, such as atherosclerosis and type 2 diabetes, which ultimately lead to cardiovascular disease. Obesity in children is associated with an excess of oxidative stress (1,2), a condition generated when the production of reactive oxygen species exceeds the body's ability to remove them. Oxidative stress can influence endothelial function that plays a crucial pathogenesis role in atheromatosis and other obesity-related disorders. Thus, to identify a diet that counteracts or induces less oxidative stress is of great interest to reduce the sequelae of obesity. Hypocaloric diets often reduce oxidative stress loads (2). Nevertheless, the effect of dietary components on oxidative stress in obese children

has received modest research attention. It is known that many bioactive components in the diet can influence it, mainly nutrients in fruit and vegetables (3).

Fruit juices are widely and easily consumed by children. Intake of citrus juice, a rich source of vitamin C and flavonoids, has been associated with a reduced risk of cardiovascular disease (4). Mandarin juice is a preferred option in many cases by children because of its excellent flavour, and it has the advantage that is a major source of carotenoids, principally β -cryptoxanthin. Recently, we have shown that hypercholesterolemic non-obese children who consumed mandarin juice had a decrease in oxidative stress markers and an increase in antioxidant defence (5). Both a hypocaloric diet and mandarin juice consumption may influence oxidative stress. However, fruit juice has been claimed to be a factor favouring obesity (6). Therefore, this study aimed to determine the effect of mandarin juice supplementation of hypocaloric diet has on biomarkers of the oxidant/antioxidant status of obese children, and its repercussion on obesity indices. A randomized intervention study was carried out comparing a group of obese children who followed a hypocaloric diet for weight reduction to another group of

Abbreviations

BMI, body mass index; GSH, reduced glutathione; HOMA-IR, homeostasis model assessment index; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; MDA, malondialdehyde; ox-LDL, oxidized LDL

obese children who followed the same type of diet, which was supplemented with mandarin juice.

METHODS

Subjects

They were recruited from the outpatient Clinic of the Dr. Peset University Hospital (Valencia, Spain). The study included 40 children (17 boys), aged between 9 and 13 who met the following inclusion criteria: body mass index (BMI) z-score ≥ 2 and Caucasian ethnicity. Exclusion criteria included any syndrome or disease that could influence dietary intake, body composition and fat distribution, endocrine disorders, use of medications or unusual dietary habits (e.g. vegetarianism). None of the children had chronic diseases or suffered from inflammatory conditions, and they had not previously participated in a structured exercise or weight loss program. Infectious illness was ruled out by medical history and physical examinations. Written informed consent was obtained from all parents, and verbal agreement witnessed and formally recorded was obtained from all children. The study was approved by the Ethical Committee of the hospital.

Measurements

Anthropometry measurements (weight, height, waist and hip circumference, skinfold measurement) and blood pressure were obtained using standardized techniques (7). The degree of obesity was determined using the BMI z-score calculated with the lambda, mu, sigma (LMS) method (8). The fat mass percentage was determined via bioelectrical impedance (BC-418MA, Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands).

Laboratory procedures

Blood samples were collected after 12-h fast. Blood was processed immediately after collection and centrifuged at 3000 g for 5 min at 4°C. Plasma aliquots were stored at -80°C until biomarkers of oxidative stress were assessed, which occurred within 1 month. The erythrocytes were lysed, and reduced glutathione (GSH) levels were measured within 48 h in the membrane-free hemolysate. Biochemical characterization tests using automated direct methods (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Germany) were used to analyse serum glucose, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, uric acid, aminotransferases, insulin and folic acid. The homeostasis model assessment index (HOMA-IR) was used to determine insulin resistance by employing the following formula: fasting insulin levels (IU/L) \times fasting glucose (mmol/L)/22.5. The concentration of oxidized-LDL (ox-LDL) was measured with a sandwich ELISA procedure (Biomedica Medizinprodukte, Vienna, Austria).

Biomarkers of oxidative stress

As no single test can evaluate the oxidative state of a specific individual, we have chosen a profile that includes both

oxidative stress markers of damage to macromolecules in antioxidants (laboratory procedures will be described and Appendix S1). The malondialdehyde (MDA) level, a secondary product of lipid peroxidation, and an indicator of oxidative stress, was measured as described previously (9). To evaluate protein oxidation, the concentration of carbonyl groups was measured, as described by Levine et al. (10). The endogenous antioxidant defence was assessed by means of the GSH content of red cells that was assayed using the method of Brigelius et al. (11). Exogenous antioxidants, α -tocopherol and vitamin C, were determined by high-performance liquid chromatography (12,13).

Protocol procedure

The subjects were allocated into two groups pair-wise according to a randomized, longitudinal, open-label study design to dietary intervention over 4-week consecutive. Before the dietary intervention, participants were asked to maintain their food habits and physical activity. Dietary intake at baseline was estimated in all children as the mean of a 24-h diet recall and a prospective 3-d record (2 weekdays and 1 weekend day). The parents and children met with a registered dietitian to receive nutritional counselling. All subjects were asked to increase their intake of fruit, vegetables and fish, consume low-dairy foods and reduce bakery and delicatessen items. The goal of the dietary intervention common to both groups was to reduce the diet to nearly 70% of baseline, principally by reducing fat intake. The group that was supplemented with mandarin juice received 500 mL of pasteurized natural 100% juice daily, which was consumed in two doses: 250 mL in the morning with breakfast and 250 mL in the afternoon. This juice has a content of 184 kJ per 100 mL and 35 mg of vitamin C, and hesperidin and naringenin are the predominant flavonoids (20 and 10 mg/L, respectively). Total carotenoids content was of 700 μ g/L. A more detailed description of its composition has been published elsewhere (5). Both baseline and post-intervention anthropometric, biochemical and experimental measures were taken. Adherence to the protocol was evaluated by means of dietary records obtained every 2 week. Data were collected and reviewed during the interviews face-to-face at this time by registered dietitians who reinforced the advice. Energy and nutrient intakes, both at baseline and during the intervention, were calculated using the validated software Food and Health 0698.046 (BiatASDE General Médica Farmacéutica, Valencia, Spain).

Statistical analysis

The sample size was calculated taking into account the standard deviation of carbonyl groups previously published (5). This condition required 20 subjects to detect a difference of 5% with a power of 90% using the paired Student *t*-test. Baseline characteristics were compared using the *t*-test for independent samples and the changes, before and after intervention, by a paired *t*-test. Skewed data were log-transformed for analysis. Statistical analysis was performed with SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Data are presented as

mean with their standard deviation for all measures. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Physical characteristics and biochemical data of the children who took part in the study are shown in Table 1. Data did not differ between boys and girls. There were no significant differences in subject characteristics or biochemical blood measurements at baseline. All the children included suffered from severe obesity (BMI z-score between 2 and 5). However, all children were normotensive, and their fasting glucose and lipid levels were normal. There were no features of obesity-related liver damage. Both groups of children lost weight during the intervention with a significant reduction in BMI, but its amount was not statistically different between the two groups. The fat mass was not significantly modified at the end of the study, but body fat distribution was significantly modified in the group supplemented by mandarin juice as well as the blood pressure. Insulinaemia and HOMA-IR index decreased in the supplemented children when compared with those who were not supplemented ($p < 0.05$). In contrast, folic acid levels increased in these same children ($p < 0.05$). Other biochemical parameters were unchanged.

The energy and nutrient estimated intakes of the children at baseline and during the 4 week of the study are shown in

Table S1. Both groups had reduced their total energy and fat intake. Specifically, intake of saturated fat and cholesterol was decreased, while polyunsaturated fat intake increased. Daily fruit and vegetables intake increased in both groups. As a consequence, fibre and folic acid intake increased significantly. Children whose diets were supplemented with mandarin juice consumed more servings of total fruits after the intervention; for the non-supplemented group, fruit consumption increased from 2.9 to 4.2 servings per day, whereas the supplemented group showed an increase from 3.1 to 5.2 servings per day. The increase in vitamin C intake in the supplemented group reflects adherence to the supplementation. Calcium intake was slightly lower in the two groups than age-related recommendations but did not change significantly throughout the study.

Markers of oxidative stress (Fig. 1), both MDA and carbonyl groups, did not differ between groups at baseline ($p = 0.708$ and $p = 0.449$, respectively), whereas juice supplementation induced a significant decrease in the levels of MDA (-9.6% , $p = 0.014$) as well as the level of carbonyl groups (-36.1% , $p = 0.006$), over the 4-week period. Antioxidant levels (Fig. 2) were significantly increased after supplementation with mandarin juice. Plasma levels of vitamin C were logically increased ($+94.6\%$, $p < 0.0001$). Nevertheless, also both α -tocopherol and the intracellular antioxidant GSH were elevated ($+16.1\%$, $p = 0.006$, and $+36.0\%$, $p < 0.0001$, respectively). The latter was also

Table 1 Physical and biochemical characteristics of the children enrolled in the study

	Hypocaloric diet (n = 20)		Hypocaloric diet with mandarin juice (n = 20)	
	Baseline	Endpoint	Baseline	Endpoint
Gender (girls/boys)	12/8		11/9	
Age (years)	11.8 ± 2.4		12.1 ± 1.9	
Weight (kg)	67.9 ± 20.0	67.4 ± 20.2*	71.5 ± 15.3	70.7 ± 15.3*
BMI (kg/m ²)	28.7 ± 4.2	28.2 ± 4.1**	29.3 ± 3.5	28.7 ± 3.6 [†]
Fat mass (%)	28.0 ± 4.9	27.6 ± 4.8	28.6 ± 3.9	28.4 ± 4.2
Waist circumference (cm)	88.9 ± 9.3	87.7 ± 10.7	90.8 ± 9.3	89.5 ± 9.8*
Hip circumference (cm)	97.1 ± 14.2	96.5 ± 13.6	101.3 ± 9.7	100.0 ± 9.6*
Triceps skinfold (mm)	22.5 ± 3.2	22.3 ± 3.3	22.2 ± 3.2	21.2 ± 3.3
Subscapular skinfold (mm)	21.4 ± 3.1	20.9 ± 2.7**	22.5 ± 3.9	21.5 ± 3.8**
Systolic BP (mm Hg)	127 ± 11	123 ± 13	127 ± 13	116 ± 27*
Diastolic BP (mm Hg)	64 ± 6	63 ± 4	63 ± 9	61 ± 7*
Total cholesterol (mmol/L)	4.29 ± 0.13	4.27 ± 1.03	3.96 ± 0.59	3.84 ± 0.61
Triglycerides (mmol/L)	0.99 ± 0.59	0.89 ± 0.42	0.88 ± 0.32	0.80 ± 0.28
HDL-C (mmol/L)	1.11 ± 0.21	1.01 ± 0.19*	1.16 ± 0.26	1.03 ± 0.25*
LDL-C (mmol/L)	2.62 ± 0.94	2.83 ± 0.93	2.44 ± 0.54	2.47 ± 0.64
Oxidized-LDL (mU/mL)	918 ± 1131	875 ± 875	836 ± 928	794 ± 768
Glucose (mmol/L)	4.71 ± 0.35	5.31 ± 0.37	5.62 ± 0.85	5.51 ± 0.44
Insulin (pmol/L)	147.2 ± 73.6	134.0 ± 45.8	144.6 ± 56.9	119.5 ± 55.6*
HOMA-IR index	5.0 ± 1.0	4.6 ± 0.6	5.3 ± 0.5	4.3 ± 0.4*
AST (U/L)	24.5 ± 1.9	22.2 ± 1.1	21.6 ± 0.8	21.8 ± 1.5
ALT (U/L)	24.6 ± 2.9	20.1 ± 1.3	20.0 ± 1.9	18.2 ± 2.5
Folic acid (nmol/L)	12.6 ± 4.7	12.9 ± 3.4	11.1 ± 2.7	12.8 ± 2.9*
Uric acid (μmol/L)	246.2 ± 59.4	266.5 ± 77.3	238.5 ± 41.6	251.6 ± 47.6

BMI = body mass index; BP = blood pressure; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance; AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase.

Values are means ± SD.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, [†] $p < 0.001$ versus baseline of the same group.

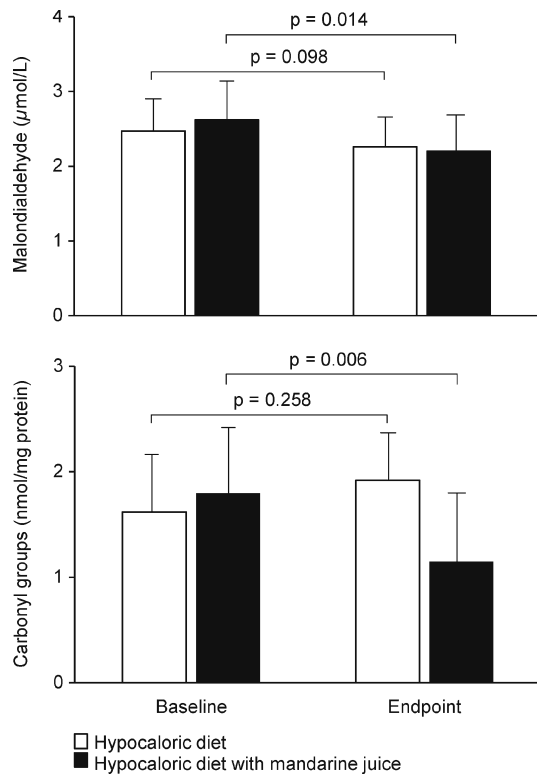


Figure 1 Effect of dietary intervention on oxidative stress biomarkers. Values are means ± SD.

increased in the children after an energy-restricted diet without juice supplementation (+54.3%, $p < 0.0001$).

DISCUSSION

This study provides new insights into changes in oxidative stress biomarkers during a brief intervention period in obese children. Our results show that the dietary intake of mandarin juice added to the hypocaloric diet positively influences antioxidant defence and decreased oxidative stress biomarkers.

The increase in fat mass expose children to excessive production of reactive oxygen species (1,2,14) that can be a mechanism underlying the initiation and progression of potentially obesity-related diseases. Therefore, to prevent the development of secondary disorders, interventional strategies should focus on oxidative stress attenuation. Oxidative stress also increases with age; thus, counteracting it early in life should be emphasized to prevent disease later in life.

Oxidative stress may be evaluated more precisely by a combination of biomarkers that represent a different aspect of oxidative damage or antioxidant capacity. In this sense,

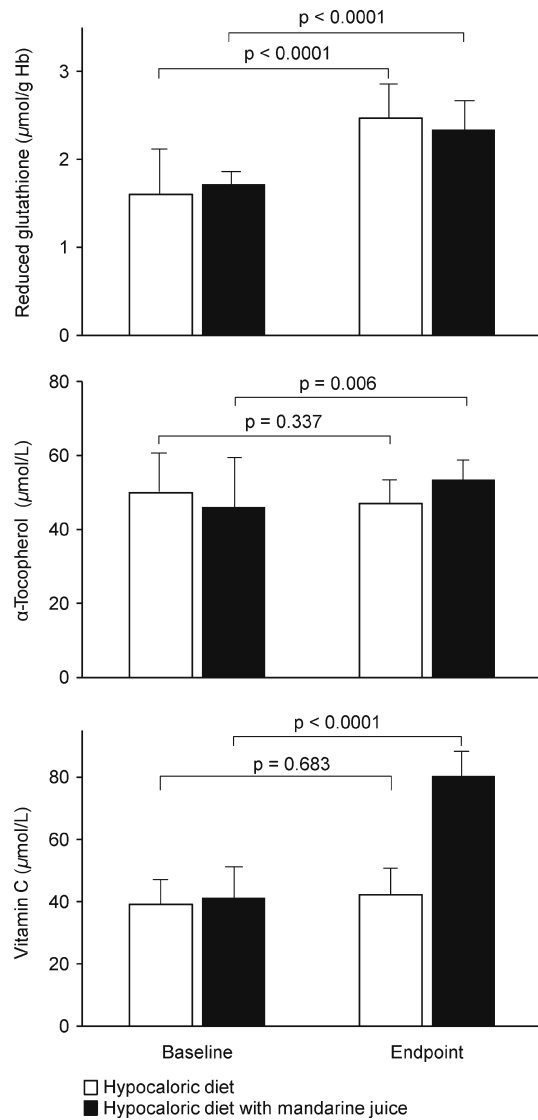


Figure 2 Effect of dietary intervention on antioxidant defence. Values are means ± SD.

determination of oxidative damage to macromolecules by MDA, which reflects overall lipid peroxidation, and protein carbonyl, generated by oxidation of amino acids, together with the endogenous (GSH, the predominant low-molecular-weight thiol in animal cells) and exogenous antioxidants (α-tocopherol and vitamin C), provides a best estimate of the oxidative status.

Diverse studies in obese adults have shown reduction in biomarkers of oxidative stress after weight loss induced by

dietary modifications and/or exercise, pharmacologic or surgical therapy (14), but limited data are available among children. Dietary recommendations are a central component of any weight loss program. Although various dietary interventions may be proposed (15), a low fat, energy-restricted diet is most commonly recommended for children. Recent studies have found a decrease in oxidative stress markers in obese children following an intervention period with dietary restriction and weight loss (2). A decrease in ox-LDL and MDA levels and improved endothelial function were found after a weight loss program that included diet and exercise (16). In contrast, we did not find a decrease in MDA or ox-LDL levels in the children following the hypocaloric diet without juice supplementation. This difference may be attributable to the shorter duration of the intervention period, the slightest changes observed in body weight loss and fat mass, or to the absence of an exercise program in the present study. It has been observed a more pronounced reduction in oxidative damage to proteins in obese children with bran supplementation of the hypocaloric diet (17), highlighting the importance of some foods on oxidative stress (18). Alike, a relevant result of our study is that the reduction in biomarkers that reflect lipid and protein oxidation was present only in the group of children with juice supplementation. We cannot exclude that a diet rich in other kind of fruits and vegetables could also counteract lipid and protein oxidation (19), but mandarin juice presents the advantage of easy consumption and good acceptance by the children.

The level of GSH in erythrocytes was significantly elevated during intervention in both groups of children that could be linked to the weight loss (20). Nevertheless, the finding of the higher increase in children following the hypocaloric diet without supplementation is intriguing. It is possible that the higher level of insulin in this group could enhance GSH synthesis throughout the activation of γ -glutamylcysteine synthetase (21).

Interestingly, plasma levels of α -tocopherol were increased at the end of the study. Other interventional studies with hypocaloric diet did not find this increment (2). We suggest that the maintenance of the antioxidant levels in our study may explain this discrepancy. Vitamin C and polyphenols present in the juice are redox-active reagents that have the ability to reduce the tocopheroxyl radical produced in lipid peroxidation and, thus, they could restore and maintain the α -tocopherol level.

The increase in plasma vitamin C level following mandarin juice consumption in our study indicates at least a good compliance of children and may partially account for the antioxidant effects. Nevertheless, the suppression of reactive oxygen species generation may be mainly because of the major flavonoids of citrus juices, hesperidin and naringenin, instead of ascorbic acid (22). There are some other components in the mandarin juice (e.g. carotenoids) that could also account for the antioxidative effect. It is probably the mix of components that produces the beneficial effects.

To our knowledge, no other studies have investigated the effects of a natural 100% mandarin juice

supplementation diet on indices of oxidative status in obese children. Previous supplementation studies carried out mainly in adults with beverages such as tea or wine show a decrease in oxidative stress (14). On the other hand, concerns have been raised about 100% fruit juice as a dietary factor associated with overweight in children (6), and it could be a contradiction to recommend it. The juice adds energy to the diet. However, we recorded a reduction in daily energy intake in the group supplemented, and this group also displayed a favourable modification in fat distribution. Moreover, the HOMA-IR index decreased in children who consumed mandarin juice. Recent studies conducted in healthy children failed to show any association between 100% fruit juice and becoming overweight (23). Furthermore, our study found a significant weight loss. Energy intake from fruit juice consumption in children can be compensated, at least in part, by a decrease in energy from other sources (24). In this regard, we observed a decrease in the pecking between meals. Additionally, the peel or segment wall generated during squeezing mandarin fruits possesses a lipolytic activity (25) that could also exert an antiobesity effect.

Nevertheless, we are aware of the limits of our study. First, the weight loss was modest in both groups, so we cannot rule out some underreporting at the recall of the diet information. However, strict follow-up of the children has been conducted, and continued efforts have been performed to achieving improvement to diet adherence. Furthermore, adherence to supplementation was good as judged by objective measurements (plasmatic vitamin C). Another limitation is the short duration of the intervention period. It is unknown whether different effects would have been observed over longer periods.

In recent years, there have emerged some diets to treat obesity that may increase markers of oxidative stress and compromise endothelial functions (26). There are experimental studies on several phytochemicals that show beneficial effects on obesity (27), but non-physiologically high dosage of individual supplements can be potentially harmful, whereas adverse health effects are unlikely to arise from consumption of natural foods. Thus, identification of a safe dietary approach to treat obesity has become a medical priority (28). While our findings provide encouraging results with regard to the hypocaloric diet supplemented with mandarin juice in obese children, and their relationship to markers of oxidative stress status, we cannot translate these results into a decreased risk of chronic degenerative disease. Further long-term studies are required. Obviously, research on foods that can reduce oxidative stress and easily consumed by children should be continued.

ACKNOWLEDGMENTS

Research was supported by the Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (Agroalimed Program), Generalitat Valenciana, Spain. Mandarin juice was kindly provided free of charge by Agricons (Valencia, Spain).

References

- Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, Del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V. Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes* 2010; 5: 56–63.
- Mohn A, Catino M, Capanna R, Giannini C, Marcovecchio M, Chiarelli F. Increased oxidative stress in prepubertal severely obese children: effect of a dietary restriction-weight loss program. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2653–8.
- Holt EM, Steffen LM, Moran A, Basu S, Steinberger J, Ross JA, et al. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 414–21.
- Riso P, Visioli F, Gardana C, Grande S, Brusamolino A, Galvano F, et al. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 941–7.
- Codoñer-Franch P, López-Jaén AB, Muniz P, Sentandreu E, Valls Bellés V. Mandarin juice improves the antioxidant status of hypercholesterolemic children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 349–55.
- Wang YC, Bleich SN, Gortmaker SL. Increasing caloric contribution from sugar-sweetened beverages and 100% fruit juices among US children and adolescents, 1988–2004. *Pediatrics* 2008; 121: e1604–14.
- Elberg J, McDuffie JR, Sebring NG, Salaita C, Keil M, Robotham D, et al. Comparison of methods to assess change in children's body composition. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 64–9.
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320: 1240–3.
- Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 827: 76–82.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464–78.
- Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 2529–34.
- Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991; 572: 103–16.
- Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1583–90.
- Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 813–39.
- Demol S, Yackobovitch-Gavan M, Shalitin S, Nagelberg N, Gillon-Keren M, Phillip M. Low-carbohydrate (low & high-fat) versus high-carbohydrate low-fat diets in the treatment of obesity in adolescents. *Acta Paediatr* 2009; 98: 346–51.
- Kelishadi R, Hashemi M, Mohammadifard N, Asgari S, Khavarian N. Association of changes in oxidative and proinflammatory states with changes in vascular function after a lifestyle modification trial among obese children. *Clin Chem* 2008; 54: 147–55.
- Krzystek-Korpaczka M, Patryn E, Boehm D, Berdowska I, Zielinski B, Noczynska A. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem* 2008; 41: 943–9.
- Baur JA. Obesity: do grapes hold the answer? *Pediatr Res* 2007; 61: 663.
- Schroder KE. Effects of fruit consumption on body mass index and weight loss in a sample of overweight and obese dieters enrolled in a weight-loss intervention trial. *Nutrition* 2009; doi:10.1016/j.nut.2009.08.009.
- Uzun H, Konukoglu D, Gelisgen R, Zengin K, Taskin M. Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2007; 17: 1367–73.
- Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134: 489–92.
- Ghanim H, Mohanty P, Pathak R, Chaudhuri A, Sia CL, Dandona P. Orange juice or fructose intake does not induce oxidative and inflammatory response. *Diabetes Care* 2007; 30: 1406–11.
- Nicklas TA, O'Neil CE, Kleinman R. Association between 100% juice consumption and nutrient intake and weight of children aged 2 to 11 years. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008; 162: 557–65.
- Vagstrand K, Linne Y, Karlsson J, Elfhag K, Karin Lindroos A. Correlates of soft drink and fruit juice consumption among Swedish adolescents. *Br J Nutr* 2009; 101: 1541–8.
- Dragull K, Breska AP 3rd, Cain B. Synephrine content of juice from Satsuma mandarins (*Citrus unshiu* Marcovitch). *J Agric Food Chem* 2008; 56: 8874–8.
- Buscemi S, Verga S, Tranchina MR, Cottone S, Cerasola G. Effects of hypocaloric very-low-carbohydrate diet vs. Mediterranean diet on endothelial function in obese women. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 339–47.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444: 337–42.
- Epstein LH, Paluch RA, Beecher MD, Roemmich JN. Increasing healthy eating vs. reducing high energy-dense foods to treat pediatric obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 318–26.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1 Daily dietary intake of the children before and during dietary intervention.

Appendix S1 Laboratory procedures.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.