

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



**"Estudio de los valores de referencia para los parámetros de estrés oxidativo: malondialdehído y glutati3n, medidos por cromatografía líquida de alta eficacia, en humanos y animales de experimentaci3n"**

TESIS DOCTORAL (RD 778/98)

Escrita y presentada por:

**Consuelo Escrivá López**

Dirigida por:

**Profesor D. José Viña Ribes**

**Profesora Dña. M. Carmen Gómez-Cabrera**

**Profesora Dña. Consuelo Borrás Blasco**

Valencia, 2015.





**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

Prof. **D. José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. **Doña. Mari Carmen Gómez Cabrera**, profesora titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. **Doña. Consuelo Borrás Blasco**, profesora titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **Doña Consuelo Escrivá López**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

**"Estudio de los valores de referencia para los parámetros de estrés oxidativo: malondialdehído y glutatión, medidos por cromatografía líquida de alta eficacia, en humanos y animales de experimentación."**

Para la obtención del título de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 3 de noviembre de 2015

Fdo:

Don José Viña Ribes    Doña M. Carmen Gómez Cabrera    Dña. Consuelo Borrás Blasco



*“Lo que consigues con el logro de tus metas no es tan importante como en lo que te conviertes con el logro de tus metas.”*

*Henry David Thoreau.*



*Yo no estaría escribiendo esto hoy si no hubiera contado, en todo momento, con el apoyo y el cariño de mi marido y de mis hijas.*

*Esta tesis está dedicada a vosotros.*

*Quiero agradecer la confianza puesta en mí por el Dr. José Viña Ribes y su grupo, mi querido "Viña's Laboratory". Con ellos ha sido un placer trabajar durante mi estancia en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valencia. A lo largo de tantas horas en el laboratorio, el aprecio hacia los compañeros dejó paso a la amistad, permitiéndome sobrellevar más fácilmente los problemas que me planteaban mis HPLC's. Especial relevancia tiene para mí, mi compañera cromatografista Mar Dromant, con la que he compartido tantos buenos ratos y a la que doy gracias por su amistad y cariño.*

*¡Gracias!*



## JUSTIFICACIÓN DE LA PRESENTE TESIS

La investigación en estrés oxidativo ha experimentado una expansión masiva en los últimos años. Multitud de datos indican que la producción de especies reactivas en los sistemas biológicos regulan numerosos procesos fisiológicos. La producción descontrolada de estas especies está implicada en el inicio y propagación de diversas patologías. Una aproximación común para la determinación del estrés oxidativo en los sistemas biológicos consiste en la medida del aumento o el descenso de moléculas redox-sensibles que responden a este tipo de estrés.

Los biomarcadores de estrés oxidativo usualmente se clasifican en 4 categorías. La primera engloba la detección de oxidantes. Desafortunadamente, la medición directa de la producción de radicales en células vivas es compleja porque los radicales son altamente reactivos y tienen una vida media muy corta. Un segundo grupo de biomarcadores de estrés oxidativo incorpora la medida de antioxidantes en los tejidos. En teoría, durante las agresiones oxidativas se produce una disminución de los niveles de distintos antioxidantes (glutación, ascorbato, tocoferol, etc...). La tercera clase de biomarcadores de estrés oxidativo consiste en la determinación de moléculas modificadas oxidativamente (lípidos, ADN, proteínas) y que pueden ser utilizadas como huellas dactilares del estrés oxidativo sufrido por una célula. Las medidas más comunes de bio-oxidación incluyen la determinación de carbonilos en proteínas, 4-hidroxinonenal, malondialdehído, así como los niveles de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-dG). Aunque se puede argumentar que las moléculas modificadas oxidativamente son los biomarcadores de estrés oxidativo más importantes, su determinación en los sistemas biológicos es difícil porque las moléculas oxidadas existen en cantidades muy pequeñas en las células. La cuarta y última categoría de biomarcadores de estrés oxidativo implica la determinación del balance redox intracelular. Uno de los marcadores más contrastados de esta categoría lo constituye el cociente GSSG/GSH. Este ensayo es muy útil porque un aumento en la producción de oxidantes supone un aumento en el cociente lo que indica unos menores niveles de GSH (glutación reducido) en favor de un aumento del GSSG (glutación oxidado). Aunque el ensayo es conceptualmente sencillo su determinación puede

verse afectada por diversos artefactos durante la obtención y procesado de la muestra.

Pese a que existen multitud de parámetros para valorar el estrés oxidativo cualquier resultado de laboratorio carece de interés por sí mismo si no es posible su comparación con valores de referencia. El valor de referencia en general es un rango considerado como normal para un estudio dado. Se establece después de conocer la distribución de las cifras en poblaciones de referencia. Lamentablemente los valores de referencia de los diversos biomarcadores de estrés oxidativo se desconocen. Aspectos tales como la edad, sexo, estado nutricional, estado de salud, se sabe que pueden afectar a estos biomarcadores.

En la presente tesis doctoral pretendemos establecer los valores de referencia de diversos marcadores de estrés oxidativo (determinados por cromatografía líquida de alta eficacia) tanto en humanos como en animales de experimentación.

El grupo de investigación que dirige el profesor Viña lleva más de 30 años trabajando en el campo del estrés oxidativo. Pese a que en su laboratorio históricamente se han determinado y se determinan multitud de biomarcadores de estrés, en la presente tesis nos hemos centrado en los marcadores pertenecientes a la tercera y cuarta categoría (mencionadas con anterioridad) por ser aquellos en las que más experiencia tenemos y por la trascendencia y fiabilidad contrastada tanto del malodialdeído (como producción de lipoperoxidación), así como del cociente GSSG/GSH (como biomarcador del balance redox intracelular) en el campo del estrés oxidativo.

Los resultados que aquí se presentan se han dividido en dos bloques. En el primer bloque se presentan aquellos resultados que han sido directamente determinados por la doctoranda, encargada del manejo del HPLC del grupo del Dr. Viña durante 8 años. El segundo bloque lo constituyen aquellos valores que aun habiéndose originado en el laboratorio del profesor Viña no han sido analizados directamente por la doctoranda. Pretendemos, de esta forma, demostrar la consistencia y fiabilidad de los parámetros de estrés oxidativo medidos en nuestro grupo mediante la técnica del HPLC.

# ÍNDICES



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS Y ORÍGENES DE LA CROMATOGRAFÍA. ...	3
1.2 CONCEPTOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA. PRINCIPIOS Y APLICACIONES. ....	6
1.2.1 Definiciones de: Fase estacionaria, Fase móvil, Disolvente, Eluyente, Elución, Sorbente, Soporte, Absorción. ....	8
1.2.2 Cromatografía en papel. ....	10
1.2.3 Cromatografía en capa fina. ....	10
1.2.4 Cromatografía de "Partición" (o reparto). ....	11
1.2.5 Cromatografía de adsorción.....	13
1.2.6 Cromatografía sobre gel (de exclusión, de tamizado molecular).....	14
1.2.7 Cromatografía de intercambio iónico. ....	14
1.2.8 Cromatografía de afinidad. ....	15
1.2.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC). ....	16
1.2.10 Cromatografía de gases. ....	20
1.2.11 Cromatografía de fluido supercrítico. ....	22
1.3 ELEMENTOS A CONSIDERAR EN UN CROMATOGRAMA.....	23
1.4 INTERPRETACIÓN CUANTITATIVA DE UN CROMATOGRAMA. ....	26
1.4.1 Elección entre área y altura de pico:.....	26
1.4.2 Cuantificación de los datos obtenidos en un cromatograma:.....	27
1.5 CROMATOGRAFÍA Y ESTRÉS OXIDATIVO. ....	31
1.5.1 ¿QUÉ ES EL ESTRÉS OXIDATIVO? .....	31
1.5.2 Concepto de Radical Libre. ....	32
1.5.3 Clases de radicales libres. ....	33
1.5.4 Génesis de radicales libres .....	34

1.6	ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO A BIOMOLÉCULAS .....	39
1.6.1	Daño oxidativo a lípidos .....	39
1.6.2	Daño oxidativo a proteínas.....	40
1.6.3	Daño oxidativo a glúcidos .....	41
1.6.4	Daño oxidativo al ADN .....	42
1.7	DEFENSA DEL ORGANISMO FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES.....	43
1.7.1	Revisión de los sistemas antioxidantes en el cuerpo humano.....	45
1.7.2	Principales bioindicadores de estrés oxidativo, determinados por HPLC.....	54
1.8	SALUD Y ESTRÉS OXIDATIVO: IMPLICACIÓN DEL ESTADO REDOX CON DIVERSAS SITUACIONES FISIOLÓGICAS Y/O PATOLÓGICAS DEL ORGANISMO. ....	56
1.8.1	Condicionantes que pueden mejorar la situación fisiológica del organismo:.....	57
1.8.2	Situaciones con alto componente de estrés oxidativo: .....	60
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	67
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	67
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
3.1	MATERIALES .....	71
3.1.1	Animales de experimentación e individuos objeto de estudio....	71
3.1.2	Instrumentos de laboratorio .....	75
3.1.3	Reactivos principales:.....	77

3.2	MÉTODOS Y PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO POR HPLC.....	78
3.2.1	Procedimiento para la extracción de mitocondrias del hígado.....	78
3.2.2	Método para determinar la concentración de proteínas: Lowry. ....	79
3.2.3	Determinación de malondialdehído por cromatografía líquida de alta eficacia .....	82
3.2.4	Determinación de glutatión por cromatografía líquida de alta eficacia ..	87
3.3	TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS .....	96
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
4.1	REVISIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA EN RATONES SANOS Y EN SITUACIONES ESPECIALES O PATOLÓGICAS, PARA LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO: GSH, GSSG, (GSSG/GSH)% Y MDA MEDIDOS POR HPLC. ....	101
4.1.1	Estudio con ratones C57BL/6J sometidos a entrenamiento físico.....	101
4.1.2	Estudio en ratones transgénicos de la cepa C57BL/6J para la enfermedad de Alzheimer.....	105
4.1.3	Estudio en ratones SAMP8 (envejecimiento acelerado) y SAMR1 (resistentes al envejecimiento). ....	109
4.1.4	Estudio de la curva de supervivencia de ratones OF1 alimentados con una dieta rica en soja. ....	113
4.1.5	Revisión de los valores de Glutatión y MDA medidos por HPLC, publicados por nuestro grupo. ....	115
4.1.6	Representación gráfica de los valores medios de los parámetros medidos por HPLC para ratones sanos y en condiciones especiales o patológicas, recopilados en esta tesis.....	122

4.2 VALORES DE REFERENCIA EN NIÑOS, JÓVENES Y ADULTOS HUMANOS SANOS Y EN CONDICIONES ESPECIALES O PATOLÓGICAS, PARA LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO: GSH, GSSG, (GSSG/GSH)% Y MDA MEDIDOS POR HPLC.....	130
4.2.1 Estudio con niños deportistas. ....	130
4.2.2 Estudio en una población de jóvenes saludables, basado en la modificación de su dieta mediante la administración de un antioxidante: el pimentón de Novelda o el pimentón de la Vera.....	133
4.2.3 Estudio con enfermos renales sometidos a procesos de diálisis... ..	135
4.2.4 Estudio con enfermos diabéticos tipo I y tipo II, personas con obesidad mórbida y mujeres con ovario poliquístico.....	138
4.2.5 Estudio de los valores de malondialdehído en HUMANOS, en distintos estadíos de fragilidad.....	139
4.2.6 Revisión de los valores DE GLUTATIÓN Y MDA, MEDIDOS POR HPLC, publicados en los últimos años por nuestro grupo. ....	141
4.2.7 Representación gráfica de los valores medios e intervalos de referencia de los parámetros medidos en humanos sanos y en situaciones especiales o fisiopatológicas, recopilados tras los estudios.....	150
<b>5 CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>6 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>
<b>7 ABREVIATURAS.....</b>	<b>187</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1** Separación de clorofilas por cromatografía. ([labquimica.wordpress.com/category/ciencia/page/7/](http://labquimica.wordpress.com/category/ciencia/page/7/)) ..... 4
- Figura 1.2** CG/MS: Cromatógrafo de gases con espectrometría de masas. Marca: Hewlett-Packard ..... 5
- Figura 1.3** Equipos para HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Marca: Shimadzu ..... 5
- Figura 1.4** Cromatograma con 5 analitos diferentes (A, B, C, D y E) ..... 7
- Figura 1.5** Muestra de cromatografía en capa fina ([www.panreac.com/.../practicas/prac21.jp](http://www.panreac.com/.../practicas/prac21.jp)) ..... 11
- Figura 1.6** Elución de una mezcla por cromatografía de adsorción ([www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm](http://www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm)) ..... 13
- Figura 1.7** La mezcla de proteínas en solución se hace pasar a través de una columna compuesta por esferas de un compuesto sólido (generalmente dextrano) que permite la entrada de pequeñas moléculas. Las de tamaño mayor no entran en la matriz y eluyen ([www.cienciahoy.org.ar/hoy...htm](http://www.cienciahoy.org.ar/hoy...htm)) ..... 14
- Figura 1.8** ([www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm](http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm)) ..... 15
- Figura 1.9** ([www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm](http://www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm)) ..... 16
- Figura 1.10**  $w_1$  y  $w_2$  son las anchuras en las bases de los picos 1 y 2 respectivamente;  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$  son los tiempos de retención de los picos de soluto sucesivos. .... 17
- Figura 1.11** Esquema de un HPLC controlado por ordenador ([www.forumsci.co.il/HPLC/topics.htm](http://www.forumsci.co.il/HPLC/topics.htm)) ..... 17
- Figura 1.12** Partes de un cromatógrafo de gases. ([www.quiminet.com](http://www.quiminet.com)) ..... 21
- Figura 1.13** Cromatógrafo de fluidos supercríticos ([www.solutex.es/tecnologia/sfc.php?lang=es\\_ES](http://www.solutex.es/tecnologia/sfc.php?lang=es_ES)) ..... 22
- Figura 1.14** Esquema de las partes de un pico en un cromatograma ..... 23
- Figura 1.15** Esquema de picos de cromatogramas con distintos valores de  $R_s$  25

<b>Figura 1.16</b> Curva de calibración por duplicado , en HPLC, para oxitetraciclina (99% en 0,01 M de ácido oxálico (Lat. Am. J. Aquat. Res., 38(2):227-223. 2010) .....	28
<b>Figura 1.17</b> Superposición de cromatogramas. El de color azul contiene los 3 picos correspondientes al patrón interno y a los picos de GSH y GSSG (nombres en color rosa). El cromatograma de color verde corresponde a la muestra derivatizada.....	29
<b>Figura 1.18</b> Cuantificación de resveratrol en vinos por HPLC, mediante adición del propio compuesto (Atma Sol Bustos et al, 2012).....	31
<b>Figura 1.19</b> Generación de ERO (ROS) en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. ( <a href="https://tallcute.wordpress.com/2008/01/21/enfermedades-asociadas-al-envejecimiento-iv-tapando-la-fuga-mitocondrial/">https://tallcute.wordpress.com/2008/01/21/enfermedades-asociadas-al-envejecimiento-iv-tapando-la-fuga-mitocondrial/</a> ).....	35
<b>Figura 1.20</b> Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P <sub>450</sub> (CYP) propuesto por Coon et al. En él, el Fe <sup>+3</sup> representa al hierro del grupo heme del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) y peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (Coon Mj Ding X, Pernecky, SJ, Vaz ADN Cytochrome P <sub>450</sub> : progress and predictions. FASEB J 1992;6:669-73) .....	39
<b>Figura 1.21</b> Antioxidantes en la célula (Machlin y Bendich, 1987) .....	44
<b>Figura 1.22</b> Cadena de transporte electrónico en las mitocondrias .....	50
<b>Figura 1.23</b> Estructura base de un flavonoide.....	51
<b>Figura 1.24</b> Estructura básica de una molécula de 17 β -estradiol .....	52
<b>Figura 1.25</b> Función antioxidante de GSH. 1) El peróxido de hidrógeno formado por el metabolismo aeróbico es metabolizado por la enzima "GSH peroxidasa" formando GSSG. 2) El GSSG formado en la reacción anterior es reducido por la enzima "GSH reductasa" utilizando NADPH como cofactor. 3) Los peróxidos orgánicos formados pueden ser reducidos por GSH peroxidasa. 4) El GSSG formado durante el estrés oxi-dativo que no puede ser reducido a GSH es exportado de la célula para mantener el equilibrio redox. (Vulcano et al, 2013). .....	53
<b>Fig 1.26.</b> Mecanismo de sobre-expresión de genes antioxidantes por fitoestrógenos .....	58
<b>Figura 1.27</b> La hiperglicemia depleta el glutatión intracelular y aumenta el estrés oxidativo ( <a href="http://www.nutriotal.com.br/icnso/aulas/...bu&amp;categoria=49">www.nutriotal.com.br/icnso/aulas/...bu&amp;categoria=49</a> ).....	61

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Figura 3.1** Gráfico de una recta patrón donde se mide la absorbancia..... 81

**Figura 3.2** Cromatograma del análisis de MDA obtenido con una columna marca "Teknokroma" (www.teknokroma.es)..... 86

**Figura 3.3** Cromatograma típico de los tres patrones utilizados : el primer pico corresponde al patrón interno (Glu-Glu), seguido de los picos de los patrones externos (GSH y GSSG), con sus tiempos de retención y los valores de las áreas correspondientes sobre cada uno de los picos ..... 90

**Figura 3.4** Cromatograma de una muestra de sangre donde se puede observar los picos del "Pi" o patrón interno (Glu-Glu) ( $TR=10,37$  min), GSH ( $tR=21$  min) y GSSG ( $tR=23,8$  min) ..... 95

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Figura 4.1** Comparación de los valores de (GSSG/GSH)%, GSH (mM) en sangre y MDA ( $\mu M$ ) en plasma de ratones jóvenes sanos y en situaciones fisiopatológicas .....123

**Figura 4.2** Comparación de los valores de GSSG en sangre de ratones jóvenes sanos y en situaciones fisiopatológicas.....123

**Figura 4.3** Comparación de los valores medios de MDA ( $\mu M$ ) en plasma en ratones sedentarios y corredores, conforme aumenta su edad .....124

**Figura 4.4** Comparación de los valores de (GSSG/GSH)%, GSH (nmol/g tejido) y MDA (nmol/g tejido) de ratones jóvenes sanos y en situaciones fisiopatológicas obtenidos en muestras de hígado .....126

**Figura 4.5** Comparación de los valores de GSSG (nmol/mg tejido) de ratones jóvenes sanos y en situaciones fisiopatológicas obtenidos en muestras de hígado .....126

**Figura 4.6** Valores de MDA (nmol/mg proteína) en hígado de ratones jóvenes, adultos y viejos sanos (WT), ratones transgénicos para Alzheimer (TG) (jóvenes, adultos y viejos), machos y hembras, así como en ratones SAMP8 y ratones SAMR1 (jóvenes y viejos), así como en mitocondrias de hígado de ratones control y en ratones alimentados con soja .....127

**Figura 4.7** Comparación de los valores de (GSSG/GSH)% y GSH ( $\mu mol/g$  tejido) en cerebros y sus correspondientes mitocondrias. Están presentes cerebros de ratones jóvenes sanos y en situaciones fisiopatológicas, ratones viejos sanos y ratones viejos con ingesta de antioxidante. Medias en mitocondrias de cerebro de ratones jóvenes y viejos controles y en ratones viejos con ingesta de antioxidante.....128

**Figura 4.8** Valores de GSSG (nmol/mg de tejido) en cerebro de ratones jóvenes sanos, ratones jóvenes en situaciones fisiopatológicas, ratones viejos sanos y con ingesta de antioxidante. Medias en mitocondrias de cerebro de ratones jóvenes control, ratones viejos control y de ratones viejos con ingesta de antioxidante 129

**Figura 4.9** Representación gráfica de la evolución de los valores medios de MDA en un humano sano desde la etapa infantil hasta la vejez.....151

**Figura 4.10** Comparación de los valores de MDA considerados en recién nacidos, niños, jóvenes, adultos y ancianos en condiciones especiales y en diversas situaciones patológicas respecto a las medias obtenidas en humanos sanos.....152

**Figura 4.11** Comparación de los valores de GSH (mM) en sangre, considerados en recién nacidos, niños, jóvenes y adultos en condiciones especiales y en diversas situaciones patológicas respecto a las medias obtenidas en humanos sanos.....153

**Figura 4.12** Comparación de los valores de GSSG (mM) en sangre considerados en recién nacidos, niños, jóvenes y adultos en condiciones especiales y en diversas situaciones patológicas respecto a las medias obtenidas en humanos sanos.....154

**Figura 4.13** Comparación de los valores de (GSSG/GSH)% considerados en recién nacidos, niños, jóvenes y adultos en condiciones especiales y en diversas situaciones patológicas respecto a las medias obtenidas en humanos sanos ...155

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Principales especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno .....	33
<b>Tabla 1.2</b> Resumen de los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.....	41
<b>Tabla 3</b> Edad media de la muestra (por grupos). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar.....	75
<b>Tabla 4.1</b> Valores medios de MDA ( $\mu\text{M}$ ) medidos en plasma con sus desviaciones estándar. No se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos. La significación estadística entre los ratones de 26 y 28 meses respecto a los de 3 meses se expresa como $**P < 0,01$ . .....	101
<b>Tabla 4.1 a</b> Medias de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma con los valores umbrales para ratones, obtenidas de las publicaciones del grupo de investigación del Dr. José Viña Ribes.....	...103
<b>Tabla 4.2</b> Valores medios de MDA (nmol/mg proteína) medidos en hígado, con sus desviaciones estándar. Se presentan separadamente machos y hembras. La significación estadística se expresa como $*P < 0,05$ del grupo TG respecto al WT y como $\&\&P < 0,01$ ; $\&\&\&P < 0,001$ de los ratones adultos/as y viejos/as respecto a los/as jóvenes.....	106
<b>Tabla 4.3</b> Valores medios de (GSSG/GSH)% medidos en hígado, con sus desviaciones estándar. Se presentan separadamente machos y hembras. La significación estadística se expresa como $*P < 0,05$ entre ambos grupos y como $\&\&\&P < 0,001$ entre los ratones de más edad respecto a los jóvenes. ....	108
<b>Tabla 4.4</b> Medias del cociente (GSSG/GSH)% en hígado con los valores umbrales para ratones, obtenidas de las publicaciones del Dr. José Viña Ribes	108
<b>Tabla 4.5</b> Valores medios de MDA (nmol/mg proteína) medidos en hígado, con sus desviaciones estándar. No hay diferencias significativas entre ambos grupos. La significación estadística entre viejos y jóvenes de los respectivos grupos, se expresa como $*P < 0,05$ .....	110
<b>Tabla 4.6</b> Valores medios medidos en hígado de glutatión (nmol/mg proteína), con sus desviaciones estándar de los ratones SAMP8 y SAMR1. Las diferencias significativas se expresan como $*P < 0,001$ .....	111
<b>Tabla 4.7</b> Medias de los valores de GSH, GSSG y del cociente (GSSG/GSH)% en hígado, con los valores umbrales para ratones, obtenidas de las publicaciones del Dr. José Viña Ribes.....	112
<b>Tabla 4.8</b> Valores medios de MDA (nmol/mg proteína) medidos en mitocondrias de hígado, con sus derivaciones estándar. La significación estadística se expresa	

como \*\*\* $P < 0,001$  del grupo de ratones sometidos a dieta con soja frente al grupo control.....114

**Tabla 4.9** Valores medios y desviaciones estándar de los parámetros de Glutación (mM) medidos en sangre y MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma, obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989 .....117

**Tabla 4.10** Valores medios y desviaciones estándar medidos en hígado, de Glutación (nmol/mg tejido) y MDA (nmol/g tejido) obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989 .....119

**Tabla 4.11** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en hepatocitos de hígado, de Glutación (nmol/mg tejido) obtenidos de las citas bibliográficas.....119

**Tabla 4.12** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en cerebro, de Glutación (nmol/mg tejido) obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989 ...121

**Tabla 4.13** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en mitocondrias de cerebro, de Glutación (nmol/mg tejido) obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989.....121

**Tabla 4.14** Valores de medias y desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en el estudio con niños deportistas. La significación estadística se expresa como \* $P < 0,05$  y \*\*\* $P < 0,001$  entre las muestras post y pre-entrenamiento .....131

**Tabla 4.15** Valores medios y desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en el estudio de la dieta con los dos tipos de pimentón. La significación estadística respecto a los controles se expresa como \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  ..133

**Tabla 4.16** Valores medios con sus desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en cada grupo de los enfermos renales (prediálisis, diálisis peritoneal y hemodiálisis) respecto a los controles. La significación estadística respecto a los controles se expresa como \*\* $P < 0,01$  .....136

**Tabla 4.17** Valores medios con sus desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en el estudio con enfermos del Servicio de Endocrinología del Hospital Peset de Valencia. La significación estadística respecto a los controles se expresa como \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  .....138

**Tabla 4.18** Medias y valores umbrales de los valores de GSH, GSSG y del cociente (GSSG/GSH)% en sangre y MDA en plasma de adultos sanos, obtenidas de las publicaciones del Dr. José Viña Ribes.....139

**Tabla 4.19** Estadísticos descriptivos para la variable:niveles de MDA en plasma ( $\mu\text{M}$ ) en los diferentes grupos estudiados (no frágil, pre frágil y frágil). La *n* indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar. La significación estadística se expresa como \*\*= $p < 0,01$  de los sujetos prefrágiles y frágiles respecto a los no frágiles .....140

**Tabla 4.20** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en sangre, plasma y en cultivos de células de músculo liso, de los valores de los parámetros de (GSSG/GSH)%, GSH, GSSG y MDA en grupos controles de humanos, obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989 .....143

**Tabla 4.21** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en sangre, plasma y en cultivos celulares de músculo liso, de los valores de los parámetros de (GSSG/GSH)%, GSH, GSSG y MDA, en humanos en condiciones especiales o en situaciones fisiopatológicas, obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989 ..148

**Tabla 4.22** Valores medios de GSH, GSSG y (GSSG/GSH)% en sangre y MDA en plasma, con sus valores umbrales durante las etapas de la vida de un ser humano sano, desde el nacimiento hasta la edad adulta, con las medias de MDA para ancianos (desde no frágiles hasta frágiles)s. La significación estadística respecto a los recién nacidos o niños (en el caso de MDA) se expresa como \* $P < 0,05$  y \*\*\* $P < 0,001$  .....148



# INTRODUCCIÓN



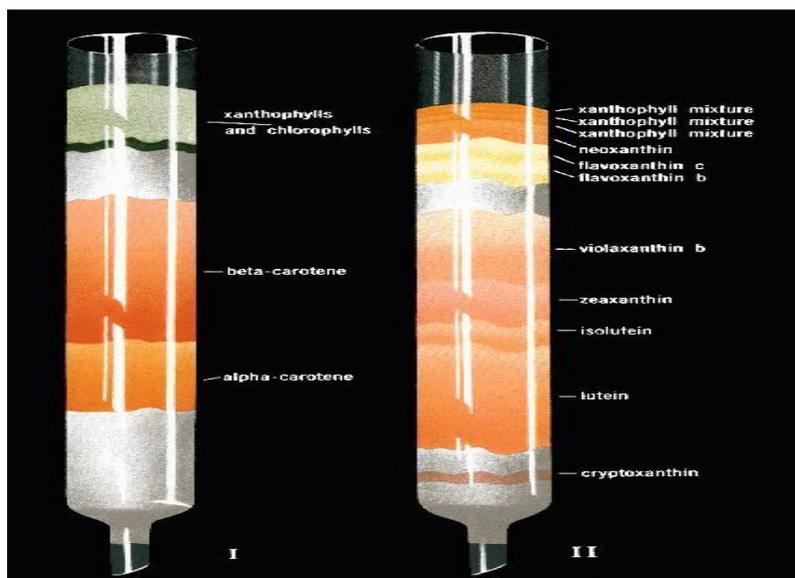
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS Y ORÍGENES DE LA CROMATOGRAFÍA.

La **cromatografía** agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios (Skoog & Leary, 1994). Es una técnica, basada en un método físico de separación, aislamiento e identificación de los componentes químicos de una mezcla.

Esta técnica fue creada por el botánico ruso Mikhail Tswett (1872 -1919) en 1906 quien utilizó por primera vez el término "cromatografía" que proviene del griego χρομα y γραφω que significan respectivamente "chroma" (color) y "graphos" (escribir). Tswett definió la cromatografía como: "método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente dentro de un sistema fluyente".

A comienzos del año 1903, Mikhail Tswett usó columnas de adsorción de líquidos para separar pigmentos vegetales (por ejemplo, clorofilas) y las utilizó para separar compuestos coloreados. Tswett llevó a cabo una extracción de una mezcla de pigmentos de hojas verdes utilizando éter de petróleo, un disolvente no polar, y descubrió que era capaz de separar los pigmentos al hacer pasar el extracto a través de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio (tiza), material poroso que interaccionaba de forma diferente con los componentes de la mezcla, provocando que éstos se separaran en distintas bandas coloreadas a lo largo de la columna (Abbott & Andrews, 1973; Cabezudo, 1988). Tswett utilizó como detector del experimento la simple observación, ya que los compuestos que separó tenían color y era posible detectar bandas o zonas de distintas materias por su color en la columna, demostrando que la clorofila es solo uno de los muchos pigmentos que se encuentran en las hojas de las plantas (**Fig. 1.1**). A partir de estos primeros trabajos, el campo de la cromatografía ha experimentado una enorme evolución, con el desarrollo de varias generaciones de equipos instrumentales (López, 2012a).



**Figura 1.1** Separación de clorofilas por cromatografía.  
([labquimica.wordpress.com/category/ciencia/page/7/](http://labquimica.wordpress.com/category/ciencia/page/7/))

La columna sencilla de Tswett, un tubo vertical de cristal, abierto por su parte superior, rellena de un sólido común donde el eluyente se mueve conducido por su peso, ha evolucionado hasta los modernos equipos que hoy conocemos (**Fig 1.2 y 1.3**).

A pesar de que el método cromatográfico prometía simplificar la separación de sustancias de mezclas complejas, no fue sino hasta finales de la década de los 30 y principio de los 40 cuando se empezó a desarrollar la técnica, teniendo este método diversas aplicaciones (Abbott & Andrews, 1973). En la actualidad la cromatografía se emplea principalmente para separar compuestos incoloros pero el nombre permanece para describir cualquier técnica que se base en los mismos principios.

Los primeros equipos de cromatografía de gases aparecieron en el mercado a mediados del siglo XX. A partir de 1940 los métodos cromatográficos adquieren extensión mundial de forma que en 1940 Tiselius divide los métodos cromatográficos en cromatografía por análisis frontal, desarrollo por elución y desarrollo por desplazamiento, obteniendo el premio Nobel por sus trabajos en 1948. La primera definición técnica detallada de "cromatografía" se debe a Zechmeister en 1936 cuando habla de "un proceso que permite resolver una mezcla de solutos por su fijación selectiva y liberación sobre la superficie sólida

de un soporte, con la ayuda de un flujo continuo en una dirección dada (López, 2012a).

A su vez, la **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)** va aumentando su importancia en las décadas siguientes, hasta convertirse en la técnica cromatográfica más empleada. Sin embargo esto se irá modificando con el paso de los años pues el acoplamiento del HPLC con espectrometría de masas (LCMS) provocará un claro crecimiento de sus respectivos mercados en Estados Unidos y en Europa, cuyos principales valedores serán la industria farmacéutica, las aplicaciones sobre investigaciones en el plasma, síntesis de nuevos fármacos, monitorización de su biodisponibilidad y farmacocinética, así como estudios bioquímicos sobre péptidos y proteínas (López, 2012a).



**Figura 1.2** CG/MS: Cromatógrafo de gases con espectrometría de masas. Marca: Hewlett-Packard



**Figura 1.3** Equipos para HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Marca: Shimadzu

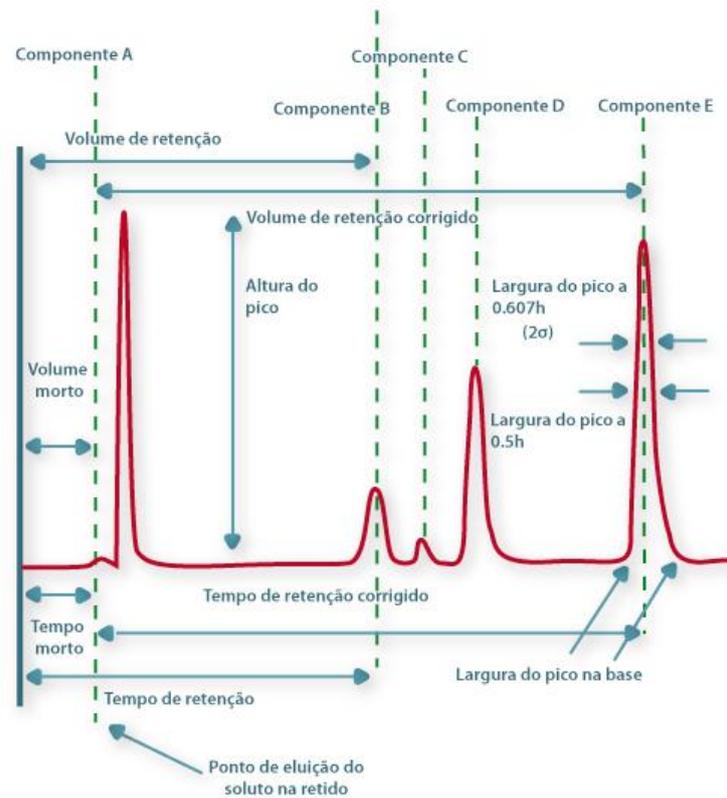
## **1.2 CONCEPTOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA. PRINCIPIOS Y APLICACIONES.**

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una móvil o fluida a través de otra fija o estacionaria que puede ser sólida o líquida (por ejemplo: en la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase fija). La separación de las moléculas se logra porque la movilidad de cada soluto depende de un equilibrio en la distribución entre la fase móvil y la estacionaria y esta separación se puede realizar en función de sus cargas, masas, tamaños moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, etc (Abbott & Andrews, 1973; Skoog & Leary, 1994; López, 2012a).

Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. Estos resultados se recogen en forma de gráficos llamados **cromatogramas (Fig 1.4)**(Abbott & Andrews, 1973; Skoog & Leary, 1994):

La cromatografía puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente:

- El análisis cualitativo que consiste en separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente (etapa final de muchas síntesis). Medidas basadas en diferencias entre los tiempos y volúmenes de retención.
- El análisis cuantitativo, para lo que hay que medir la proporción de los componentes de la mezcla (finalidad analítica). En este caso, las cantidades de material empleadas son pequeñas. Está basado en la medida de las alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración (Skoog & Leary, 1994).



**Figura 1.4** Cromatograma con 5 analitos diferentes (A, B, C, D y E)

Las únicas sustancias que no pueden ser examinadas por cromatografía son las insolubles y aquellas que se descomponen con el solvente o con la fase estacionaria.

Dentro de las técnicas cromatográficas no se incluyen los métodos que utilizan campos eléctricos para separar moléculas cargadas, métodos que se denominan electroseparaciones, electromigraciones o electroforesis (Skoog & Leary, 1994).

## Tipos de cromatografía

Tipos	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía en papel	Líquido	Papel de celulosa.
Cromatografía en capa fina	Líquido	Gel de sílice o alúmina.
Cromatografía de gases	Gas	Columnas capilares de sílice fundida, columnas empacadas con tierras diatomeas hechas de tubos de vidrio o metal.
Cromatografía líquida en fase reversa	Líquido (polar)	Empaques de siloxano de octilo o siloxano de octadecilo.
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Empaques de sílice, alúmina o un soporte al que se unen químicamente grupos polares (ciano, amino, etc).
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Resinas de intercambio iónico.
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Empaques de pequeñas partículas de sílice o polímeros con red de poros uniforme.
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Partículas finamente divididas de sílice o de alúmina.
Cromatografía de fluidos supercríticos	Líquido	Columnas abiertas de sílice fundida con recubrimientos internos de varios tipos de siloxanos enlazados y de enlaces cruzados.

### 1.2.1 DEFINICIONES DE: FASE ESTACIONARIA, FASE MÓVIL, DISOLVENTE, ELUYENTE, ELUCIÓN, SORBENTE, SOPORTE, ABSORCIÓN.

• **Fase estacionaria:** Lecho estacionario de amplio desarrollo superficial que puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz) y que retiene algún componente de la muestra. La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, etc...(Fischer & Peters, 1987).

- **Fase móvil:** Es un fluido que puede ser líquido, gas o fluido supercrítico (aquel que se encuentra por encima de su temperatura y presión críticas), que se usa como portador de la mezcla y que arrastra a la muestra a través de una *fase estacionaria* (sólida o líquida), con la que es inmiscible y que se fija a una columna o a una superficie sólida (Fischer & Peters, 1987).
- **Disolvente o revelador:** Cualquier fase móvil.
- **Eluyente:** La fase móvil una vez que se extrae de la columna (Abbott & Andrews, 1973).
- **Elución:** El paso de la fase móvil a través de la estacionaria que comprende el proceso de extraer un soluto de la fase estacionaria (Abbott & Andrews, 1973; Skoog & Leary, 1994).
- **Sorbente:** Cualquier fase estacionaria (Cases & M. y Gómez Hens, 1990)
- **Soporte:** El material sólido inerte que en la cromatografía de reparto sirve para sostener la fase estacionaria líquida en su sitio (Abbott & Andrews, 1973; Cases & M. y Gómez Hens, 1990)
- **Absorción:** es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar mezcla o a reaccionar químicamente con la misma (Watty, 1982).

Como resultado hay una gran variedad de técnicas para llevar a cabo la separación de una sustancia, que se clasifican en **dos grandes grupos:**

- **Cromatografía plana (Fase móvil líquida):**
  - Cromatografía en papel (Fase estacionaria líquida)
  - Cromatografía en capa fina (Fase estacionaria líquida o sólida)
- **Cromatografía en columna:**
  - Fase móvil líquida:
    - Cromatografía de reparto
      - Cromatografía en fase normal
      - Cromatografía en fase inversa (o reversa)
    - Cromatografía de adsorción
    - Cromatografía de exclusión
    - Cromatografía de intercambio iónico

- Cromatografía de afinidad
- HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)
- Fase móvil gas (Cromatografía de gases):
  - Cromatografía gas-sólido
  - Cromatografía gas-líquido
- Fase móvil fluido supercrítico. Cromatografía de fluidos supercríticos

### **1.2.2 CROMATOGRAFÍA EN PAPEL.**

Es la más sencilla de las técnicas, pero sólo nos dará resultados cualitativos. Está casi en desuso.

El método se basa en un mecanismo de reparto, y consiste en depositar una pequeña cantidad de muestra en el extremo de una tira de papel de filtro, que se deja evaporar. Luego se introduce la tira en una cubeta que contiene el disolvente, de manera que éste fluya a través de la tira por capilaridad (**Fig 1.5**).

Cuando el disolvente deja de ascender o ha llegado al extremo, se retira el papel y se seca. Si el disolvente elegido fue adecuado y las sustancias tienen color propio se verán las manchas separadas de distinto color. Cuando los componentes no tienen color propio el papel se somete a procesos de revelado. (Abbott & Andrews, 1973; Cases & M. y Gómez Hens, 1990).

#### Utilidad:

- Separación de aminoácidos
- Identificación de metales en muestras minerales
- Control de pureza en productos farmacéuticos y alimenticios

### **1.2.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.**

Es una optimización de la cromatografía en papel, siendo más rápida y eficaz que ésta.

La separación se produce sobre una capa de sólido finamente dividido que se ha fijado sobre una superficie plana; generalmente, sobre una placa de vidrio. Las sustancias más utilizadas son gel de sílice, alúmina, zeolita, celulosa y otras

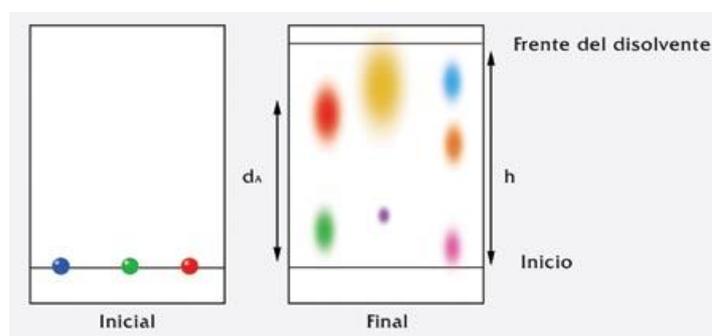
más elaboradas como resinas de intercambio iónico. La fase estacionaria se puede mezclar con yeso para que las placas tengan más consistencia y con sustancias fluorescentes que permiten localizar las manchas de los compuestos separados con una lámpara ultravioleta.

La capa de sólido puede funcionar como soporte para el agua u otros disolventes polares en las separaciones líquido-líquido (cromatografía de reparto); sin embargo, si se seca la capa fina, después de preparada, en un horno, se pierde la humedad (a este proceso se le denomina "activación de la placa") y la separación se hace líquido-sólido (cromatografía de adsorción) (Watty, 1982; Braithwaite & J, 1996).

Respecto a la fase móvil, se emplean disolventes líquidos. La elección de éste se hace dependiendo de la polaridad de los solutos a separar.

Utilidad:

- Fraccionamiento de lípidos
- Separación de aminoácidos.



**Figura 1.5** Muestra de cromatografía en capa fina ([www.panreac.com/.../practicas/prac21.jp](http://www.panreac.com/.../practicas/prac21.jp))

#### **1.2.4 CROMATOGRAFÍA DE "PARTICIÓN" (O REPARTO).**

Los solutos son separados por su diferente distribución entre las dos fases. La separación se debe a pequeñas diferencias entre los coeficientes de distribución (K) o reparto de cada soluto de la mezcla entre los disolventes de las fases, que son equivalentes a sus solubilidades en cada una de ellas. La fase estacionaria será un líquido, generalmente soportado por un sólido adecuado. La fase móvil

puede ser un gas o un líquido dando lugar a la **cromatografía gas-líquido (CGL)** o **líquido-líquido (CLL)**.

La **constante (o coeficiente) de reparto (K)**, mide la distribución del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil, CE es la concentración molar del analito en la fase estacionaria, CM es la concentración del analito en la fase móvil.

$$K = CE / CM$$

Esta técnica también puede hacerse en columna, en este caso el eluyente bajará por ella debido a la simple gravedad. La separación se basa en el mecanismo de partición, ya comentado. (Abbott & Andrews, 1973; Watty, 1982; Cases & M. y Gómez Hens, 1990)

En función de la polaridad de las fases, se divide en *cromatografía de fase normal* y *cromatografía de fase inversa*.

La **cromatografía de fase normal** utiliza una fase estacionaria muy polar, y una fase móvil poco polar. Por tanto, las sustancias menos polares se eluyen antes. Para la fase móvil se utilizan mezclas de disolventes apolares (hexano o ciclohexano) con disolventes polares (cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, etanol, metanol o acetonitrilo), que modifican la polaridad y facilitan la disolución de la muestra.

La **cromatografía de fase inversa** (también llamada **fase reversa**) utiliza una fase estacionaria no polar, y una fase móvil polar. Por tanto, las sustancias más polares se eluyen antes. Para la fase móvil se utilizan mezclas de agua con disolventes polares miscibles, como metanol o acetonitrilo.

#### Utilidad:

La cromatografía en fase normal se utiliza para la separación de mezclas con compuestos muy polares, que quedarían retenidos en una cromatografía sólido-líquido. Pero no es aplicable a mezclas de compuestos con polaridad baja, ya que se retienen muy poco en la fase estacionaria.

La cromatografía en fase inversa se utiliza para la separación de mezclas con compuestos de polaridad baja, que se retienen muy poco en la cromatografía sólido-líquido. También para la separación de compuestos con mismo grupo funcional y que sólo se diferencian entre sí por su cadena hidrocarbonada.

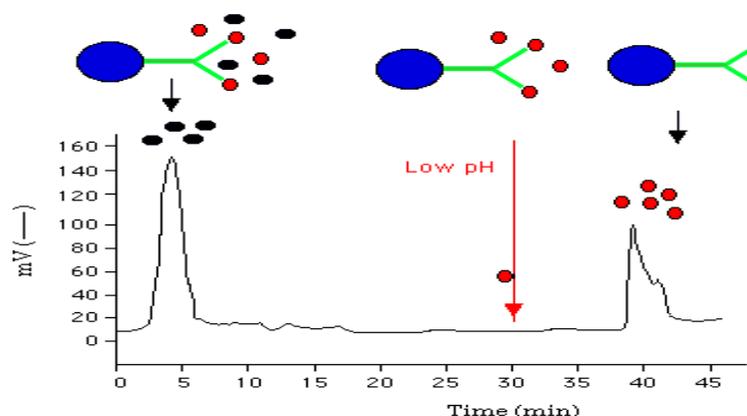
### 1.2.5 CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.

"Adsorción" es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando limitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial, esta retención superficial puede ser física o química (**Fig 1.6**)

La separación de una mezcla por cromatografía, se debe a las diferencias de adsorción de sus componentes sobre la fase estacionaria. La fase estacionaria ha de ser un sólido de gran superficie (superficie interna y externa). La fase móvil puede ser un gas o un líquido dando lugar a la **cromatografía gas-sólido (CGS)** o **líquido-sólido (CLS)** (Cases & M. y Gómez Hens, 1990).

#### Utilidad:

Separar mezclas de compuestos con diferentes grupos funcionales. También para separar mezclas de isómeros y compuestos de masa molecular menor de  $10^4$  g/mol. La dificultad de esta técnica radica en la separación de mezclas de compuestos de polaridad similar.



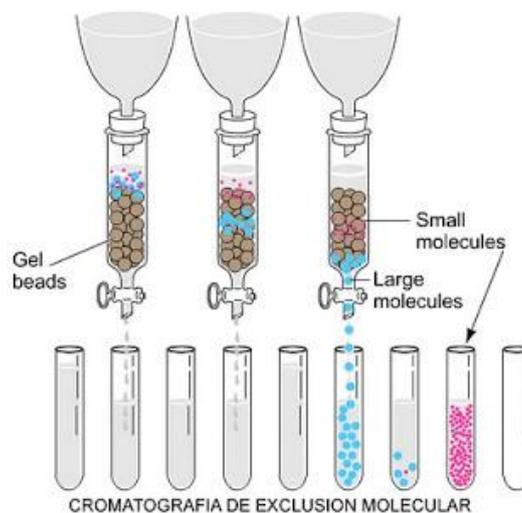
**Figura 1.6** Elución de una mezcla por cromatografía de adsorción ([www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm](http://www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm))

### 1.2.6 CROMATOGRAFÍA SOBRE GEL (DE EXCLUSIÓN, DE TAMIZADO MOLECULAR).

Se basa en un fenómeno de filtración molecular a través de la red de un gel. La separación se produce en base al tamaño y la forma molecular de las especies de la muestra. Las moléculas mayores pasan rápidamente por la columna, ya que no pueden penetrar en el interior del gel, mientras que las menores se retrasan en mayor o menor grado según su tamaño y su forma. Los factores que determinan la separación de las moléculas son el tamaño del poro, el tamaño de la partícula y el flujo de elución (**Fig 1.7**) (7,8).

#### Utilidad:

- Separación de compuestos de peso molecular superior a  $10^4$  g/mol.
- Estimación del peso molecular.



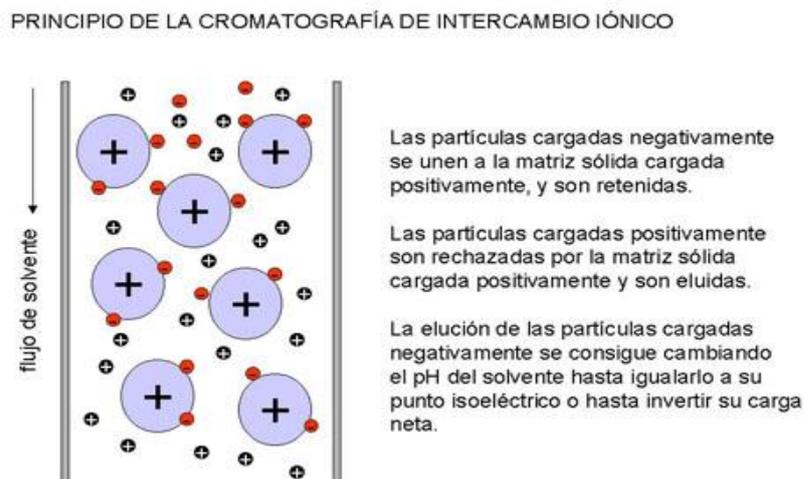
**Figura 1.7** La mezcla de proteínas en solución se hace pasar a través de una columna compuesta por esferas de un compuesto sólido (generalmente dextrano) que permite la entrada de pequeñas moléculas. Las de tamaño mayor no entran en la matriz y eluyen  
([www.cienciahoy.org.ar/hoy...htm](http://www.cienciahoy.org.ar/hoy...htm))

### 1.2.7 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

El intercambio iónico es un proceso mediante el cual ocurre un intercambio reversible de iones de signo igual entre una solución y un sólido esencialmente insoluble en contacto con la solución. En este caso los iones de la muestra compiten con los de la fase móvil por los sitios iónicos de la fase estacionaria. Los que más fuertemente interaccionen, estarán más retenidos y por tanto

eluirán más tarde; por el contrario, los que menos interaccionen, estarán menos retenidos y saldrán antes. (**Fig 1.8**)(Abbott & Andrews, 1973; Braithwaite & J, 1996; Douglas *et al.*, 2007).

La fase estacionaria ha de ser un sólido y la fase móvil un líquido (CLS).



**Figura 1.8** ([www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm](http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm))

#### Utilidad:

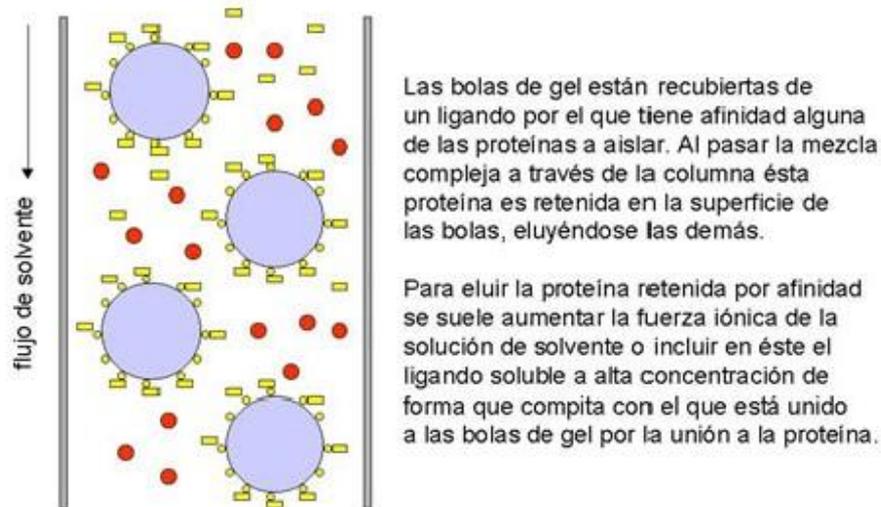
- Separación de compuestos iónicos de bajo peso molecular.
- Purificación de agua.
- Separación de sustancias con propiedades ácido-base, de otras neutras.
- También para aminoácidos, proteínas y nucleótidos.

#### **1.2.8 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

Se basa en una interacción muy específica entre ciertas moléculas: ligando y receptor, antígeno y anticuerpo, enzima y sustrato, ácidos nucleicos entre sí, etc. Una de las moléculas que forman el par se fija sobre la fase estacionaria, y actúa reteniendo a su pareja, que es arrastrada por la fase móvil (Douglas *et al.*, 2007).

La cromatografía de afinidad es especialmente aplicable en bioquímica, y se basa en interacciones específicas entre enzimas y substratos, anticuerpos y antígenos o entre receptores y hormonas. (**Fig 1.9**).

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

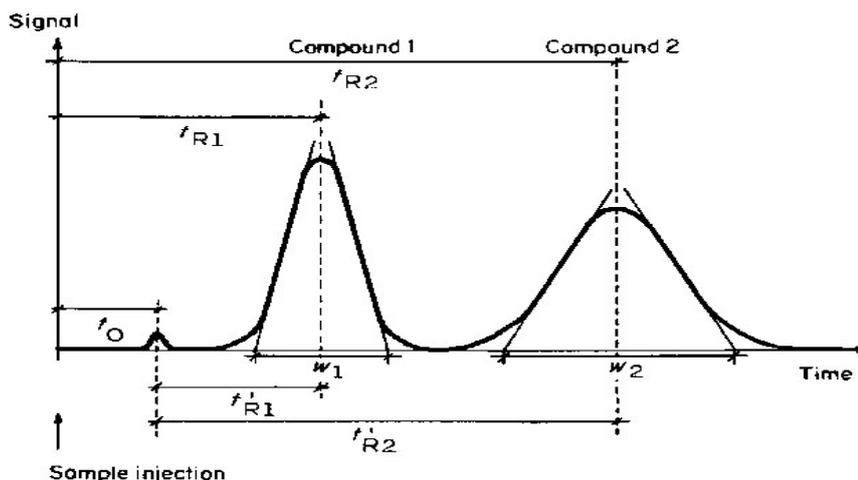


**Figura 1.9** ([www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm](http://www.javeriana.edu.co/.../cromatografia.htm))

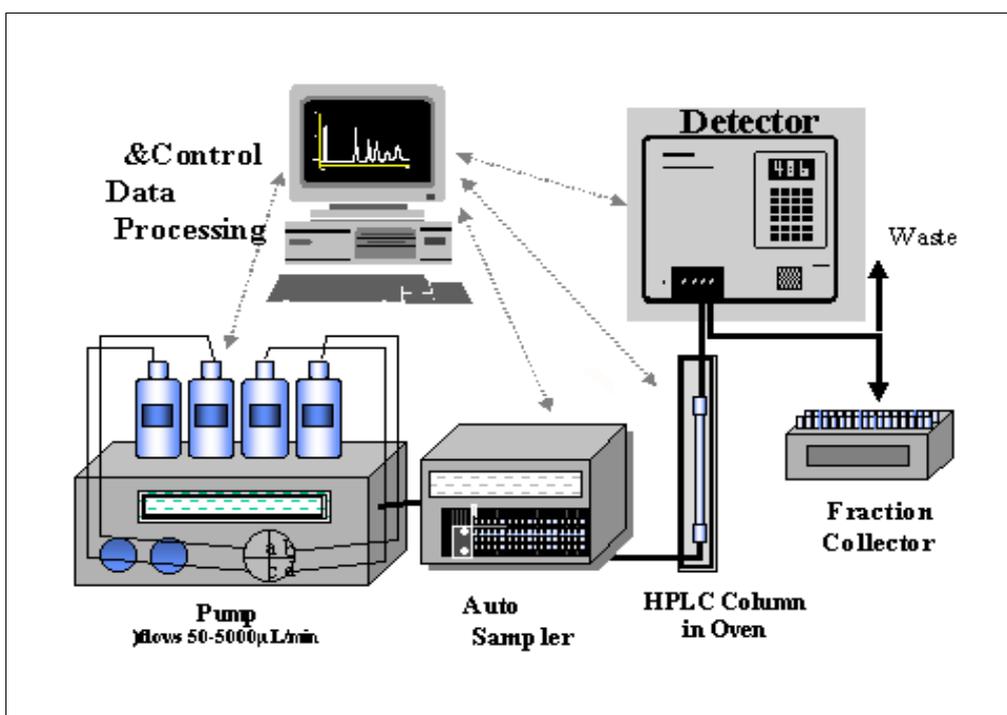
### 1.2.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

La cromatografía líquida de alta eficacia esencialmente es igual a las otras técnicas de cromatografía en columna para fase móvil líquida, pero se ha optimizado impulsando el eluyente mediante un sistema de bombeo, que le somete a elevadas presiones. Esto permite utilizar partículas muy pequeñas como relleno de las columnas.

Como ya se ha comentado, la HPLC requiere un cromatógrafo de líquidos, en el que la fase móvil (disolvente) es líquida, y se bombea a través de la columna a alta presión (70 – 400 atmósferas) y velocidad de flujo constante. La columna contiene la fase estacionaria, adecuada para el tipo de cromatografía. La muestra a analizar se inyecta disuelta, en el inyector, y sus componentes se van separando conforme se eluyen (Issa Katime *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 2007). Finalmente, cada componente pasa por un detector que convierte la información en una señal eléctrica que es procesada para obtener un registro gráfico o cromatograma. (**Figs. 1.10 y 1.11**).



**Figura 1.10**  $w_1$  y  $w_2$  son las anchuras en las bases de los picos 1 y 2 respectivamente;  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$  son los tiempos de retención de los picos de soluto sucesivos.



**Figura 1.11** Esquema de un HPLC controlado por ordenador ([www.forumsci.co.il/HPLC/topics.htm](http://www.forumsci.co.il/HPLC/topics.htm))

Nociones básicas en un HPLC:

1º- La fase móvil puede estar constituida por un único disolvente, siendo en ese caso una elución isocrática; o bien por dos o más disolventes de diferente polaridad que se pueden programar en diferentes proporciones a lo largo de la

elución del analito, hablándose en ese caso de elución en gradiente. En orden creciente de polaridad, los eluyentes más utilizados son heptano, tetracloruro de carbono, cloroformo, dicloruro de etilo, nitropropanona, acetato de propilo, acetato de metilo, acetona, metanol, acetonitrilo y agua.

Los disolventes deben pasar por un desgasificador que les libra de gases disueltos, que podrían dar lugar a señales falsas y desviaciones de la línea base. Del mismo modo, también son filtrados antes de llegar a la bomba, para retener cualquier partícula que pudiera ocasionar una obstrucción.

2º- Hay varios tipos de bombas y pueden ser acopladas a un mismo HPLC. Varían en su capacidad por soportar mayor o menor presión, así como para permitir la elución en gradiente.

3º- Para aumentar la vida de la columna, se puede instalar una precolumna delante de la misma que permita eliminar las impurezas del disolvente y saturar la fase móvil de fase estacionaria. El relleno es químicamente igual al de la columna, pero con un tamaño de partícula mayor, para que la caída de presión a su paso sea el menor posible.

4º- La muestra debe inyectarse en el sistema disuelta en el mismo disolvente o mezcla de disolventes utilizada como fase móvil; a su vez, también debe introducirse de modo que no libere presión del sistema. Por ello, se utiliza un dispositivo integrado en el equipo, que permite "cargar" la muestra en el inyector, y luego liberarla en el flujo de fase móvil. Se obtiene una mejor resolución si la cantidad de muestra es pequeña, y el volumen de inyección es bajo.

5º- Las columnas se suelen construir en acero inoxidable para resistir la elevada presión. A mayor diámetro, mayor capacidad de carga, dilución de los picos, y velocidad de flujo. A mayor longitud, mayor eficacia, pero mayores tiempos de retención.

La diferencia fundamental entre la cromatografía clásica y la HPLC consiste en el empaquetado de la fase estacionaria. Se trata de una fase estacionaria consistente en micropartículas porosas esféricas (5-10  $\mu\text{m}$ ), lo que proporciona una eficacia muy superior a las columnas de cromatografía clásica. La fase

estacionaria puede ser un sólido, o bien un líquido retenido en un sólido inerte, dando lugar a procesos líquido-sólido o líquido-líquido. Los mecanismos de separación serían como los ya vistos: adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión y afinidad.

6º- Respecto a los detectores, existen de dos tipos:

- Detectores que miden una propiedad de la fase móvil, que se ve alterada cuando eluye un analito, como el índice de refracción, la constante dieléctrica, la densidad, etc.

- Detectores basados en la medida de una propiedad del analito como la absorbancia de radiación ultravioleta, absorbancia de radiación infrarroja, o en la dispersión de la luz. El detector UV (ultravioleta) es el más sensible, y puede detectar hasta  $10^{-10}$  g de soluto (Issa Katime *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 2007).

7º- Actualmente la mayor parte de las aplicaciones de la cromatografía líquida de alta eficacia se realizan en fase reversa, como ya se ha explicado anteriormente, usando un disolvente fundamentalmente polar como fase móvil y empleando una cadena hidrocarbonada ligada como fase estacionaria. Esto se debe a que presenta una serie de ventajas:

- Gran estabilidad de la fase estacionaria en la columna.
- El Tiempo de Retención es corto y no se producen reacciones irreversibles ni se deteriora la columna.
- Sistema cromatográfico bastante simple, no precisa complicaciones técnicas como precolumnas de equilibración de la fase móvil.
- El campo de aplicación es muy amplio: en la clínica, nutrición, estudios ambientales y en la industria, ya que se pueden separar por este sistema mezclas de compuestos que forman series homólogas.

Su limitación más importante es la necesidad de mantener la fase móvil en un rango de pH inferior a 8.0 (López, 2012a).

Utilidades:

A diferencia de la cromatografía de gases, ésta técnica permite separar especies no volátiles o termolábiles; como ejemplo tenemos compuestos como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, hidrocarburos, drogas, antibióticos, plaguicidas, etc. En la actualidad, la HPLC, se ha convertido en la más popular y versátil de todas las técnicas analíticas de laboratorio. El HPLC se puede utilizar para diversos usos en áreas tales como la industria de alimentos, industria vitivinícola, industria farmacéutica, industria petroquímica y aplicaciones forenses entre otras. Esto la convierte en una de las técnicas cromatográficas más extensamente utilizada (López, 2012b).

### **1.2.10 CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

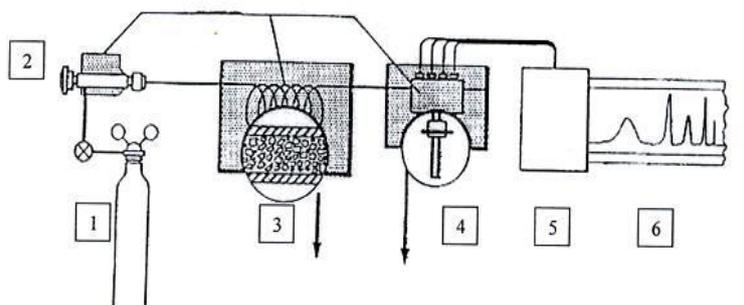
En cromatografía de gases se incluyen todos los métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas (gas portador), siendo la fase estacionaria un líquido (CGL) o un sólido (CGS). Se desarrolla en una columna cerrada en la que se encuentra retenida la fase estacionaria y por la que se hace pasar el gas portador (Issa Katime *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 2007).

Iniciado el proceso cromatográfico los componentes de la mezcla se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil; la elución tiene lugar forzando el paso de un gas inerte a través de la columna. La fase móvil no interacciona con la muestra a analizar y su única misión es la de transportar la muestra, que debe ser suficientemente volátil y térmicamente estable (generalmente las muestras deben ser destiladas con anterioridad) (Skoog & Leary, 1994).

La **cromatografía gas-sólido (CGS)** ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de moléculas activas o polares sobre la fase estacionaria. Por ello, se ha visto restringida a la separación de solutos de peso molecular relativamente bajo y para la separación de especies que no se retienen en columnas de gas-líquido, tales como los componentes del aire, sulfuro de hidrógeno, disulfuro de carbono, óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, dióxido de carbono y gases nobles.

La **cromatografía gas-líquido (CGL)** se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida inmobilizada sobre la superficie de un sólido inerte (soporte) o en las paredes interiores de la columna, si ésta es capilar. Los componentes se reparten en base a su solubilidad y volatilidad.

Los requerimientos básicos de un cromatógrafo de gases son: **Fig. 1.12**



**Figura 1.12** Partes de un cromatógrafo de gases. ([www.quiminet.com](http://www.quiminet.com))

1. Puerto de inyección
2. Columna
3. Detector
4. Registrador o cualquier otro dispositivo de salida para la señal del detector
5. Cromatogramas visibles en un ordenador.
6. Gas de arrastre (portador)

Aplicaciones:

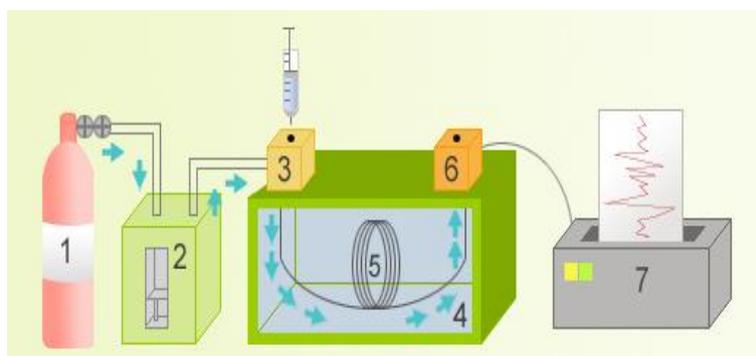
- En la *industria* tiene amplia aplicación donde se utiliza para evaluar la pureza de reactivos o bien para monitorizar la secuencia de una reacción.
- Para la industria del petróleo juega un papel primordial pues, gracias a la cromatografía de gases, se pueden analizar los constituyentes de las gasolinas, las mezclas de gases de refinerías, de gases de combustión, etc.
- En el campo de la investigación, se utiliza para estudios cinéticos, determinación de isothermas de adsorción...

- También puede detectar contaminantes en el agua, (como la presencia de pesticidas y/o insecticidas) así como la existencia de desechos industriales en ríos y lagunas.

La disponibilidad de detectores versátiles y específicos y la posibilidad de acoplar el cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas o a un espectrómetro de infrarrojos, amplían aún más la utilidad de la cromatografía de gases (Skoog & Leary, 1994; Douglas *et al.*, 2007).

### 1.2.11 CROMATOGRAFÍA DE FLUIDO SUPERCRÍTICO.

Es aquel que se encuentra por encima de su temperatura y presión críticas. La temperatura crítica de una sustancia es la temperatura por encima de la cual no puede existir en fase líquida independientemente de la presión. La presión de vapor de una sustancia a su temperatura crítica es su presión crítica. Los fluidos supercríticos tienen densidades, viscosidades y otras propiedades que son intermedias entre las características de esa sustancia en estado gaseoso y en estado líquido (Douglas *et al.*, 2007).



**Figura 1.13** Cromatógrafo de fluidos supercríticos  
([www.solutex.es/tecnologia/sfc.php?lang=es\\_ES](http://www.solutex.es/tecnologia/sfc.php?lang=es_ES))

- |                               |                       |                |
|-------------------------------|-----------------------|----------------|
| <b>1</b> CO <sub>2</sub>      | <b>5</b> Columna      | <b>4</b> Horno |
| <b>2</b> Bomba                | <b>6</b> Detector     |                |
| <b>3</b> Sistema de inyección | <b>7</b> Cromatograma |                |

**La cromatografía supercrítica** es un método de separación o fraccionamiento de matrices líquidas. Combina los fundamentos de la cromatografía de gases (**CG**) y **HPLC**, y como en ellas la separación se produce por la interacción de los solutos con la fase estacionaria. La fase móvil, que en el

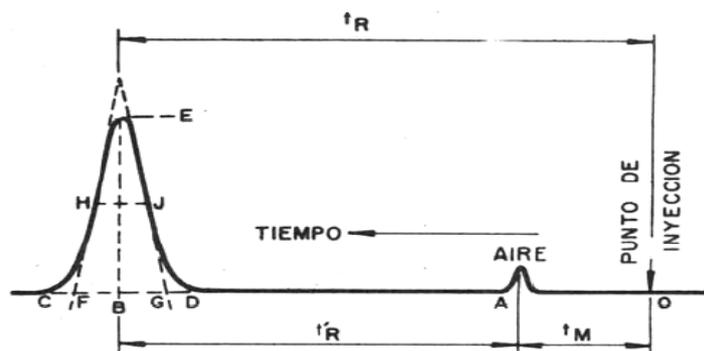
caso de esta técnica es un fluido en estado supercrítico, permite la separación de los solutos en función de la solubilidad de éstos entre las dos fases (Dabrio, 2000; Douglas *et al.*, 2007).

Utilidad:

Hasta ahora, la cromatografía de fluidos supercríticos se ha aplicado a la separación de un amplio conjunto de sustancias, entre los que se cuentan productos naturales, fármacos, alimentos, pesticidas y herbicidas, tensoactivos, polímeros, aditivos de polímeros, combustibles fósiles y explosivos y propelentes.

### 1.3 ELEMENTOS A CONSIDERAR EN UN CROMATOGRAMA

• **Definición de Cromatograma:** Si colocamos un detector al final de la columna que responde a la concentración del soluto y se registra su señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil añadido) se obtiene una serie de picos que representan un gráfico denominado cromatograma (**Fig. 1.14**). Este grafico es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente (Abbott & Andrews, 1973; Douglas *et al.*, 2007):



**Figura 1.14** Esquema de las partes de un pico en un cromatograma

- CD** = base del pico
- FG** = anchura del pico (**W**)
- BE** = altura del pico
- HJ** = anchura del pico en la semialtura
- BE x HJ** = área de pico

- **Línea base:** Porción del cromatograma cuando por la columna sólo sale fase móvil (Abbott & Andrews, 1973).

- **Pico:** Porción de cromatograma que registra el detector cuando por la columna se eluye un compuesto; si la separación es incorrecta aparecen picos solapados. El pico se corresponde con una distribución gaussiana (Abbott & Andrews, 1973; López, 2012b).

- **Tiempo de retención ( $t_R$ ):** Es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector (es decir, el tiempo que tarda un componente de la mezcla en salir de la columna) (Abbott & Andrews, 1973; López, 2012b).

- **Tiempo muerto ( $t_M$ ), o pico de aire:** Es el tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector. Es aproximadamente igual al tiempo necesario para que la fase móvil salga de la columna (Fischer & Peters, 1987; López, 2012b).

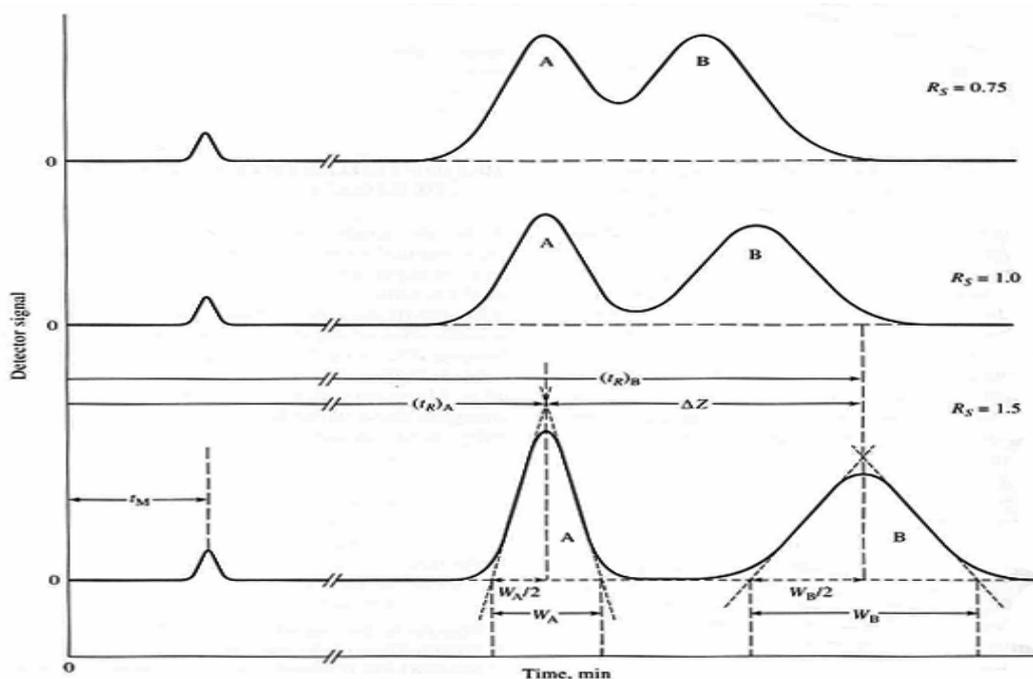
- **Volumen de elución ( $V_e$ ):** Volumen de fase móvil requerido para que eluya el analito (Issa Katime *et al.*, 1998; López, 2012b).

- **Volumen de exclusión ( $V_o$ ):** Volumen de elución de un componente no retenido (Issa Katime *et al.*, 1998; López, 2012b).

- **Resolución ( $R_s$ ):** Grado de separación entre dos picos consecutivos. (Issa Katime *et al.*, 1998). Es una medida de la capacidad para separar dos analitos. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

donde  $W$  indica el ancho de pico, y los subíndices  $A$  y  $B$  indican las dos especies de analito. Si  $R_s > 1,5$  la separación es completa: (Véase **Fig. 1.15**)



**Figura 1.15** Esquema de picos de cromatogramas con distintos valores de  $R_s$

• **Plato teórico:** Un sistema cromatográfico puede considerarse formado por una serie de platos teóricos. Un plato teórico es una zona teórica de equilibrio entre el soluto y las fases móvil y estacionaria (Douglas *et al.*, 2007; López, 2012b). El número de platos teóricos (**N**) se calcula con la siguiente fórmula:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

• **Altura equivalente del plato teórico (H):**

$$H = (\text{Longitud de la columna}) / (\text{N}^\circ \text{ de platos teóricos})$$

• **Eficacia:** La eficacia de una técnica cromatográfica está relacionada con la capacidad de obtener picos estrechos. A mayor número de platos teóricos, y menor H, mayor eficacia (Douglas *et al.*, 2007).

• **Selectividad ( $\alpha$ ):** Es una medida de la distancia entre los picos de los solutos, de modo que cuanto mayor sea, mejor separación. Si  $\alpha = 1$ , la separación sería imposible. Se calcula como  $\alpha = t_{R A} / t_{R B}$  (los subíndices A y B indican las dos especies de analito) (Issa Katime *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 2007).

## **1.4 INTERPRETACIÓN CUANTITATIVA DE UN CROMATOGRAMA.**

Es la determinación de la cantidad presente de alguno de los componentes de la muestra o de todos ellos y constituye, probablemente, el aspecto más importante de la cromatografía líquida moderna.

La magnitud del pico puede relacionarse con la respuesta del detector a los compuestos que pasan a través del mismo y, a su vez, con el número de moléculas de cada soluto y, por tanto, la cantidad o concentración del mismo.

La cuantificación puede realizarse a partir de la medida de la altura del pico o del área del mismo.

**Altura del pico:** es la medida de la distancia entre la línea de base y el máximo del pico.

**Área del pico:** es el área de la curva comprendida entre los márgenes del pico y la línea de base.

La MEDICIÓN DE ÁREAS Y ALTURAS puede realizarse por:

- Métodos manuales
- Integradores gráficos electrónicos
- En sistemas de tratamientos de datos (ordenadores)

### **1.4.1 ELECCIÓN ENTRE ÁREA Y ALTURA DE PICO:**

La elección de la medida de la altura o del área del pico requiere conocer el efecto de la variación de los parámetros cromatográficos en la precisión de cada aproximación y a partir de aquí determinar qué aproximación cuantitativa, áreas o alturas, es preferible (López, 2012a).

Si el control del flujo es adecuado y, sin embargo, la composición del solvente no puede ser mantenida con buena precisión (ej solventes muy volátiles o elución por gradiente), la medida de las áreas de los picos son mejores porque son relativamente independientes de la composición de la fase móvil.

Por otro lado, si la composición puede ser mantenida con mucha precisión (como en operaciones isocráticas) pero el control del flujo de la fase móvil es deficiente, las alturas de los picos llevan generalmente a resultados cuantitativos

más precisos, ya que las alturas de los picos son menos dependientes de las velocidades de flujo que las áreas.

En los casos en los que no es posible hacer controles frecuentes o cuando se espera que la eficiencia de la columna cambie a través de un período de tiempo, las áreas de los picos generalmente van a proporcionar datos más precisos. Por otro lado cuando la cantidad de muestra es muy grande, cercana a la capacidad de máxima carga del sistema, la respuesta en alturas puede no ser lineal y se requiere la medida de las áreas.

#### **1.4.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN UN CROMATOGRAMA:**

Después de obtener el área o la altura de cada uno de los picos, la siguiente etapa consiste en establecer la cantidad o la concentración de los componentes de la muestra que corresponden a estos picos (López, 2012b).

Existen varios métodos:

- Método del estándar externo
- Método del estándar interno
- Método de adición.

##### **1.4.2.1 MÉTODO DEL ESTÁNDAR EXTERNO:**

Se construye primero una gráfica de calibración basada en muestras estándar de concentraciones conocidas de los compuestos de interés (patrones). Estos patrones se preparan con el mismo procedimiento que las muestras problema y se inyecta en el cromatógrafo un volumen determinado de cada disolución estándar, representándose el tamaño de pico (área o altura) frente a la concentración o cantidad para cada compuesto.

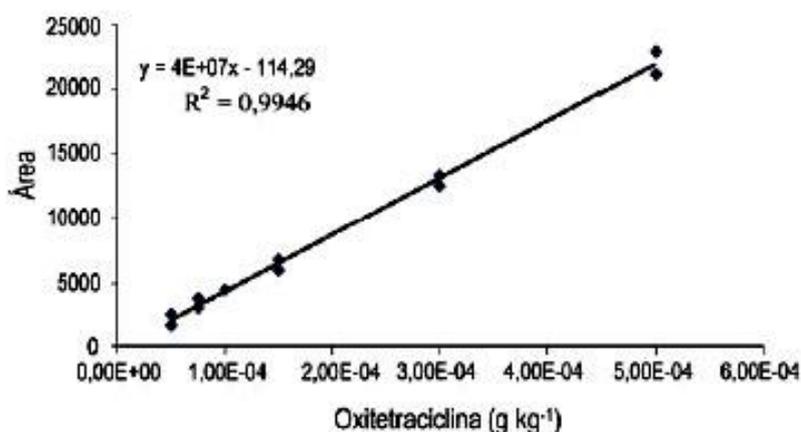
Se calculará la ecuación de la recta y a partir de la misma se determinan las concentraciones o cantidades de las muestras desconocidas.

La respuesta del detector puede ser lineal o no lineal.

Cuando las gráficas de calibración son lineales y pasan a través del origen sólo se necesita controlar frecuentemente que se mantiene la pendiente a partir de la medida de un solo punto.

Cuando la señal del detector no es lineal es necesario trabajar en pequeños tramos pseudolineales de la curva, de manera que se obtiene una recta que no pasa por el origen. Hay que fijar el tramo en el que la respuesta puede ser considerada lineal, de manera que para determinar concentraciones más altas o más bajas puede ser necesario hacer una recta de calibrado obteniéndose una ecuación distinta.

Por tanto, para trabajar con una recta de calibrado hay que determinar la linealidad de la respuesta en ese tramo de las concentraciones (ejemplo. **Fig 1.16**).



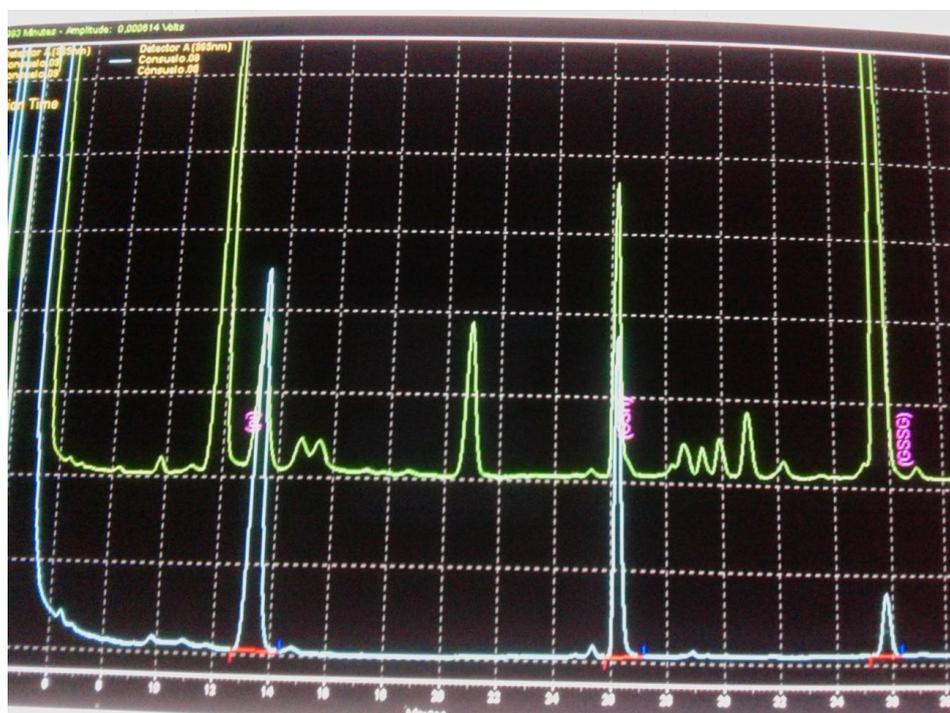
**Figura 1 16** Curva de calibración por duplicado , en HPLC, para oxitetraciclina (99% en 0,01 M de ácido oxálico (Lat. Am. J. Aquat. Res., 38(2):227-223. 2010)

#### 1.4.2.2 MÉTODO DEL ESTÁNDAR INTERNO:

Con este procedimiento, se añade una cantidad fijada de un compuesto conocido a la muestra con el compuesto/s desconocido/s para obtener un pico conocido en el cromatograma.

Este compuesto conocido se usa como un marcador interno para compensar el efecto de variaciones menores de los parámetros de separación en el tamaño de pico, incluyendo las fluctuaciones en el tamaño de la muestra. No obstante, dado que los volúmenes de inyección son muy precisos, la mayor utilidad de esta

técnica es en ensayos que requieren pretratamiento de la muestra (y/o derivatización del soluto) donde pueden producirse recuperaciones variables de los compuestos de interés (**Fig 1.17**).



**Figura 1.17** Superposición de cromatogramas. El de color azul contiene los 3 picos correspondientes al patrón interno y a los picos de GSH y GSSG (nombres en color rosa). El cromatograma de color verde corresponde a la muestra derivatizada.

La selección del estándar interno es crítica tanto para la medida del área como de la altura. Los requisitos que debe cumplir un compuesto para ser “estándar interno” son:

1. El pico debe aparecer completamente resuelto, sin interferencias.
2. Debe de eluir cerca del compuesto/s de interés.
3. Debe de comportarse de manera equivalente al compuesto/s de interés para los análisis que conlleven pretratamientos, formación de derivados...
4. Para mezclas de muchos componentes puede requerirse más de un estándar para alcanzar la máxima precisión.
5. Debe añadirse en una concentración que produzca un área o altura de pico de aproximadamente la unidad con el compuesto/s de interés. Cuando se hace una recta de calibrado debe añadirse la misma cantidad de estándar

interno para todas las concentraciones del calibrado. En este caso se utiliza una cantidad de estándar interno que proporcione una señal similar a la de una concentración intermedia de la recta.

6. No debe de estar presente en la muestra original.
7. Debe ser estable, no reactivo con los componentes de la muestra, la fase móvil o la fase estacionaria.
8. Debe adquirirse comercialmente con un alto grado de pureza.

Con el método del estándar interno se espera que cualquier pérdida del compuesto de interés en el pretratamiento de la muestra, vaya acompañada por la pérdida de una fracción equivalente del estándar interno. La exactitud de esta aproximación depende, obviamente, de la equivalencia estructural de ambos; para obtener los mejores resultados el estándar interno y la sustancia a determinar deberían extraerse igual, reaccionar igual, etc...

Un problema práctico con esta técnica es que éste debe localizarse en una región libre del cromatograma de la muestra, objetivo que puede llegar a ser tedioso en muestras complejas.

#### **1.4.2.3 MÉTODO DE ADICIÓN:**

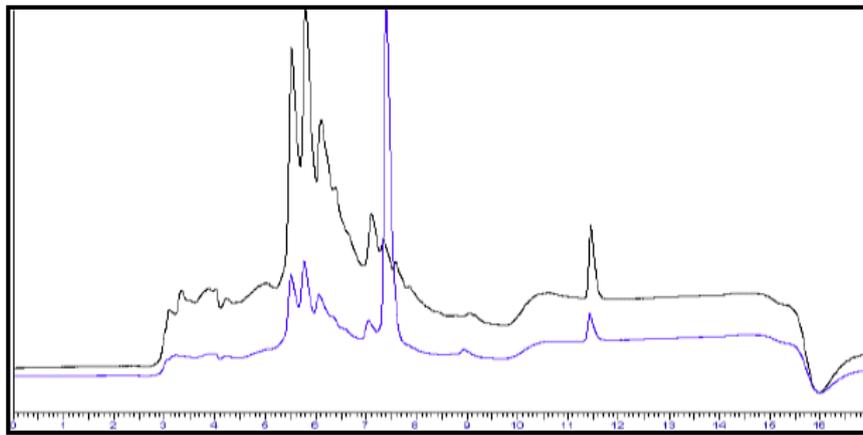
En el análisis de una muestra los picos pequeños a veces están influenciados por otros componentes que no son de interés. Estas influencias ocurren tanto durante el análisis como en el procedimiento de preconcentración y limpieza: son los efectos matriz.

Pueden causar cambios en los tiempos de retención, ensanchamiento de los picos, solapamiento de los picos o malos porcentajes de recuperación.

Para obtener resultados fiables y correctos debe llevarse a cabo la calibración añadiendo cantidades conocidas de la sustancia bajo estudio a una muestra analítica de la misma composición, pero sin el compuesto de interés (muestra en blanco). No obstante, a veces no se puede conseguir una muestra "en blanco", por ejemplo, al estar analizando un compuesto endógeno. En estos casos es cuando se utiliza el "método por adición".

Se añaden varias cantidades conocidas del componente "i" a analizar, a una cantidad determinada de muestra y la mezcla se analiza por HPLC

determinándose las áreas o alturas de los picos. Si se representa la señal obtenida frente a la concentración o cantidad añadida del componente 2i2, el valor deseado puede ser determinado a partir de la intersección de la curva analítica con la concentración de abcisas (López, 2012b) (ejemplo: **Fig 1.18**)



*Figura 3. Cromatogramas sobrepuestos de HPLC con detector UV – vino 3E2 sin dopar y dopado con estándar de resveratrol.*

**Figura 1.18** Cuantificación de resveratrol en vinos por HPLC, mediante adición del propio compuesto (Bustos et al., 2012).

## **1.5 CROMATOGRAFÍA Y ESTRÉS OXIDATIVO.**

### **1.5.1 ¿QUÉ ES EL ESTRÉS OXIDATIVO?**

La enorme cantidad de energía obtenida en una célula se basa en la existencia de las reacciones que tienen lugar en la cadena respiratoria de la mitocondria, en la que el  $\text{NADH}+\text{H}^+$  obtenido en procesos anteriores, como el ciclo de Krebs, transfiere los electrones finalmente al oxígeno molecular por medio de una serie de reacciones redox, en las que debe existir un dador y un aceptor de electrones. A lo largo de este proceso se generan una serie de subproductos tóxicos, los radicales libres. Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células del cuerpo y son necesarias para la salud. Pero el proceso debe ser controlado, ya que pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas. Para ello, el organismo necesita una protección antioxidante (Halliwell, 1996).

El problema para nuestra salud y bienestar se establece cuando se produce un desequilibrio entre la ERO (las especies reactivas de oxígeno o prooxidantes) y

los antioxidantes. Por lo que el **estrés oxidativo** se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes a favor de la primeras (Sies, 1985; Halliwell, 2007). A través de esto, puede ocasionarse daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, daño en el ADN, etc. Los radicales libres tienden a reaccionar rápidamente con compuestos orgánicos para estabilizar su estructura electrónica, ocasionándoles una daño oxidativo, que a su vez puede provocar un efecto "dominó" (Harman, 1972, 1998; Gómez., 2002b) al participar en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades (cáncer, diabetes, cataratas, porfirias, patologías cardiovasculares, patologías broncopulmonares, procesos reumáticos, procesos neurodegenerativos...) y en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Davies *et al.*, 1982b; Pacifici & Davies, 1991; Durackova *et al.*, 1993) o el ejercicio físico agotador (Davies *et al.*, 1982a; Sastre *et al.*, 1992b).

### **1.5.2 CONCEPTO DE RADICAL LIBRE.**

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, lo cual confiere a estas especies una gran reactividad (Fridovich, 1978). Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida media es normalmente muy corta, alrededor de milisegundos, aunque varía en función del radical libre (Simic & Taylor, 1988).

Estas especies químicas abundan en los seres vivos. Es más, a los radicales libres se les ha propuesto como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta (Harman, 2001). La formación de cierta tasa de radicales es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. En condiciones normales, estas especies tan reactivas no causan daño oxidativo debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Además, se ha visto, que los radicales libres, a dosis moderadas, juegan un papel muy importante en la regulación de procesos de señalización celular (Dröge, 2002). Sin embargo, un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de sustancias antioxidantes o ambos factores a la vez, pueden llevar a una situación de estrés oxidativo (Sies, 1983), pudiendo producir así un daño oxidativo a biomoléculas, principalmente a lípidos, proteínas y ADN (Bokov *et al.*, 2004).

Existen gran cantidad de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del nitrógeno, o incluso radicales libres del azufre. A los radicales libres compuestos por oxígeno se les llama: especies reactivas de oxígeno (ERO) mientras que las especies derivadas del nitrógeno se les llama especies reactivas del nitrógeno (RNS).

<b>ESPECIE</b>	<b>SÍMBOLO</b>
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$
Radical hidropéroxido	$HO_2^{\cdot}$
Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$
Radical hidroxilo	$HO^{\cdot}$
Radical alcóxilo	$RO^{\cdot}$
Radical peróxido	$ROO^{\cdot}$
Óxido nítrico	$NO^{\cdot}$
Dióxido de nitrógeno	$NO_2^{\cdot}$

**Tabla 1.1** Principales especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

### **1.5.3 CLASES DE RADICALES LIBRES.**

Como se observa en la Tabla 1, existen gran variedad de radicales libres, tanto especies reactivas del oxígeno (ERO) como del nitrógeno (RNS). Gran parte de los radicales libres van a derivar del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), primer ERO en el curso de la vía univalente de reducción del oxígeno, (este anión es producido de forma fisiológica en pequeña cantidad en la mitocondria). Todos estos radicales son, por tanto, especies cuya formación es endógena (en el interior del organismo), pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas, como puede ser la dieta (compuestos de naturaleza prooxidante), el humo del tabaco, la polución, el ozono, etc. (Ames, 1983; Pryor *et al.*, 1995; Rock *et al.*, 1996). Las especies reactivas de oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman & Crapo, 1982b; Frei, 1994a) como veremos a continuación.

## **1.5.4 GÉNESIS DE RADICALES LIBRES**

### **1.5.4.1 FUENTES EXÓGENAS**

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

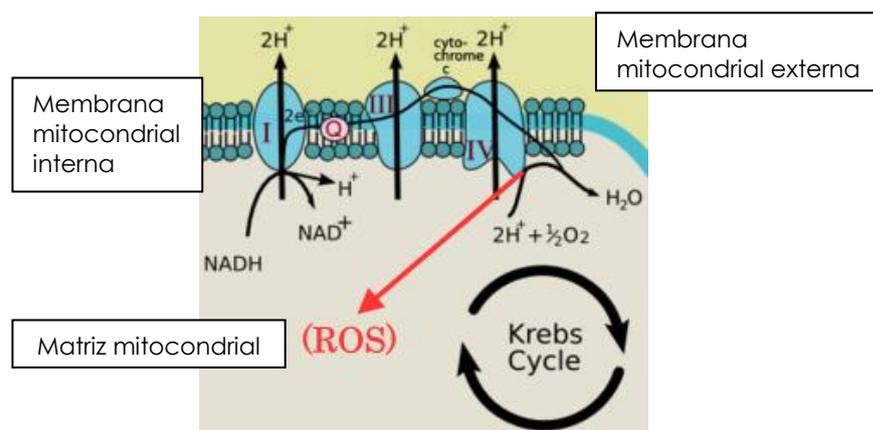
- Agentes antineoplásicos, tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov & Davies, 1983) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ) (von Sonntag, 1994).
- Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco (donde se generan óxidos del nitrógeno, produciendo por una parte un efecto oxidante y por otro lado reduciendo los niveles de los antioxidantes naturales), solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Trush *et al.*, 1982).
- Una mala alimentación: La "Dieta Mediterránea" es una dieta rica en nutrientes y no nutrientes antioxidantes, que contribuyen poderosamente a mejorar la dotación antioxidante del organismo y, por tanto, a evitar el estrés oxidativo (Tur, 2004).
- Infecciones: es conocido que las enfermedades infecciosas crónicas generan un 33% de los cánceres en el mundo (Gómez., 2002a), así las hepatitis B y C son las mayores responsables del carcinoma hepático.

### 1.5.4.2 FUENTES ENDÓGENAS GENERADORAS DE RADICALES LIBRES.

Esta vía incluye la cadena de transporte electrónico mitocondrial, la reacción de Fenton-Haber-Weiss, microsomas o peroxisomas, la membrana plasmática, enzimas solubles y proteínas, los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico, metabolismo del citocromo P450, así como la activación de células inflamatorias (Inoue *et al.*, 2004; Inoue, 2011).

#### 1.5.4.2.1 Cadena de transporte electrónico mitocondrial

La mitocondria es el orgánulo celular encargado de suministrar la energía para la actividad celular para lo que consume algunos compuestos orgánicos y oxígeno, actuando como centrales energéticas. Este orgánulo tiene gran importancia en el envejecimiento celular y como consecuencia en el envejecimiento de los organismos. La generación de energía en la mitocondria puede producir sustancias peligrosas para un organismo, los ROS y es la cadena de transporte electrónico mitocondrial una de la principales fuentes de estos radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en las que se ha descrito el hecho de que la mitocondria genera radicales libres (Vina *et al.*, 2003). (**Fig 1.19**).



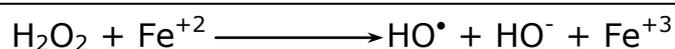
**Figura 1.19** Generación de ERO (ROS) en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. (<https://tallcute.wordpress.com/2008/01/21/enfermedades-asociadas-al-envejecimiento-iv-tapando-la-fuga-mitocondrial/>)

Entre las funciones que se realizan en la mitocondria cabe pues destacar la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la cadena de transporte electrónico.

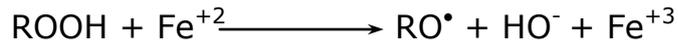
Esta fosforilación oxidativa es llevada a cabo por un complejo enzimático en el que se genera poder reductor, en forma de  $\text{FADH}_2^-$  y  $\text{NADH}$ , que se utiliza en la cadena respiratoria. Acoplado al transporte de los electrones por diferentes niveles redox y gracias a la energía liberada, tiene lugar la salida de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, lo que origina un gradiente electroquímico entre los dos compartimentos; ésto se traduce en una diferencia de pH de 1 unidad y en una diferencia de potencial eléctrico de 140 mV, lo que implica un incremento de energía libre ( $\Delta G$ ) de aproximadamente -5 kcal. Esta energía la utiliza la "ATP sintasa" (en el Complejo V de la membrana interna) para fosforilar moléculas de ADP, dando lugar a ATP, a la vez que los protones vuelven a la matriz a favor de un gradiente. Se calcula que entre el 2 y el 3 % de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas & Sies, 1985; Frei, 1994b). El funcionamiento correcto de todo este complejo enzimático es esencial para la vida de la célula, de manera que cualquier alteración de los enzimas que lo componen se puede traducir en la aparición de enfermedades degenerativas.

#### **1.5.4.2.2 La reacción de Fenton-Haber-Weiss**

Consiste en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por iones de metales de transición. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición (sobre todo ion ferroso,  $\text{Fe}^{+2}$ , y, en menor medida, el cuproso,  $\text{Cu}^+$ , y otros iones). Fenton descubrió a finales del siglo XIX (Fenton, 1894), que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezcla de peróxido de hidrógeno y  $\text{Fe}^{2+}$  (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el peróxido de hidrógeno se reduce formando radical hidroxilo y ion hidroxilo, y el metal correspondiente se oxida por cesión de un electrón a la especie que se reduce (Haber F., 1934). La representación de la reacción es la siguiente:



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El  $\text{Fe}^{+2}$  se oxida a  $\text{Fe}^{+3}$  con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell & Gutteridge, 1986). No obstante, el ion férrico puede a su vez, ser reducido por el ascorbato ( $\text{A}^{\bullet-}$ ) y por el radical superóxido (Frei, 1994a) con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



La reducción del agua oxigenada catalizada por los metales puede entenderse con las reacciones presentadas con anterioridad. Sin embargo, no está del todo claro cómo los iones metálicos son capaces de actuar como catalizadores redox en sistemas biológicos mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss. Los procesos de captación y distribución del hierro, y de los iones metálicos en general, están muy finamente regulados en los mamíferos. Contienen un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina...) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell, 1991; Rouault & Klausner, 1996).

#### **1.5.4.2.3 Microsomas o peroxisomas**

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris *et al.*, 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos (Freeman & Crapo, 1982a; Krinsky, 1994). Por otro lado, el citocromo P<sub>450</sub>

tiene un papel importante en los microsomas que detoxifican xenobióticos (Philpot, 1991).

#### **1.5.4.2.4 La membrana plasmática**

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio (Jones, 1994). Cabe destacar el papel de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White & Heckler, 1990).

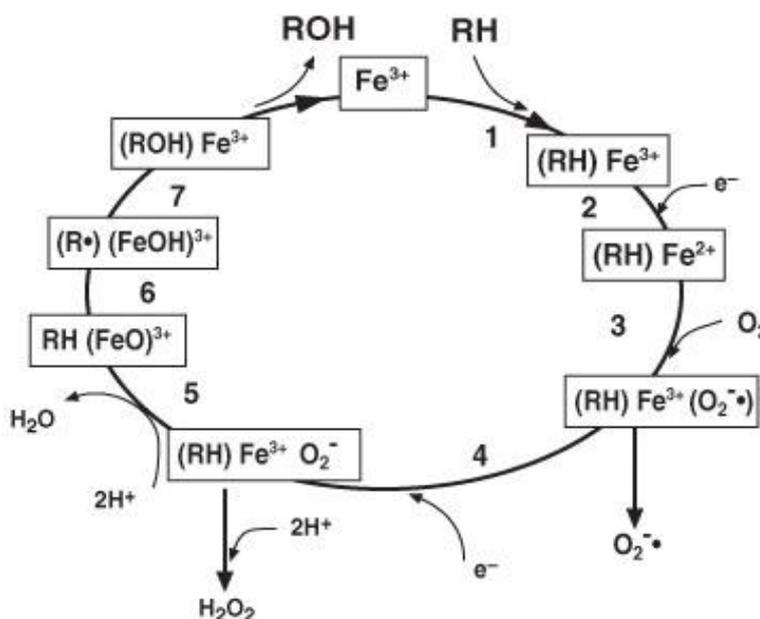
#### **1.5.4.2.5 Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico**

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P<sub>450</sub> y b<sub>5</sub>, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila *et al.*, 1981) y xenobióticos. Bajo la denominación de citocromos P<sub>450</sub> se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster & Estabrook, 1993).

#### **1.5.4.2.6 Metabolismo del citocromo P<sub>450</sub>**

Aunque la principal función del CYP (enzimas del Citocromo P<sub>450</sub>) es participar en reacciones de detoxificación transformando un compuesto farmacológicamente activo en inactivo excretado por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco

reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo (Orellana & Guajardo, 2004).



**Figura 1.20** Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo  $P_{450}$  (CYP) propuesto por Coon et al. En él, el  $Fe^{+3}$  representa al hierro del grupo hemo del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Ding et al., 1992)

## 1.6 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO A BIOMOLÉCULAS

### 1.6.1 DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos y, sobre todo, los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman & Slater, 1993), siendo el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ), el alcóxido ( $RO^{\cdot}$ ) y el alquílico ( $R^{\cdot}$ ) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos.

El proceso de ataque oxidativo a lípidos, denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell, 1994; Krinsky, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace

doble. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, se forma un radical alquílico ( $R'-CH^*$ ) y un peróxido lipídico ( $R-COOH$ ), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman & Crapo, 1982a; Halliwell & Auroma, 1991; Cheeseman & Slater, 1993). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Krinsky, 1994; Hohn *et al.*, 2013).

La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman, 1985) y se relaciona con diversos estados patológicos, tales como la inflamación, la arterioesclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Gueraud *et al.*, 2010). Además, el daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor clave en la disminución de la fluidez de dichas membranas (Shigenaga *et al.*, 1994) y está relacionado con la longevidad de las especies (Jové *et al.*, 2013).

### **1.6.2 DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS**

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, especialmente por el radical hidroxilo (Stadman E.R., 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina, la cisteína y la leucina son los que más procesos oxidativos sufren (Davies *et al.*, 1987; Hohn *et al.*, 2013).

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS
AD(P)H oxidasas/NAD(P)H/Fe(III)/ O <sub>2</sub>	Ascorbato/Fe(III)/O <sub>2</sub>
Xantina oxidasa/Hipoxantina/Fe(III)/ O <sub>2</sub>	RSH/Fe(III)/O <sub>2</sub>
Citocromo P450 reductasa/Citocromo P450/NADPH/Fe(III)/O <sub>2</sub>	Fe(II)/O <sub>2</sub>
Citocromo P450 Reductasa/redoxina	Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (reactivo de Fenton)
Citocromo P450/NADH/Fe(III)/O <sub>2</sub>	
Nicotinato hidroxilasa/NADPH/Fe(III)/O <sub>2</sub>	Ascorbato/Fe(III)/O <sub>2</sub>

**Tabla.1. 2** Resumen de los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas

Como consecuencia, la exposición proteica a los radicales libres puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína, produciendo así modificaciones en su estructura primaria, secundaria y, en última instancia, terciaria, lo cual, a su vez, puede dar lugar a una pérdida o modificación de su función biológica, que suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de dicha proteína (Dean *et al.*, 1993).

### 1.6.3 DAÑO OXIDATIVO A GLÚCIDOS

Los glúcidos reaccionan con facilidad con el radical hidroxilo. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini *et al.*, 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel *et al.*, 1998), dando lugar a

procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico, cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo cual conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald & Moy, 1980).

#### **1.6.4 DAÑO OXIDATIVO AL ADN**

El ADN también es susceptible de daño oxidativo, pudiendo así encontrar diversos subproductos tras dicho ataque oxidativo. Entre ellos, la oxidación de la 2-desoxiguanosina a 8-hidroxi 2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) es una de las lesiones más frecuentes, la cual reviste gran importancia por su elevado efecto mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones de purinas (Kasai & Nishimura, 1984; Shibutani *et al.*, 1992).

El daño oxidativo asociado a las proteínas y al ADN no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el ADN, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell & Auroma, 1991; Breen & Murphy, 1995). Por ello, las lesiones oxidativas en el ADN parecen estar implicadas, no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Viguie *et al.*, 1993). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, por lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Viguie *et al.*, 1993).

El ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter *et al.*, 1988), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN (Donald & Johns, 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Shen *et al.*, 1995; Suter & Richter, 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de

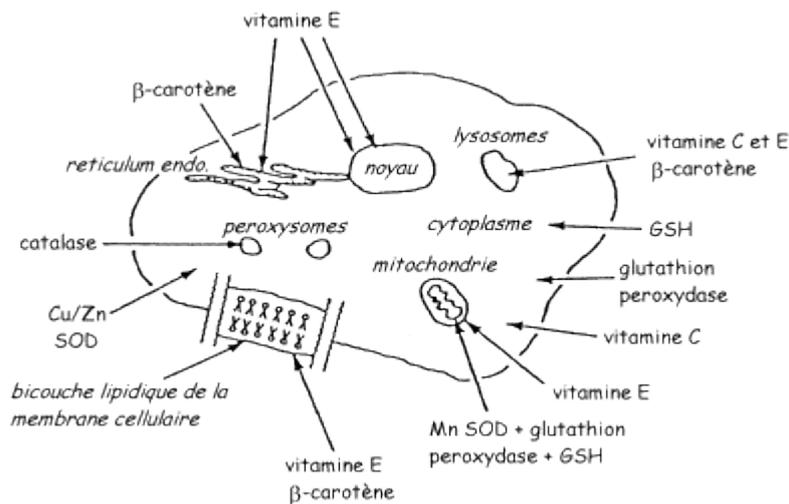
los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi & Davies, 1993). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de ADN codificante (Linnane *et al.*, 1989; Ames *et al.*, 1993) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

## **1.7 DEFENSA DEL ORGANISMO FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES**

Dado que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, la evolución ha ido dotando a estos organismos de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como **antioxidante** a "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Sies, 1993; Halliwell & Gutteridge, 1995) (**Fig 1.21**).

Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ERO.
- Interceptando el ataque de ERO.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ERO.
- Facilitando la reparación del daño causado por EROS y, por último
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.



**Figura 1.21** Antioxidantes en la célula (Machlin & Bendich, 1987)

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los *antioxidantes primarios* previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH<sup>-</sup> (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Los *antioxidantes secundarios* son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Los *antioxidantes terciarios* reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies *et al.*, 1987; Pacifi & Davies, 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de DNA, la metionina sulfóxido reductasa y la

fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian & Kim, 1985).

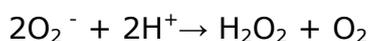
Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

### **1.7.1 REVISIÓN DE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN EL CUERPO HUMANO.**

#### **1.7.1.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.**

##### **1.7.1.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).**

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan & Fridovich, 1977). Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord & Fridovich, 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord *et al.*, 1974). Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja. Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas (Fridovich, 1974) según el grupo prostético metálico ligado al enzima (ver *Tabla 3*).

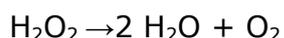


<i>ENZIMA</i>	<i>GRUPO PROSTÉTICO</i>	<i>LOCALIZACIÓN CELULAR</i>
Cu,Zn-SOD	Cu, Zn	Citosol y núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial y citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

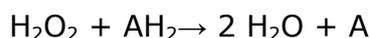
**Tabla 3.** Formas de la Superóxido dismutasa y su localización celular

### **1.7.1.1.2 Catalasa.**

La catalasa es una enzima que contiene porfirina y participa en la eliminación de peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance *et al.*, 1979). Se encuentra en el citoplasma de los eritrocitos, y en los peroxisomas de las otras células, si bien en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y en el citosol (Rodríguez *et al.*, 2000).



También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Chance *et al.*, 1979).



### **1.7.1.1.3 Glutación peroxidasa (GPx).**

La glutación peroxidasa (GPx) es también un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance *et al.*, 1979).

Hay dos tipos de glutación peroxidasa, y ambas requieren glutación reducido como dador de equivalentes reductores: *Glutación peroxidasa selenio dependiente*: es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986), además de intervenir en otros procesos como eliminación de xenobióticos (Sohn *et al.*, 1999). Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom *et al.*, 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).

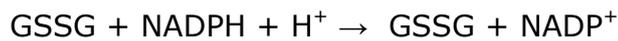


La *Glutación peroxidasa no selenio dependiente*: sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos. La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se

encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

#### **1.7.1.1.4 Glutación reductasa (GR)**

La Glutación reductasa (GR): Cataliza la reducción de GSSG a GSH utilizando NADPH como elemento reductor.



El sistema antioxidante glutación peroxidasa/reductasa está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el superóxido dismutasa/catalasa. Los dos sistemas, en condiciones normales no actúan a la vez, de tal manera que el sistema de la glutación peroxidasa se activa cuando los niveles de especies reactivas de oxígeno (en especial peróxido de hidrógeno) son comparativamente más bajos. La reducción de la glutación no es la única función de la glutación reductasa, las concentraciones intracelulares adecuadas de glutación reducido permiten también la recuperación de ácido ascórbico (Vitamina C), alfa tocoferol (Vitamina E) así como la eliminación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y el transporte de cisteína, la participación en la producción de mediadores derivados del ácido araquidónico, la síntesis de nucleótidos etc.

Los descensos o ausencia de actividad de este complejo enzimático tienen un claro efecto negativo en el balance de óxido-reducción celular, de modo que trastornos en el mismo se han relacionado con enfermedades tan diversas como obesidad, úlcera péptica, enfermedad de Parkinson, isquemia/repercusión, envejecimiento prematuro...

#### **1.7.1.1.5 Glutación transferasa (GST)**

Las glutación S-transferasas (GST) catalizan la adición del glutación a sustancias tanto endógenas como exógenas con grupos funcionales electrofílicos. Juegan un importante papel en funciones de detoxificación y en el metabolismo de numerosas sustancias ya que la unión del glutación a otras moléculas incrementa su hidrosolubilidad haciendo que sea más fácil degradarlos enzimáticamente.

Dentro del espectro de sustancias eliminadas por las GST se encuentran carcinógenos químicos, contaminantes atmosféricos, agentes antineoplásicos etc, pero además inactivan aldehidos insaturados, quinonas, epóxidos, e hidroperóxidos formados como metabolitos secundarios en situaciones de estrés oxidativo. También están implicadas en la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona y progesterona, así como en la degradación de la tirosina.

Las GST humanas muestran polimorfismos genéticos cuya variabilidad aumenta la susceptibilidad de padecer neoplasias y enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, se han relacionado con la alteraciones de la función pulmonar, aumento del riesgo de padecer infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares.

### **1.7.1.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS**

#### **1.7.1.2.1 Vitamina C**

En la actualidad, es considerada como uno de los más potentes antioxidantes naturales. Es el antioxidante exógeno más abundante encontrado en plasma y fluidos intersticiales, protegiendo de la peroxidación lipídica en el plasma (Frei *et al.*, 1988). Es hidrosoluble y efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. Estas especies reactivas de oxígeno son reducidas a agua, mientras que las formas oxidadas del ascorbato son relativamente estables y no reactivas, por lo que no causan daño celular.

En el interior de las células, la vitamina C refuerza la acción de la Vitamina E y del GSH (Glutación reducido), regenerando sus formas activas, después de que hayan reaccionado contra las especies reactivas de oxígeno (Ashton *et al.*, 1999; Knez *et al.*, 2006).

#### **1.7.1.2.2 Vitamina E**

Llamada también tocoferol, esta vitamina liposoluble es esencial para el organismo como antioxidante que ayuda a proteger los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, frente a la peroxidación lipídica, manteniendo la estabilidad de dicha membrana (Fuchs *et al.*, 2003). La Vitamina

E secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo. Este último puede ser reducido por el ascorbato y el glutatión oxidado a la respectiva quinona.

Evita la destrucción anormal de glóbulos rojos así como los trastornos oculares.

Está constituida por 8 diferentes isoformas conocidas como tocoferoles y tocotrienoles, siendo el alfa-tocoferol la más activa y abundante.

#### **1.7.1.2.3 Carotenoides**

Son colorantes naturales con pronunciada actividad antioxidante (Sies & Stahl, 1995). La propiedad química que les da este carácter antioxidante se basa en un extendido sistema de dobles enlaces conjugados.

Los principales ERO sobre los que actúan los carotenoides son el oxígeno singlete y los radicales peroxilos (Palozza *et al.*, 1997). La energía de excitación del carotenoide se disipa a través de interacciones vibracionales con el solvente, para recobrar su estado anterior. Así, el carotenoide acaba intacto y listo para otro ciclo de activación. También se ha descrito su papel en el secuestro de radicales peroxilos por interacción química (Kennedy & Liebler, 1992). Se ha sugerido la formación de un radical caroteno intermediario en este proceso que finalmente da lugar a la destrucción de la molécula.

Al igual que la vitamina E, los carotenoides pertenecen a un conjunto de antioxidantes lipofílicos presentes en lipoproteínas como la LDL o HDL. Los carotenoides se pueden encontrar en una gran variedad de frutas y vegetales. Los procesos de absorción y transporte de los carotenoides son bastante complejos. Influyen muchos factores como la coingestión con fibra o grasas o el cocinado de los alimentos entre otros (Erdman *et al.*, 1993).

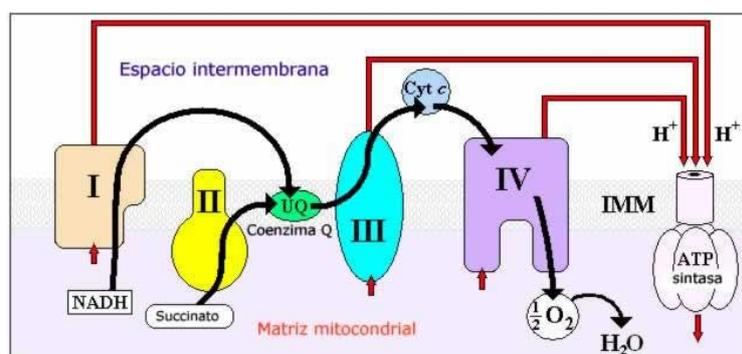
El suplemento en la dieta de cantidades moderadas de  $\beta$ -carotenos en individuos sanos parece seguro.

#### **1.7.1.2.4 Ubiquinonas**

Esta molécula se denomina también Coenzima Q y es producida por prácticamente todos los organismos con metabolismo respiratorio. Es una

benzoquinona liposoluble presente en la mayoría de las células eucarióticas, principalmente en las mitocondrias y, al ser un lípido, se encuentra distribuida en todas las membranas celulares llevando a cabo diversas funciones relacionadas con su capacidad redox, entre las que cabe destacar su papel como transportador de electrones en la cadena de transporte electrónico ya que transporta en la membrana interna mitocondrial electrones desde el complejo I (NADH-reductasa) o el complejo II (succinato deshidrogenasa) hasta el complejo III (coenzima Q - citocromo c reductasa) o también como aceptor de electrones de la "acetil-coenzima A deshidrogenasa" implicada en la beta-oxidación de ácidos grasos. También se ha demostrado su participación en la actividad de enzimas desacoplantes y en la apertura del poro mitocondrial y, por tanto, la regulación de la apoptosis. En otras membranas muestra una función antioxidante, bien forma directa contra la formación de lipoperóxidos o de forma indirecta a través del reciclado de otros antioxidantes lipídicos como la vitamina E, o hidrosolubles como la vitamina C o ácido ascórbico.

Los diversos tipos de coenzimas Q pueden diferenciarse por el número de isoprenos que posee su cadena lateral. En la naturaleza se encuentran organismos con 6 unidades de isopreno (*Saccharomyces cerevisiae*), 8 (*Escherichia coli*) o 9 (*Caenorhabditis elegans*), o una combinación de 9 y 10 (*Mus musculus*). La forma de CoQ más común en humanos es la CoQ10, aunque también se pueden encontrar pequeñas trazas de Q9. La "Q" se refiere al grupo químico quinona, y el 10 al número de subunidades isoprenoides que tiene (Kishi *et al.*, 1977). (**Fig. 1.22**).



**Figura 1.22** Cadena de transporte electrónico en las mitocondrias

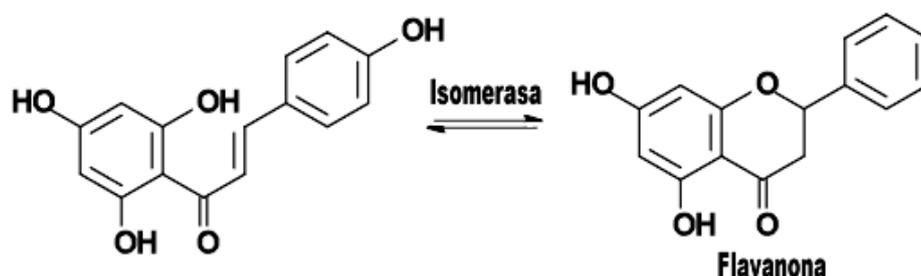
### 1.7.1.2.5 Flavonoides.

Son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se pueden encontrar en forma de O-glicósidos principalmente en muchas frutas, vegetales y bebidas como el té, el vino y la cerveza principalmente como O-glicósidos. Son eficaces antioxidantes capaces de reaccionar con radicales como los radicales peroxilos, el radical hidroxilo y el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, formando el radical fenoxi (Rice-Evans *et al.*, 1995; Rice-Evans & Miller, 1996). En este grupo se incluyen distintos subgrupos como los flavanoles (catequinas, epicatequinas), flavonoles (quercetina, miricetina, caemferol), flavanonas (naringenina, taxifolina), flavonas (apigenina, hesperetina), isoflavonas (genisteína), o antocianidinas (cianidina, malvidina).

Son muchas las propiedades que se les atribuye a los flavonoides a la hora de interactuar con radicales libres. Estas incluyen la presencia de una estructura 3',4'-hidroxi en el anillo B, la presencia de un doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo en el anillo C, y la presencia de un grupo 5-hidroxilo en el anillo A con un grupo 3-hidroxilo y una función 4-oxo en el anillo C. (**Fig. 1.23**)

Varios estudios *in vivo* como *in vitro* demuestran las propiedades antioxidantes de estos compuestos, sin embargo su biodisponibilidad es bastante pobre.

Como en el caso de los carotenoides, no se conoce muy bien cuál es la distribución en los tejidos de estos compuestos y su absorción en humanos.



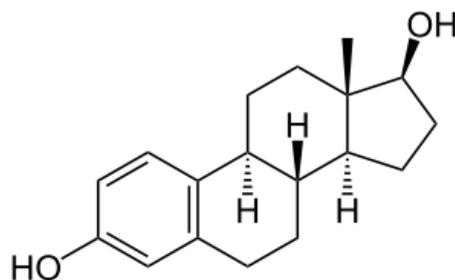
**Figura 1.23** Estructura base de un flavonoide

### 1.7.1.2.6 Estrógenos

Las acciones de los estrógenos incluyen diferentes mecanismos: tales como efectos genómicos asociados a receptores de estrógenos (ER), efectos no

genómicos que involucran sistemas de segundos mensajeros y vías de proteínas kinasas y efectos antioxidantes independientes de recepto (Behl *et al.*, 1997). De hecho, debido a su estructura fenólica y su papel protector frente a la peroxidación de membrana fosfolipídica, se ha calificado a los estrógenos como antioxidantes naturales (Sugioka *et al.*, 1987; Subbiah *et al.*, 1993).

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17 $\beta$ -estradiol, seguido por la estrona y el estriol. Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo  $\beta$ -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de **estrógenos** (Wawrzak *et al.*, 1988; Jordan, 1998). (**Fig 1. 24**)



**Figura 1.24** Estructura básica de una molécula de 17  $\beta$  -estradiol

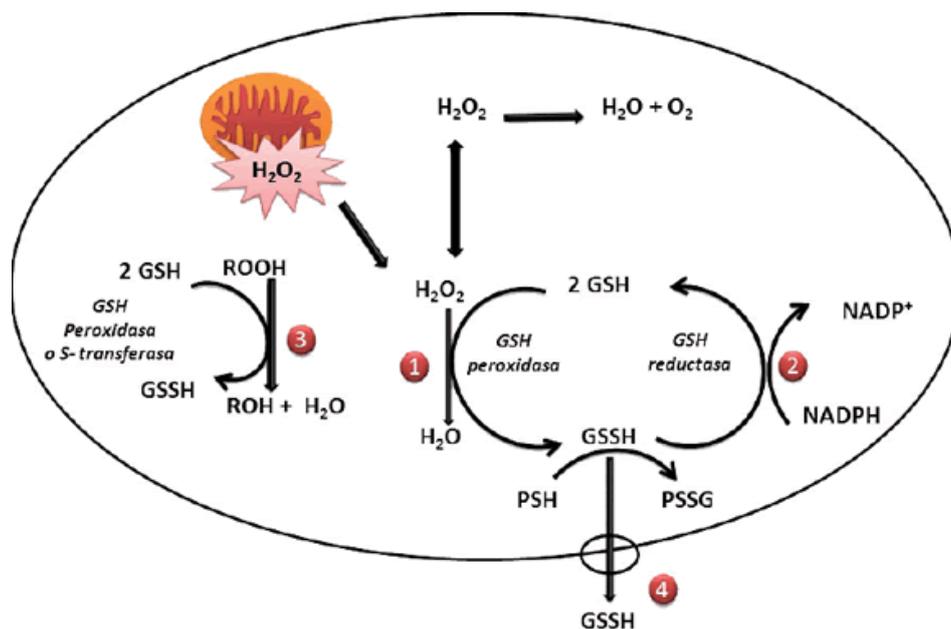
#### **1.7.1.2.7 Estilbenos.**

Esta familia de polifenoles naturales incluye a los derivados hidroxil- y metoxil- del estilbeno simple, así como sus formas glicósido y polímeros. Se encuentran en muchas plantas superiores. Entre los más destacados podemos encontrar el resveratrol, uno de los polifenoles del vino más estudiado, sus concentraciones puede variar entre 0,003 y 3,0  $\mu$ M en vino tinto. El resveratrol es un polifenol natural que se encuentra ,además, en muchas plantas y frutas, como los cacahuetes, moras, arándanos. Su síntesis está regulada por la presencia de factores de estrés como la contaminación por hongos y la radiación ultravioleta. (Baur *et al.*, 2006; Gambini *et al.*, 2013).

### 1.7.1.2.8 Glutati3n.

Es el tiol no proteico m3s abundante en las c3lulas de mam3feros. Fue descubierto por Hopkins en 1921 (Hopkins, 1921) y est3 constituido por 3 amino3cidos: 3cido glut3mico, ciste3na y glicina. Su estructura le confiere ciertas caracter3sticas que hacen que el glutati3n tenga una funcionalidad amplia e importante en la c3lula.

Se puede encontrar en 2 formas seg3n su estado de 3xido-reducci3n: como GSH o glutati3n reducido, o como GSSG o glutati3n oxidado (que est3 compuesto por 2 mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las ciste3nas). El GSH desempe3a numerosas e importantes funciones metab3licas: una de ellas es la de proteger a la c3lula frente al ataque oxidativo; ya sea por radicales libres, per3xidos u otros agentes nocivos como las radiaciones.



**Figura 1 25** Funci3n antioxidante de GSH. **1)** El per3xido de hidr3geno formado por el metabolismo aer3bico es metabolizado por la enzima "GSH peroxidasa" formando GSSG. **2)** El GSSG formado en la reacci3n anterior es reducido por la enzima "GSH reductasa" utilizando  $NADPH$  como cofactor. **3)** Los per3xidos org3nicos formados pueden ser reducidos por GSH peroxidasa. **4)** El GSSG formado durante el estr3s oxi-dativo que no puede ser reducido a GSH es exportado de la c3lula para mantener el equilibrio redox. (Vulcano et al., 2013).

El per3xido de hidr3geno formado durante el metabolismo aer3bico es metabolizado formando GSSG. La reacci3n ocurre por la acci3n de la enzima

Glutati6n Peroxidasa, tanto en el citosol como en la mitocondria y tambi6n por la enzima Catalasa que est6 ausente en la mitocondria. El GSSG formado luego es reducido para formar nuevamente GSH por acci6n de la enzima GSH reductasa usando NADPH, formando as6 un ciclo de 6xido-reducci6n. Los per6xidos org6nicos (ROOH) pueden ser reducidos por dos enzimas, la glutati6n peroxidasa o la enzima GSHS-transferasa. En condiciones de estr6s oxidativo severo, la habilidad de la c6lula para reducir GSSG a GSH se encuentra superada, tendiendo entonces a la acumulaci6n de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, GSSG es activamente transportado fuera de la c6lula o bien reacciona con los sulfidrilos de las prote6nas para formar disulfuros mixtos (PSSH) (Vulcano *et al.*, 2013) (**Fig 1.25**).

El GSH es el mayor determinante del potencial re-dox intracelular. Tanto la concentraci6n de GSH como la relaci6n molar GSH/GSSG contribuyen a mantener el balance redox dentro de la c6lula. Este equilibrio redox regula diversos procesos metab6licos intracelulares que incluyen la actividad enzim6tica, el transporte celular, transducci6n de se6ales y la expresi6n g6nica mediada por la transcripci6n de factores entre los que se destacan el activador de prote6na (AP-1), el factor nuclear Kappa-B (NF- kB) y el p53 (Sastre *et al.*, 2005; Vulcano *et al.*, 2013).

### **1.7.2 PRINCIPALES BIOINDICADORES DE ESTR6S OXIDATIVO, DETERMINADOS POR HPLC.**

Como se ha podido observar, el estr6s oxidativo es de gran importancia para las c6lulas y el organismo por el da6o que 6ste puede causar. Debido a 6sto, se han intentado encontrar indicadores que determinen el da6o que este estr6s oxidativo puede causar a nivel general (citosol) o en particular a nivel de l6pidos, DNA o prote6nas. Los principales indicadores son: el cociente GSSG/GSH para determinar el da6o en el citosol, MDA como indicador de da6o a los l6pidos, el 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina como 6ndice de da6o oxidativo al DNA y los grupos carbonilos como un indicador de da6o oxidativo a prote6nas (Hageman *et al.*, 1992). En la presente tesis se detallar6n con mayor hincapi6 los 2 primeros, puesto que, mediante su determinaci6n por HPLC, son el objeto de estudio de la misma.

### **1.7.2.1 COCIENTE GSSG/GSH. GLUTATIÓN REDUCIDO Y GLUTATIÓN OXIDADO.**

El glutatión ( $\gamma$ -glutamil cisteinil glicina) es indicador de daño oxidativo en el citosol. El glutatión es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, relacionadas principalmente con la protección antioxidante de las células (Viña, 1990).

Su acción antioxidante se debe al grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión es capaz de ejercer su papel protector sólo cuando se presenta en su forma reducida (GSH). La forma oxidada del glutatión se presenta cuando dos moléculas de GSH se oxidan (por presencia de agentes oxidantes o por autooxidación) cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí, dando lugar a la forma disulfuro (GSSG).

Un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986). Sin embargo, existen problemas metodológicos importantes en la determinación correcta del GSSG. En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son de dos a tres órdenes de magnitud mayores que los de GSSG (Kosower & Kosower, 1978). Además, el GSH se autooxida con facilidad a GSSG, sobre todo a pH neutro (Vina *et al.*, 1978; Asensi *et al.*, 1994a). Ésto hace que una pequeña oxidación del GSH suponga un aumento muy importante del GSSG, con el consiguiente error al determinar el índice GSSG/GSH. El modo de evitar la autooxidación del GSH es bloqueando el grupo tiol del GSH con N-etilmaleimida inmediatamente después de la extracción. Ello permite evitar las oxidaciones producidas por la manipulación de la muestra previa al análisis del GSSG por High-performance liquid chromatography (HPLC) (Asensi *et al.*, 1994a).

### **1.7.2.2 MALONDIALDEHIDO, EL 4-HIDROXINONENAL E ISOPROSTANOS.**

El MDA es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, un aumento de su rigidez (Shigenaga *et al.*, 1994). Por ello, es un índice

ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares. Junto con el 4-hidroxi-2,3-nonenal son los dos más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano.

Se han descrito varios métodos para la determinación de MDA (Bird & Draper, 1984; Esterbauer *et al.*, 1991). La mayoría son poco específicos, ya que utilizan el ácido tiobarbitúrico como reactivo y éste reacciona con todos los aldehídos de la muestra. Estos métodos se han mejorado gracias a la separación, por cromatografía líquida de alta resolución, del aducto malondialdehído- ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que puedan interferir en la determinación (Knight *et al.*, 1988).

En la presente tesis se ha medido el MDA ya que numerosos estudios revelan su incremento con el envejecimiento y en situaciones fisiopatológicas (Lepage *et al.*, 1991; Fukunaga *et al.*, 1995; Inal *et al.*, 2001; Sverko *et al.*, 2002; Mutlu-Turkoglu *et al.*, 2003).

## **1.8 SALUD Y ESTRÉS OXIDATIVO: IMPLICACIÓN DEL ESTADO REDOX CON DIVERSAS SITUACIONES FISIOLÓGICAS Y/O PATOLÓGICAS DEL ORGANISMO.**

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos (Maxwell, 1995). Los principales antecedentes surgen de estudios que muestran la correlación entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre (Sohal & Weindruch, 1996). La relación entre la presencia de algunas enfermedades, como las cardiovasculares y cáncer entre otras, se puede establecer con la elevación de marcadores de daño oxidativo y disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes, los que pueden ser modificados al aumentar la ingesta de antioxidantes (Laurin *et al.*, 2001; Meydani, 2001). Por ejemplo, el plasma puede estabilizar especies reactivas del oxígeno de vida media mayor, como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno, previniendo reacciones con iones metálicos catalíticos que pueden generar especies aún más nocivas (Halliwell & Gutteridge, 1989). Debido a esto,

el estatus antioxidante del plasma es el resultado concomitante de muchos compuestos e interacciones metabólicas sistémicas.

La medición de esta capacidad antioxidante reflejada como los niveles de bioindicadores de estrés oxidativo en sangre y en diversos órganos, es relevante para la determinación individual del estado redox presente en un organismo dado. Generalmente se investiga su efecto en el estatus antioxidante plasmático de voluntarios sanos sometidos a la ingestión de éstos.

Dado el interés de esta tesis por el estudio del estado redox en diferentes situaciones fisiopatológicas, tanto en humanos como en animales de laboratorio, detallaré especialmente algunos de estos casos.

### **1.8.1 CONDICIONANTES QUE PUEDEN MEJORAR LA SITUACIÓN FISIOLÓGICA DEL ORGANISMO:**

#### **1.8.1.1 LA PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA**

La mayor parte de las enfermedades que padece el hombre en la actualidad, tienen como base una inadecuada alimentación. Las enfermedades crónicas no transmisibles que representan en el mundo desarrollado las principales causas de muerte tienen una gran relación con deficiencias nutricionales (Avello & Suwalsky, 2006; Zamora, 2007).

Desde que en el mundo desarrollado predominan las enfermedades crónicas o no transmisibles entre ellas las cardiovasculares y diversos tipos de cáncer como las dos primeras causas de muerte, han sido muchos los factores de riesgo que se han asociado con su desarrollo, considerándose entre una de las principales causas la acción de las sustancias oxidantes en su patogénesis (Furukawa *et al.*, 2004), por lo cual deficiencias significativas de vitaminas antioxidantes y minerales en la alimentación del ser humano representa uno de los factores más fuertemente relacionado con el incremento de una mayor actividad degenerativa que tienen las sustancias oxidantes en las diferentes células y tejidos (Herberg *et al.*, 2004). Como ejemplo, es sabido que el riesgo de enfermedades cardiovasculares se incrementa con la edad, siendo la dieta un importante factor de riesgo modificable que puede interactuar con especies reactivas de oxígeno (ERO) y marcadores antiinflamatorios (Lennon-Edwards *et al.*, 2014).

Sirvan como ejemplo, los fitoestrógenos, a los que se les han atribuido funciones antioxidantes ya que se ha visto que las isoflavonas de soja eran capaces de reducir el estrés oxidativo y mejorar parámetros relacionados con el envejecimiento. Por ejemplo, según un estudio *in vivo*, el consumo de soja podría reducir los niveles MDA e incrementar la capacidad antioxidantes en plasma de mujeres menopáusicas (Azadbakht *et al.*, 2007).

Así mismo, el papel beneficioso de estas sustancias sobre parámetros de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes se ha demostrado previamente por nuestro grupo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Borrás C, 2006): **Fig 1.26**



FITOESTRÓGENOS EN MUY BAJAS CONCENTRACIONES ACTÚAN COMO ANTIOXIDANTES YA QUE INDUCEN LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES.

**Fig 1.26. Mecanismo de sobre-expresión de genes antioxidantes por fitoestrógenos**

### **1.8.1.2 EJERCICIO FÍSICO MODERADO**

Como "ejercicio físico" se considera la actividad física, generalmente no competitiva ni reglada, que se realiza con objeto de obtener desarrollo físico y/o psíquico armónico, como actividad educativa, como juego, para mantener la salud o con fines terapéuticos. Consideramos deporte a cualquier actividad física competitiva, reglamentada por normas institucionales, realizada en público, profesionalizada, y que tiene como objetivo principal ganar al adversario y obtener una recompensa (Ortega *et al.*, 1999).

Los efectos beneficiosos del ejercicio físico regular (no agotador) se conocen desde hace mucho tiempo. En las últimas décadas, el ejercicio físico se ha utilizado en el tratamiento de diversas patologías (Pedersen & Saltin, 2006). Alguno de estos ejemplos podrían ser el tratamiento del síndrome metabólico, patología pulmonar y cardiovascular, patología muscular y ósea, cáncer, depresión, asma o diabetes tipo II (Oldridge, 2003; Roberts & Barnard, 2005).

Existen dudas acerca ya no de la cantidad óptima (frecuencia, duración) sino de la intensidad (moderada o agotadora) del ejercicio físico para obtener efectos beneficiosos sobre la salud. A grandes rasgos se considera que, si se realiza ejercicio físico de baja intensidad tal como la jardinería o las "caminatas" (2-4 METs, un MET equivale a un consumo de oxígeno, en un adulto, de aproximadamente 3,5 mL por kg de peso y por minuto o 1 kcal por kg y por hora), éstos deben ser mantenidos durante periodos de tiempo largos (60 minutos al día) la mayoría de los días de la semana; mientras que en el caso de ejercicios de alta intensidad, tales como la carrera o natación (6-8 METs) es suficiente con mantenerlos 30 minutos al día durante, al menos, 3 días a la semana (Warburton *et al.*, 2006). Las características individuales de los sujetos que inician un programa de entrenamiento también son un factor relevante.

Diversos autores han demostrado que el ejercicio físico moderado en roedores puede aumentar la vida media en un 9% aproximadamente. Sin embargo, los efectos de este tipo de ejercicio sobre la vida máxima son, actualmente, objeto de debate (Holloszy, 1998; Navarro *et al.*, 2004). Por otro lado, estudios realizados en ratas han demostrado que la combinación de ejercicio voluntario y

restricción calórica tiene un mayor efecto sobre la esperanza de vida máxima que el ejercicio físico como única variable (Holloszy, 1992).

## **1.8.2 SITUACIONES CON ALTO COMPONENTE DE ESTRÉS OXIDATIVO:**

### **1.8.2.1 DIABETES**

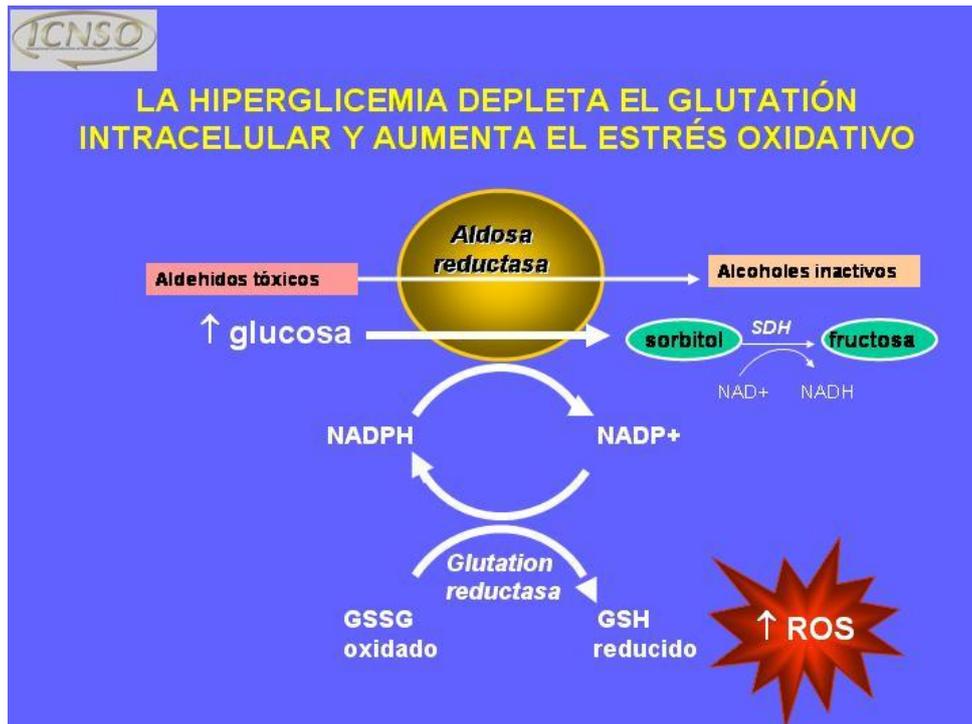
La diabetes mellitus constituye con diferencia la principal patología que afecta al páncreas endocrino. Es un síndrome orgánico multisistémico que tiene como característica el aumento de los niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia, atribuible a defectos en la secreción de insulina, en su acción o ambos. Se trata de una enfermedad compleja en la que coexiste un trastorno global del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas. Es multifactorial por la existencia de múltiples factores implicados en su patogénesis. Se calcula una prevalencia estimada en la población adulta del 7,4 % con un valor esperado de alrededor del 9% para el 2025. Aunque existen varios tipos de diabetes, la mayoría de casos corresponden a dos clases principales: la diabetes mellitus (DM) tipo 1 y diabetes mellitus tipo 2.

La DM tipo 1 se caracteriza por una destrucción masiva de las células del páncreas, de manera que la secreción de insulina es nula o insignificante (en un diagnóstico precoz la secreción puede estar sólo disminuida).

En la DM tipo 2, la deficiencia de insulina no es tan marcada y el trastorno principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la hormona.

Independientemente del tipo de diabetes mellitus, un mal control de los niveles de glucosa en la sangre propicia el desarrollo de complicaciones secundarias como cetoacidosis, macro y microangiopatías, arteriosclerosis, neuropatías, retinopatías, hepatopatías y neuropatías (Tresguerres, 2010).

En el estudio de las causas implicadas en la aparición de esta patología se ha demostrado que altos valores de glicemia conducen a un estrés oxidativo. Ésto se debe a que la glucosa se autooxida y da lugar a la formación de alfacetoaldehidos, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical superóxido ( $O_2$ ), entre otras especies reactivas del oxígeno (ERO) (Dam *et al.*, 1996; Sonia Clapés *et al.*, 2001). **Fig 1.27**



**Figura 1.27** La hiperglicemia depleta el glutatión intracelular y aumenta el estrés oxidativo ([www.nutriotal.com.br/icnso/aulas/....bu&categoria=49](http://www.nutriotal.com.br/icnso/aulas/....bu&categoria=49))

### 1.8.2.2 ENFERMEDAD RENAL.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo está involucrado en varios estados patológicos como enfermedades cardiovasculares, infecciosas, cáncer, diabetes y trastornos neurodegenerativos (Roselaar *et al.*, 1995; Hasselwander & Young, 1998). Estas enfermedades tienen mayor incidencia en la uremia y en particular en los pacientes sometidos a diálisis. Esto podría constituir una evidencia que apunta hacia la probable existencia de un aumento de la exposición a estrés oxidativo en el curso de un deterioro renal crónico (Bernabeu *et al.*, 2004).

El desplazamiento del equilibrio redox hacia la producción de ERO y otras toxinas urémicas de naturaleza oxidante, en relación con la capacidad de defensa antioxidante, está favorecido en el paciente con un fallo en la función renal por varios factores. Uno es que el paciente sometido a hemodiálisis por lo general está malnutrido, por lo que cuenta con reservas deficientes en vitaminas y minerales que tienen una importancia capital en los mecanismos de defensa antioxidante.

El cúmulo de evidencias fisiopatológicas que vinculan al tratamiento dialítico con el estrés oxidativo ha inclinado a los investigadores a analizar el empleo de antioxidantes como parte del tratamiento de esta enfermedad (Vela *et al.*, 2000; Bernabeu *et al.*, 2004). Así, las nuevas estrategias de diálisis usan un enfoque antioxidante para garantizar una mayor protección ante el efecto prooxidante del procedimiento.

### **1.8.2.3 FRAGILIDAD Y ENVEJECIMIENTO.**

Es una evidencia que el proceso de envejecimiento entre los seres humano no se produce al mismo ritmo. De hecho, a menudo, edad cronológica y biológica no se correlacionan (Mitnitski, 2002), de tal manera que individuos de la misma edad cronológica pueden variar mucho en su estado funcional y de salud. En un intento por explicar esta heterogeneidad en la manera de envejecer y de encontrar términos con los cuales identificar aquellos individuos con una capacidad funcional reducida y, por tanto, el aumento de la probabilidad de dependencia, surgen los conceptos de "fragilidad" y "anciano frágil". Etimológicamente, el término frágil proviene del francés "*frêle*", que significa "poco resistente", y del latín "*fragilis*", que significa "que se rompe con facilidad".

La mayoría de las definiciones para el concepto de "fragilidad" en el ser humano, destacan el deterioro de múltiples sistemas y un aumento de la vulnerabilidad. No se trata de un fenómeno de "todo o nada" sino que incluyen un gradiente (Rockwood *et al.*, 2005). La fragilidad es un síndrome geriátrico dinámico que no afecta a todos los ancianos por igual, además de ser un proceso susceptible a intervenciones activas como "vida activa", programas de ejercicio, etc. (Bortz, 2002). Su definición como su evaluación siguen en fase de revisión. No obstante, a día de hoy, los cinco criterios establecidos por L. Fried en el 2001 son los más aceptados (Fried *et al.*, 2001). Según este artículo, se define la fragilidad como "*un estado fisiológico caracterizado por un aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas, como resultado de una disminución de las reservas fisiológicas de múltiples sistemas, lo cual origina dificultades para mantener la homeostasis*" (Fried *et al.*, 2001).

El interés por este síndrome ha aumentado durante la última década debido a que la fragilidad ha llegado a ser el principal factor de riesgo para la discapacidad

en la personas mayores y en predecir otros factores adversos (Ensrud *et al.*, 2009).

El proceso de envejecimiento lleva consigo un deterioro progresivo de los diversos sistemas fisiológicos, con el consiguiente descenso en la capacidad homeostática del individuo (Harman, 2001). Los complejos mecanismos que intervienen en dicho proceso vienen determinados por una combinación de factores ambientales, genéticos y epigenéticos, los cuales regulan la expresión genética diferencial en las células y podrían ser especialmente importantes durante el desarrollo de la fragilidad (Clegg *et al.*, 2013).

Dado que el aumento de la longevidad no está siempre relacionado con el incremento en la calidad de vida (Marin *et al.*, 2010). Una de las preocupaciones de los principales precursores de la salud es si la creciente longevidad aumentará la discapacidad y los costes de salud (Fries, 1980). Por lo tanto, la maximización de la salud y el intento de prevenir la disfunción son, al menos, tan importantes como la ampliación de la vida útil (Kirkland & Peterson, 2009).

La búsqueda de biomarcadores de fragilidad es un campo todavía por explorar, pero muy interesante si realmente se consiguiera encontrar en un futuro un marcador biológico (o varios) que fuera lo suficientemente sensible y específico como para identificar individuos frágiles que pudieran ser subsidiarios de intervenciones de prevención primaria. Por esta razón, en los últimos años existe un intento por determinar biomarcadores específicos relacionados con los mecanismos moleculares implicados en el deterioro fisiológico característico de la fragilidad, al igual que lo viene siendo en el campo de la investigación de biomarcadores para individuos de edad avanzada y con patologías graves.



## **OBJETIVOS**



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL.**

El objetivo principal de la presente tesis es determinar valores de referencia para los parámetros de estrés oxidativo: MDA, GSSG, GSH y (GSSG/GSH)% medidos por HPLC, en animales de experimentación (ratones) y en humanos, tanto sanos como en condiciones fisiopatológicas o en condiciones especiales.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Determinar unos valores medios de referencia basados en modelos animales saludables (ratones), para los parámetros de estrés oxidativo: MDA y Glutación (formas oxidada y reducida), medidos por HPLC.
2. Determinar unos valores medios de referencia, considerando diferentes situaciones patológicas así como situaciones especiales con modelos animales (ratones), para los parámetros de estrés oxidativo: MDA y Glutación (formas oxidada y reducida), medidos por HPLC.
3. Determinar unos valores medios de referencia en humanos sanos, durante las etapas infantil, juvenil y en adultos, para los parámetros de estrés oxidativo: MDA y Glutación (formas oxidada y reducida), medidos por HPLC.
4. Determinar unos valores medios de referencia, considerando diferentes situaciones patológicas en humanos así como situaciones especiales, para los parámetros de estrés oxidativo: MDA y Glutación (formas oxidada y reducida), medidos por HPLC.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 MATERIALES**

#### **3.1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN E INDIVIDUOS OBJETO DE ESTUDIO.**

- Estudio del efecto del ejercicio físico sobre la longevidad y la fragilidad en ratones: los protocolos experimentales de este apartado fueron realizados de acuerdo con el establecimiento en el Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 21 de Octubre 2005). El Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Valencia aprobó el procedimiento experimental necesario para llevarlo a cabo.

Este estudio se desarrolló con ratones C57BL/6J machos, genéticamente homogéneos, en condiciones estables y definidas, con el fin de reducir la variabilidad y aumentar la calidad de los resultados experimentales. Fueron comprados a Jackson Laboratory en el año 2008.

Se establecieron dos grupos experimentales (Grupo Sedentario y el Grupo Corredor) dividiendo al azar 144 ratones en dos grupos de 74 ratones macho en cada uno de los grupos. Todos los animales se estabularon individualmente en jaulas según la normativa vigente. Los ratones pertenecientes al grupo de corredores tenían acceso 24 horas al día a una rueda de 11.5 cm de diámetro, la cual estaba conectada a un sistema de recuento o medición del ejercicio, instalado en la parte superior de la jaula; mientras que los ratones del grupo sedentario sólo podían desplazarse por la jaula. Los sacrificios se llevaron a cabo a lo largo de la curva de longevidad en unos puntos concretos de su supervivencia: inicio, 90%, 50% y 10% de supervivencia.

- Estudio en ratones transgénicos de la cepa C57BL/6J para la enfermedad de Alzheimer: Los animales que utilizamos son los ratones doble transgénicos APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> para la EA (Jankowsky *et al.*, 2004) cuya cepa de origen es C57BL/6J. Los animales fueron comprados a los laboratorios Jackson (Estados Unidos), (<http://jaxmice.jax.org/strain/004462.html>) y criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Este animal tiene insertados 2 transgenes. Uno es un híbrido entre ratón y humano para la APP (Mo/HuAPP695swe) y engloba las mutaciones humanas "suecas" K595N/M596L. El otro es un alelo mutante para la PS1 humana (PS1-dE9) que es una delección para el exón 9. Ambos están vehiculados para que se expresen en el sistema nervioso central. Las dos mutaciones están asociadas al desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer de forma temprana en humanos.

Los ratones dispusieron de agua y comida ad libitum. El diseño de los experimentos fue presentado y aprobado por el comité de ética de la Universitat de València, con el código A134807222326.

- Estudio en ratones SAMP8 (envejecimiento acelerado) y SAMR1 (resistentes al envejecimiento): Se utilizaron ratones de las cepas SAMP8 (del inglés senescence prone mice) y SAMR1 (del inglés senescence resistant mice), cuyos progenitores procedían de la colonia del Animalario de la Universidad de Granada.

El total de animales utilizados fue de 64 ratones macho SAMR1 y 80 ratones macho SAMP8 de 2 y 10 meses de edad a la fecha del sacrificio.

Los animales mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. La luz estuvo regulada por ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (08:00-20:00 h). Las condiciones de temperatura fueron de 22°C y las de humedad del 50%. La ventilación en las instalaciones del animalario se realizó mediante extracción continuada.

Los animales se alojaron en grupos de 6-7 ratones en jaulas de policarbonato (MacrolonR, Panlab) de 46,5 x 21,5 x 14,5 cm. Tuvieron acceso a agua ad libitum en biberones y se alimentaron con una dieta estándar (A.04; Panlab, Barcelona, España).

En todos los procedimientos experimentales empleados en este estudio se siguieron los principios y prácticas establecidos por la Normativa de la Unión Europea 86/6091/EEC, publicada en España en RD 223/1988.

- Estudio de longevidad en ratones con y sin dieta especial a base de soja: Se emplearon ratones OF1 machos, mantenidos en el animalario de la

Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12/12 h) constantes. cumpliendo estrictamente los principios marcados por el Real Decreto 1201/2005 (BOE 21 de Octubre 2005) sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos, y siguiendo las recomendaciones de FELASA (Federación Europea de animales de laboratorio). Durante todo el experimento los ratones se controlaron diariamente, asimismo se registran su peso corporal y su consumo de comida semanalmente. No hubo restricción en el consumo de agua. El procedimiento experimental ha sido aprobado por "El Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Valencia" (A1282330236050).

Se emplearon un total de 157 ratones albinos machos de la cepa OF1. Se dividieron en dos grupos experimentales según la dieta, un grupo de 81 ratones alimentados con dieta sin soja y el otro de 76 ratones con dieta rica en soja. Las dos dietas empleadas fueron suministradas por Teklad Global Rodent Diets<sup>®</sup>, de la casa comercial Harlan Laboratories, con certificado ISO9001-2000.

- *Estudio con niños deportistas*: El grupo objeto de estudio fueron escolares y adolescentes deportistas, entre 10 y 15 años que realizaron sesiones de entrenamiento de ciclismo (al menos 2-3 días por semana), y competición durante el fin de semana. Se reclutaron del Club Ciclista de Almazora (Castellón) y del Club Ciclista de Onda (Castellón). A los niños incluidos se les realizaron las encuestas dietética y de conocimientos nutricionales, la exploración clínica y antropométrica y la extracción de una muestra de sangre *al inicio de la temporada de entrenamiento*. Previo a su realización se solicitó a los padres la firma del consentimiento informado y a los niños si son mayores de 12 años. El mismo procedimiento se repitió al final de la temporada de competición (6-8 meses después). El grupo control estuvo constituido por escolares y adolescentes de edades similares al grupo de estudio que realizaban la práctica deportiva escolar obligatoria y ninguna otra actividad deportiva extraescolar. Se reclutaron 20 niños sanos a los que se les explicó el proyecto y a cuyos padres se les solicitó la firma del consentimiento informado para realizar las mismas exploraciones que al grupo de estudio. La investigación se llevó a cabo de

conformidad con la declaración de Helsinki y el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Plana.

- Estudio de la dieta con pimentón de Novelda (Levante) y pimentón de la Vera (Cáceres): Participaron alumnos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura, todos ellos jóvenes y sanos, de sexo masculino, no fumadores, con una edad media de  $20,6 \pm 1,7$  años, que fueron informados con detalle acerca de las características y los fines del estudio y a los que se les requirió también consentimiento por escrito. Con el fin de uniformizar al máximo las variables sólo se aceptaron varones, rechazándose los sujetos fumadores, que presentaban sobrepeso o delgadez extrema o todos aquellos que presentaban algún tipo de patología. La investigación se llevó a cabo de conformidad con la declaración de Helsinki y el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Extremadura.

- Estudio con pacientes diabéticos, con obesidad mórbida y con ovario poliquístico: Participaron en la investigación 71 pacientes adultos con diabetes tipo I, diabetes tipo II, obesidad mórbida y ovario poliquístico del servicio de Endocrinología del Hospital Doctor Peset de Valencia, los cuales fueron informados sobre las características y los fines del estudio. La investigación se llevó a cabo de conformidad con la declaración de Helsinki y el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del hospital Doctor Peset de Valencia.

- Estudio con enfermos renales: Los pacientes incluidos en el estudio provienen de la unidad de hemodiálisis del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Aquellos que cumplían los criterios de inclusión fueron invitados a participar, descartando los individuos con sospecha de padecer procesos infecciosos o inflamatorios y se les requirió consentimiento por escrito (fueron incluidas 5 personas con prediálisis, 3 personas con diálisis peritoneal, y 28 con hemodiálisis). Como controles analizamos 8 sujetos sanos, no fumadores y sin patologías conocidas.

- Estudio de fragilidad en humanos pertenecientes a la "cohorte de Toledo" para estudio de fragilidad y valores de envejecimiento: La muestra incluye un total de 776 sujetos del "Estudio de Toledo de Envejecimiento Saludable" (ETES) según

los criterios de Fried (Fried *et al.*, 2001) 423 clasificados como no frágiles, 288 como prefrágiles y 65 como frágiles.

La media de edad de la muestra es de 73,46( $\pm$ 4,91) años, siendo la edad de los individuos frágiles significativamente mayor que la de los prefrágiles ( $p < 0,01$ ) y que la de los no frágiles ( $p < 0,01$ ). Los criterios de inclusión para formar parte del ETES fueron el tener una edad superior a 65 años y el ser residentes en el Partido Judicial de Toledo y estar censados en el mismo.

La media de edad, así como la edad mínima, edad máxima y desviación estándar se especifican en la siguiente tabla:

Grupo	n	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	423	65	98	72,42	4,19
Prefrágil	288	65	88	73,80	4,76
Frágil	65	67	95	78,75	6,24

**Tabla 3** Edad media de la muestra (por grupos). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

### 3.1.2 INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

➤ **Autoclave:**

- Marca Selecta, modelo Autester-G.

➤ **Agitadores:**

- Vörtex "Selecta"

➤ **Balanzas:**

- Balanza de precisión SARTORIUS, modelo TECATOR 6110, con una sensibilidad de  $\pm 0,0001$  g.
- Balanza SARTORIUS modelo PT 1200, con una sensibilidad de  $\pm 0,1$  g.
- Balanza modelo AHZ, sensibilidad  $\pm 0,01$  g.

➤ **Centrífugas:**

- Para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1.
- Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofuge 17RS. También se utilizó la ultra centrífuga de la casa KONTRON, modelo T-1075.

➤ **Sistema de purificación de agua:**

- Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-R.
- Marca ELGA, purelab flex.

➤ **pHmetro:**

- El pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

➤ **Homogenizador:**

- Marca "IKA-WERK": modelos Janke y Kunkel RW 20 DZH.

➤ **Sonicador:**

- Modelo "Vibra-Cell VCX-500".

➤ **Baño termostatzado:**

- Se utilizó un baño provisto de agitación automática regulable, marca "SBS-BT".

➤ **Cromatógrafo líquido de alta resolución:** se utilizaron 2 cromatógrafos, uno de ellos para la determinación de Glutación y el otro para la determinación de MDA. Ambos son de la casa "Shimadzu", modelos "LC". Igualmente, ambos cromatógrafos constan de los siguientes módulos:

- Ordenador "IBM"

- Controlador "SLC- 10 AV" para todo el conjunto modular del HPLC
  - Detector UV/Visible "SPD-10 AV"
  - Autoinyector : "SIL-10 AD"
  - Mezclador: "FCV-10 AL"
  - Desgasificador: "DGU-14A"
  - Bombas: "LC-10 AD"
- **Campana de flujo laminar vertical:**
- Marca CULTAIR modelo B100.
- **Espectrofotómetro:**
- Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatzado.

### **3.1.3 REACTIVOS PRINCIPALES:**

- **Determinación de proteínas:** Se empleó el "Protein ASSAY Kit" de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin.
- **Aislamiento de mitocondrias hepáticas:** Solución de lavado: NaCl 0.9%. Tampón de aislamiento de mitocondrias, cuya composición es: Sacarosa 0,3 M, EGTA 1 mM, MOPS 5mM, BSA 15 µM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, enrasar con H<sub>2</sub>O. El pH del tampón se ajusta añadiendo KOH al 20 % hasta alcanzar pH=7,4.
- **Reactivos para la determinación por HPLC:** Kpi 0,1M, pH=7,0: Formado a partir de 2 soluciones "madre": KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=ácido) y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=básico)

El resto de reactivos se indican en los protocolos descritos a continuación.

- **Resto de reactivos:** Los reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania),

Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania), Gibco BRL Life Technologies (USA).

### **3.2 MÉTODOS Y PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO POR HPLC.**

Para la determinación de los marcadores elegidos de estrés oxidativo en esta tesis, se deben de obtener previamente las muestras de sangre (en los casos de animales y humanos), así como de los órganos correspondientes en los casos de animales de experimentación, cuyo procedimiento se explica en los apartados correspondientes al análisis de MDA y de Glutación por HPLC. Los resultados obtenidos se expresan por mg de proteína total o por mL de sangre, por lo que en el caso de tejidos u órganos, se necesita saber el contenido proteico de los mismos. A continuación se explican los procedimientos seguidos para la obtención de mitocondrias hepáticas así como el protocolo para la cuantificación de proteínas.

#### **3.2.1 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE MITOCONDRIAS DEL HÍGADO.**

Una vez se ha extraído el hígado, se introduce en una placa Petri para lavarlo con NaCl 0,9 % (el último lavado debe realizarse con tampón de aislamiento). El tejido lavado se pone sobre papel secante y seguidamente se pesa. Una vez pesado se trocea y se introduce en el homogeneizador de vidrio, donde se añade tampón de aislamiento a razón de 2 mL/g de tejido. Tras homogeneización a 980 rpm de velocidad, para disgregar el tejido y romper las células, obtenemos un homogenado del tejido, que introducimos en uno o varios tubos de centrifuga según el volumen obtenido. Todo este proceso se debe realizar a 4°C. Seguidamente procedemos al aislamiento mitocondrial propiamente dicho, que está basado en el método publicado por Rickwood y cols. en 1987 (Rickwood *et al.*, 1987). Este método consiste en una centrifugación diferencial que comprende dos partes principales: en una primera parte se centrifuga el homogenado a 1000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido y el debris celular. A continuación se recoge el sobrenadante, y el

precipitado se resuspende en 3 mL de tampón de aislamiento y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones para obtener un rendimiento óptimo del proceso. Se juntan los dos sobrenadantes obtenidos y se centrifuga de nuevo para eliminar posibles contaminaciones con restos celulares. Una vez recogido el sobrenadante, que contiene las mitocondrias, pasamos a la segunda parte del aislamiento, que comprende tres centrifugaciones a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Esta alta velocidad de centrifugación conlleva la precipitación de las mitocondrias, obteniendo por tanto un precipitado rico en mitocondrias que lavamos en centrifugaciones sucesivas. Tras la tercera centrifugación, el precipitado mitocondrial obtenido se resuspende en tampón de aislamiento o en tampón para la determinación de peróxidos, a razón de 2 µL/mg de precipitado mitocondrial o 20 µL/mg de precipitado mitocondrial respectivamente. De este modo obtenemos una suspensión mitocondrial más o menos diluida en función de la determinación a realizar.

- Composición del tampón de aislamiento de mitocondrias: Sacarosa 0,3 M, EGTA 1 mM, MOPS 5 mM, BSA 15 µM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, enrasar con H<sub>2</sub>O. El pH del tampón se ajusta añadiendo KOH al 20% (v/v) hasta alcanzar pH=7,4.

- Tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno: EGTA 0,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, KCl 145 mM, HEPES 30 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta 7,4.

### **3.2.2 MÉTODO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS: LOWRY.**

#### **3.2.2.1 FUNDAMENTO.**

Empleamos el "Protein Assay Kit", basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977). El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. El reactivo de Folin, también incluido en el kit, contiene fenol, que al interaccionar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul. El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas.

A la muestra se le añaden los reactivos antes mencionados y forma un complejo coloreado, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. La absorbancia de una solución es la resultante de la absorbancia del soluto cuya concentración se desea conocer.

### **3.2.2.2 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.**

- El Lowry, solución de reactivo, se prepara añadiendo 40 mL de agua a botella de reactivo de Lowry, en polvo (0,15% Deoxycholate , ácido tricloroacético (TCA).
- El Folin Ciocalteu (18 mL) se encuentra en botella de vidrio ámbar previstas para la solución de trabajo. A este reactivo se le añaden 90 ml de agua y se debe mezclar bien.

### **3.2.2.3 PROTOCOLO.**

- Preparamos nuestra recta patrón. Hay que preparar una serie de eppendorfs (numerados y por duplicado) que contengan las siguientes concentraciones de Albúmina (BSA): 50; 25; 12.5; 6; 3; 1.5; 0.75; 0.375, 0,1875 mg/mL en agua bidestilada. Para ello se pesan 50 mg de BSA en un eppendorf y se le añade 1mL de H<sub>2</sub>O bidestilada. Para las siguientes concentraciones sólo se realizan diluciones ½ (cogiendo la mitad del volumen de la concentración anterior y añadiendo 500µL de agua bidestilada).

En cada tubo donde vamos a mezclar los reactivos introducimos:

- 490µL de agua
- 10µL de muestra o patrón
- 500µL de reactivo Lowry

Hay que tener en cuenta que dependiendo de la muestra, de la cual vamos a determinar su concentración, se deberán realizar previamente diluciones de la misma. Así, en muestras derivadas de hígado, músculo esquelético y corteza (dilución ¼).

- Se dejan las muestras en oscuridad durante 20 minutos después de añadir el Lowry.

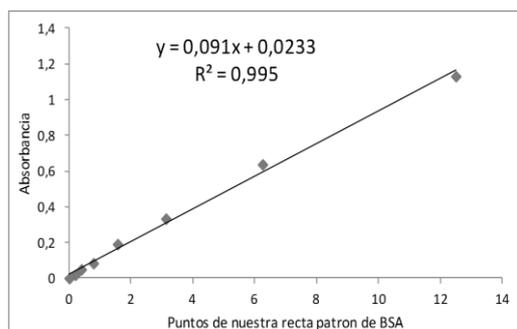
- A cada tubo le se le añade 250µL de reactivo Folin Ciocalteau, descrito anteriormente, mezclándolo muy bien.
- Se dejan las muestras en oscuridad durante 30 minutos para que se desarrolle completamente la reacción. (Adquiere un color azul).
- Leer las absorbancias a 660 nm.

### **3.2.2.4 CÁLCULOS.**

Hay que tener en cuenta los compuestos de interferencias (solventes y reactivos) que absorben a la misma longitud de onda. Se debe descartar la absorbancia de las interferencias, y para ello es necesario hacer siempre una muestra que contenga todos los componentes del sistema menos aquello que se desea medir (muestra o patrón). Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de ésta debe restarse a las muestras problema y a los patrones.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs muestra o patrón} - \text{Abs blanco}$$

El resultado se expresa en una gráfica de la absorbancia en función de la concentración conocida (**Fig 3.1:** recta patrón). Si el sistema sigue la ley de Lambert-Beer, se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen.



**Figura 3.1** Gráfico de una recta patrón donde se mide la absorbancia

Mediante este cálculo es posible determinar gráficamente la concentración de una muestra desconocida dibujando la absorbancia frente a concentraciones conocidas. Se escoge la parte lineal y se calcula la recta de regresión lineal que mejor se ajusta. A partir de ésta, se interpolan los datos de absorción de nuestras muestras problema o desconocida.

### **3.2.3 DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA:**

El MDA es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, en un aumento de su rigidez. Por ésto, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares. Para su determinación se utilizó el método descrito por Wong y colaboradores (Wong *et al.*, 1987a) en el cual, una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) produciendo un cromógeno rosado con un máximo de absorción entre  $\lambda = 532-535$  nm, el cual es específico y detectable a muy baja concentración. Los resultados obtenidos, en nuestro grupo, los expresamos por mg de proteína total (en el caso de órganos) o por mL de plasma. A continuación se describe dicho método:

#### **3.2.3.1 RECOGIDA DE LA MUESTRA:**

- Muestras de sangre: Se recogen en tubos con EDTA como agente quelante del  $\text{Ca}^{+2}$ . Hay que tener la precaución de no poner en hielo los tubos para evitar la hemólisis de los glóbulos rojos. Centrifugar a 1500g, 15 min., a 4 °C para obtener el plasma.
- Muestras de tejidos y células: Cada 100 mg de tejido (ó como mínimo  $3 \times 10^5$  células) debe suspenderse en 1 mL de Kpi 0,1 M, EDTA 1 mM, pH=7,0. No hay que centrifugar esta solución.
- Muestras de mitocondrias: Se toman alícuotas (100  $\mu\text{L}$ ) del extracto.

#### **3.2.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y DERIVATIZACIÓN:**

Para ello necesitaremos los siguientes reactivos:

1. Tampón Acetato Sódico anhidro 2M, pH 3,5, con TBA 0.2%. Para preparar 1L se toman 119 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añaden a unos 600 mL de agua "mili-Q". Se ajusta el pH hasta 3,5 con NaOH 10 M. A continuación se añade a la solución 2 g de ácido tiobarbitúrico y se mantienen en agitación, a 50-60°C, hasta la total disolución del TBA. Se

comprobará que el pH se mantiene y, si no es así, se volverá a ajustar. Finalmente se afora el volumen a 1 litro y se guarda protegido de la luz a 4°C.

2. Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 6,8: Para 500 mL se pesan 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con KOH (1 M) hasta 6,8 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guardará a 4° C.
3. Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 3,5: Para 500 mL se pesan 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con HCl (1 M) hasta 3,5 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guardará también a 4° C.

➤ Preparación de los patrones:

Puesto que para la identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se lleva a cabo mediante el "método del Estándar Externo", descrito en el apartado de la introducción de esta Memoria, necesitaremos, previamente al ensayo, preparar una "Curva Patrón":

1° - Partimos de una solución comercial de MDA-bis (Merck) que está a una concentración de 12,2 M. Para obtener una solución inicial 10 mM, diluimos 410  $\mu\text{L}$  de MDA 12,2 M en 500 mL de agua desionizada.

2° - Diluimos la solución anterior  $\frac{1}{2}$ , con lo que tendremos una solución 5 mM, a partir de la cual conseguimos los siguientes puntos para nuestra "Recta patrón":

- 50 nmol/mL (diluimos 1/100 la solución 5mM de MDA)
- 25 nmol/mL (diluir  $\frac{1}{2}$  la solución anterior)
- 12,5 nmol/mL (diluir  $\frac{1}{2}$  la solución anterior)
- 6,25 nmol/mL (diluir  $\frac{1}{2}$  la solución anterior)
- 3,125 nmol/mL (diluir  $\frac{1}{2}$  la solución anterior)
- 1,562 nmol/mL (diluir  $\frac{1}{2}$  la solución anterior)
- 0,781 nmol/mL (diluir  $\frac{1}{2}$  la solución anterior)
- Blanco: (sólo agua mili-Q)

➤ Procedimiento de derivatización:

Todas las muestras las prepararemos en tubos tipo "eppendorf".

1. A 500  $\mu\text{L}$  del tampón inicial (con TBA) se le añaden 25  $\mu\text{L}$  de muestra (plasma, homogenado de tejido o suspensión de células\*) y de la misma forma se trata a cada uno de los patrones. Hay que destacar que las muestras de cultivos celulares (\*) deben de resuspenderse previamente en 25  $\mu\text{L}$  de Kpi 50 mM, EDTA 0,1 mM y pH 7,4.
  2. Las preparaciones se incuban durante 60 minutos a una temperatura de 95°C. Es en este paso donde se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de malondialdehído que se conjugan con dos moléculas de ácido toibarbitúrico (TBA), por tanto, lo que se determinará es el aducto MDA-TBA<sub>2</sub>, como índice de peroxidación lipídica.
  3. Al sacarlas, las muestras deben mantenerse en hielo.
  4. Añadir 500  $\mu\text{L}$  del tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 6,8 a cada muestra. Agitar. Este paso es crítico ya que el aducto MDA-TBA<sub>2</sub> es inestable en el rango de pH neutro-básico, por lo que debe hacerse con rapidez.
  5. Centrifugar durante 5 min. a 13000 rpm, temperatura de 4°C.
  6. A 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante añadirle 200  $\mu\text{L}$  del tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 3,5 y agitar.
  7. Tomar 200  $\mu\text{L}$  y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.
- Especificaciones para las muestras de plasma: Hay que tener en cuenta que si las muestras de plasma están hemolizadas, deberá eliminarse la hemoglobina puesto que absorbe en la misma longitud de onda que el aducto MDA-TBA<sub>2</sub> y para ello procederemos según el siguiente protocolo:
    1. Preparar una solución formada por 2 partes de cloroformo y una de isopropanol. Añadir 100  $\mu\text{L}$  de esta solución a otros 100  $\mu\text{L}$  del plasma.
    2. Agitar, en vórtex, unos 2 minutos y dejar reposar unos 5 minutos. Después centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm y 4°C.
    3. Recoger 75  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y añadir 75  $\mu\text{L}$  de la solución de cloroformo e isopropanol.

4. Repetir de nuevo el segundo paso (agitación, reposo y centrifugación).
5. Recoger 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y proseguir con el procesado de las muestras para poder analizarlas por HPLC:

### **3.2.3.3 PREPARACIÓN DE LAS FASES MÓVILES PARA HPLC:**

Este es un método "isocrático" y necesitaremos 2 fases diferentes: la "fase de lavado" y la "fase de elución":

- *Fase de lavado (Fase B)*: está constituida por una mezcla de acetonitrilo/agua al 70%, ambos de máxima pureza y el agua del tipo "mili-Q".

- *Fase de elución (Fase A)*: La sal que contiene esta fase es  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 6,8. La relación es de 83/17 (sal/acetonitrilo). El modo de preparación es el siguiente:

1º - Pesar 13,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y disolverlos en unos 1800 mL de agua desionizada "mili-Q".

2º- Ajustar el pH de esta disolución con KOH 1M (u otra concentración).

3º - Enrasar hasta 2000 mL.

4º - Añadir 410 mL de acetonitrilo. Esta solución debe homogenizarse bien.

5º - La solución debe filtrarse, mediante bomba de vacío y filtro de 0,22 micras (Millipore).

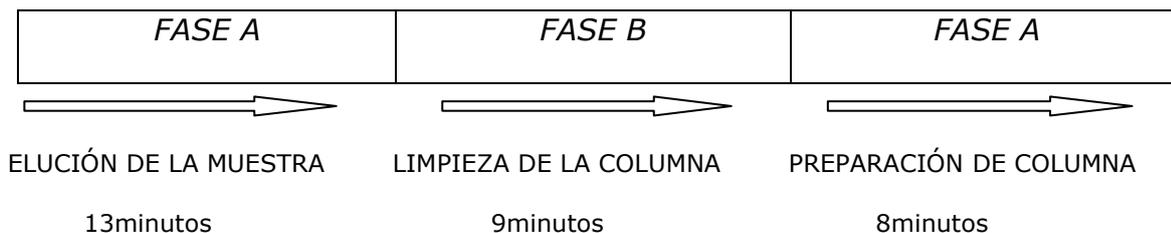
Antes de pasar por el HPLC, ambas fases deben desgasificarse por baño de ultrasonidos unos 20 minutos.

### **3.2.3.4 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:**

- Flujo de las fases: 1.0 mL/min
- Detección en HPLC: se utiliza el detector UV a 532 nm.
- Columna: C18 Spherisorb de 15 cm de longitud y 5  $\mu\text{m}$  de partícula.

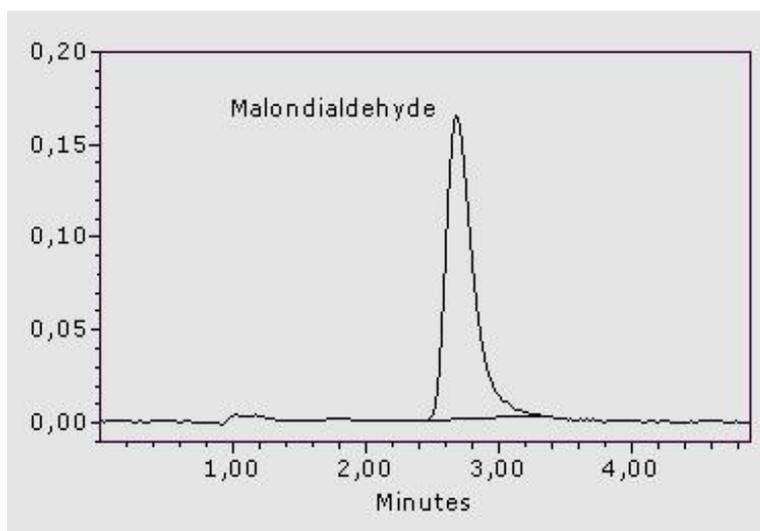
### 3.2.3.5 MÉTODO CROMATOGRÁFICO:

Al ser un método isocrático, sólo necesitamos programar el tiempo que va a estar pasando cada una de las fases líquidas correspondientes. Un cromatograma conlleva unos 30 minutos y la secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la siguiente:



*Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de Malondialdehido (MDA)*

Una programación de muestras supone el repetir cada secuenciación anterior tantas veces como muestras y patrones se deseen analizar (ejemplo de cromatograma observable en la **Fig 3.2**):



**Figura 3.2 Cromatograma del análisis de MDA obtenido con una columna marca "Teknokroma" (www.teknokroma.es)**

### **3.2.4 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA:**

El GSH es el principal antioxidante de las células, a las que protege de toxinas tales como los radicales libres. En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de disulfuro (GSSG), por lo que un aumento de la relación GSSG/GSH se considera una señal de *estrés oxidativo*.

Dada su importancia biológica, y su utilización para correlacionarlo con múltiples parámetros de salud y envejecimiento, se expondrá con precisión el protocolo para llevar a cabo su cuantificación en diversas muestras biológicas:

Inicialmente *Reed* y sus colaboradores (1980) publicaron un método (*Reed et al.*, 1980) para analizar Glutatión (y otros componentes con sulfuro) en HPLC, que fue posteriormente mejorado en nuestro laboratorio por *Asensi* y colaboradores (*Asensi et al.*, 1994b) introduciendo la utilización de N-etilmaleimida (NEM) en la determinación de los niveles de GSSG para evitar la oxidación del GSH durante la preparación de la muestra. Este método basado en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno), en condiciones básicas de pH = 8,5–9,0 da lugar a derivados que son rápidamente separados por HPLC, lo que permite la cuantificación de concentraciones nanomolares de GSH, es el que se describe a continuación, con las últimas modificaciones que hemos ido incorporando.

#### **3.2.4.1 RECOGIDA DE MUESTRAS PARA DETERMINACIÓN DE GSH Y GSSG:**

Dado que la determinación exacta del GSH y GSSG es ampliamente dependiente del tipo de tratamiento de la muestra, es fundamental la correcta recogida de la misma. Por este motivo, debe de mantenerse la muestra en hielo durante todo el proceso de recogida, bien sea plasma, cultivos celulares u homogenado de tejidos, para evitar la oxidación del GSH.

1 – Recogida de plasma, células y tejidos.

A - La sangre se recoge con jeringas heparinizadas y en tubos heparinizados y 500 µL de sangre se mezclarán con 500 µL de la solución ácida correspondiente.

B - Células de cultivos: se deben recoger todas las células de un mismo frasco en 500 µL de la solución adecuada (misma que tejidos).

C - Muestras de tejidos: en el mismo momento del sacrificio se deben de “clampar” y congelar en nitrógeno líquido. Posteriormente se triturarán y homogenizarán (1/10 p/v) en las soluciones de ácido perclórico (PCA) 6 % y ácido disulfónico batofenantrolina (BPDS) 1 mM con o sin NEM.

D - Muestras de extractos de mitocondrias: para la medición de GSH se toman 200 µL del extracto de mitocondrias y se les añaden 50 µL de PCA al 30% con BPDS 5mM. Para medir GSSG necesitaremos alícuotas de 400 µL del extracto de mitocondrias y se les añadirán 100 µL de PCA 30% con BPDS 5 mM y NEM 100 mM.

Soluciones ácidas para la determinación posterior de GSH en sangre y cultivos celulares: se preparará ácido perclórico (PCA) 12% (como agente desproteinizante) conteniendo 2mM de BPDS (como agente quelante fuerte de Fe<sup>+2</sup>, con el fin de evitar la autooxidación del GSH debido a la presencia del hierro proveniente de la hemoglobina de la sangre).

Soluciones ácidas para la determinación de GSSG en sangre y cultivos celulares: Se utilizará el mismo procedimiento anterior pero añadiendo 40 mM de N-etilmaleimida (NEM) a la solución descrita para impedir la oxidación del GSH. La reacción con NEM es una alquilación del grupo sulfidriilo del glutatión a través del grupo etilo de la maleimida y para que tenga lugar se necesitan condiciones de basicidad.

2 – Agitar vigorosamente después de la mezcla.

3 – Centrifugar a 15000 g, durante 15 minutos, a 4°C.

4 – Guardar los sobrenadantes ácidos a -20°C hasta su derivatización.

### **3.2.4.2 PROTOCOLO DE DERIVATIZACIÓN DEL GSH:**

Antes de pasar a la preparación de las muestras, necesitaremos preparar los *patrones externos de GSH* para poder identificar, con el tiempo de retención, los picos correctos en los cromatogramas:

1 – Pesar 5 mg del patrón comercial “Glutación reducido” (Sigma), y lo disolveremos en 1,5 mL de PCA (6%), BPDS 1 mM.

2 – Hacer una dilución 1/10, lo que nos da una concentración de 1000 nmol/mL, a ésta la llamaremos “solución madre”.

3 – Diluyendo 1/10  $\mu$ L la solución anterior tendremos el primer patrón para poder hacer una “Curva patrón” o bien para utilizarlo simplemente como un “standard”, será la concentración de 100 nmol/mL.

4 – Si diluimos sucesivamente  $\frac{1}{2}$  la concentración anterior, obtendremos los siguientes puntos para la “Recta patrón”: 50 nmol/mL, 25 nmol/mL, 12,5 nmol/mL, 6,25 nmol/mL...

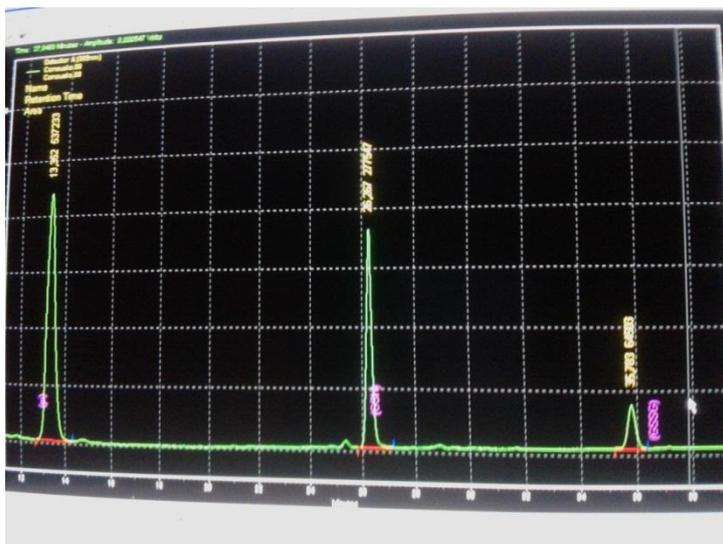
Nota importante: Si los patrones anteriores se van a utilizar para cuantificar el GSH de las muestras, las concentraciones anteriores deben corroborarse mediante una reacción enzimática con “*Glutación transferasa*” (Sigma), midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 365 nm. Para dicha lectura, deberemos colocar en cada cubeta:

- 825  $\mu$ L de tampón Kpi 0,1 M y EDTA 1 mM.
- 25  $\mu$ L muestra-patrón de GSH (podemos confirmar la “solución madre”).
- 10  $\mu$ L de clorodinitrobenzenu (CDNB) al 1% en etanol.
- 10  $\mu$ L del enzima “Glutación transferasa” dializada.

Esta preparación se leerá frente al “blanco” (agua en lugar de “muestra-patrón”) y se debe dejar transcurrir aproximadamente 1,30 horas hasta alcanzar una absorbancia de 0,30 nm. De la ecuación de Lambert-Beer deduciremos el valor exacto de dicha concentración.

➤  Preparación del patrón interno para la cuantificación del GSH

Si en lugar de una "Curva Patrón" utilizamos un "Standard interno", nuestro patrón será el  $\gamma$ -Glutamilglutamato (Sigma) ó también llamado " $\gamma$ -Glu Glu", a concentración 1 mM en 0,3% PCA. En el cromatograma de los patrones utilizados que se presenta en la **figura 3.3**, aparece como el pico con el menor "tiempo de retención", seguido de los picos correspondientes a los patrones de GSH y de GSSG



**Figura 3.3** Cromatograma típico de los tres patrones utilizados: el primer pico corresponde al patrón interno (Glu-Glu), seguido de los picos de los patrones externos (GSH y GSSG), con sus tiempos de retención y los valores de las áreas correspondientes sobre cada uno de los picos

➤  Protocolo de derivatización de la muestra y de los patrones externos:

1 - Descongelar los sobrenadantes ácidos de las muestras y de los correspondientes patrones.

2 - Preparar una solución de ácido Iodoacético (0,09 g) en un indicador de pH, como el púrpura de metacresol 0,2mM (500  $\mu$ L). Debe hacerse en el momento, así como aislarla de la luz y mantenerla en hielo.

3 - Cada uno de los tubos "eppendorf" preparados deberá llevar:

- 200  $\mu$ L de muestra (o patrón de GSH)
- 20  $\mu$ L de patrón interno (al que llamaremos " $\gamma$ -Glu-Glu")
- 20  $\mu$ L de la solución de ácido iodoacético.

4 – Neutralizarlos con KOH 3M CHES 0,3M hasta un pH 9–9,5 (el valor del pH se medirá con papel indicador, el cual se cortará en trocitos muy pequeños para introducirlos en cada eppendorf). El color que buscamos inicialmente en las tiras de papel es un tono amarillo-pálido, a partir de este momento hay que añadir muy poco KOH para lograr un tono rosado que nos dirá que tenemos el pH deseado; si observamos un color en la tira de papel, de un tono violeta significa que el pH es excesivamente básico y, para bajar el pH, añadiremos unas gotas de PCA 6%, BPDS 1 mM.

5 – Mantener 30 minutos en oscuridad.

6 – Añadir el doble FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno), 400  $\mu$ L, al 1% en etanol. Agitar.

7 – Mantener un mínimo de 4 horas en oscuridad a 4°C.

8 – Las muestras así derivatizadas se pueden guardar unos 2 meses en refrigeración hasta el momento de analizarlas en el cromatógrafo.

9 – Inyección de la muestra en HPLC: Disolver en un vial de HPLC: 270  $\mu$ L de Fase A (80% metanol/agua) + 50  $\mu$ L muestra y colocarlo en el autoinyector del cromatógrafo.

### **3.2.4.3 PROTOCOLO DE LA DERIVATIZACIÓN DEL GSSG:**

Antes de pasar a la preparación de las muestras, necesitaremos preparar los patrones externos de GSSG para poder identificar, con el tiempo de retención, a los picos correctos en los cromatogramas:

1 – Prepararemos a partir del patrón comercial "Glutación oxidado" (Sigma), una concentración inicial de 200 nmol/mL en PCA (6%), BPDS 1 mM y NEM 20 mM. Esta preparación se puede repartir en "eppendorfs" y guardar a -20°C durante mucho tiempo (más de 1 año).

2 – A partir de la "solución madre" (anterior) hacer una dilución 1/4, lo que nos dará una concentración de 50 nmol/mL.

3 – Si diluimos sucesivamente  $\frac{1}{2}$  la concentración anterior, obtendremos los siguientes puntos para una completar una "Recta patrón": 25 nmol/mL, 12,5

nmol/mL, 6,25 nmol/mL, 3,125 nmol/mL... o bien para utilizarlos como "estándards externos".

➤ Preparación del patrón interno para la cuantificación del GSSG

Como el "standard interno" es el mismo que para las muestras de GSH, utilizaremos los preparados ya anteriormente.

➤ Protocolo de derivatización de las muestras y de los patrones externos:

1 - Descongelar los sobrenadantes ácidos de las muestras y de los correspondientes patrones.

2 - Preparar la solución del indicador de pH, por ejemplo: el púrpura de metacresol 0.2mM (500 µL). Esta solución se puede guardar mucho tiempo en refrigeración, aunque hay que mantenerla aislada de la luz.

3 - Cada uno de los tubos "ependorf" preparados deberá llevar:

- 200 µL de muestra (o patrón de GSSG)
- 20 µL de patrón interno (al que llamaremos "Glu-Glu")
- 20 µL de la solución de púrpura de metacresol 0.2 mM.

4 - Neutralizarlos con KOH 3M CHES 0,3M hasta un pH 9-9,5 (el valor del pH se medirá con papel indicador, siguiendo el mismo procedimiento que se describe en el punto 4 de la "derivatización del GSH" con la salvedad que para acidificar se utilizará el PCA 6% BPDS 1 mM con NEM 20 mM))

5 - Centrifugar a 15000 g, durante 15 minutos, a 4°C.

6 - Recoger 25 µL de sobrenadante y añadir 50 µL de FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) al 1% en etanol. Agitar

7 - Mantener 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

8 - Desechar al vacío (aproximadamente 35 minutos a 36°C).

9 - Las muestras así derivatizadas se pueden guardar unos varios meses a -20°C hasta el momento de analizarlas en el cromatógrafo.

#### 10 – Inyección de la muestra en HPLC:

- La muestra (en el propio eppendorf) se resuspenderá en 200 µL de fase A (si se sospecha que hay poco GSSG en la muestra, como ocurre en cultivos celulares, la cantidad se reducirá a 100 µL)
- Centrifugar unos 5 minutos a velocidad baja.
- Pasar la disolución a los viales del HPLC.

#### **3.2.4.4 PREPARACIÓN DE LAS FASES MÓVILES PARA HPLC:**

El método implica una elución de las muestras "en gradiente" y para ello se utilizan 2 fases móviles:

- Fase de lavado (Fase A): está constituida por una mezcla de metanol/agua al 80%, ambos de máxima pureza y el agua del tipo "milli-Q".

- Fase B: disolución de Acetato sódico anhidro 0,5M en metanol 64% (en agua). Se preparará como sigue:

- 640 mL metanol "grado HPLC"
- 160 mL agua "mili-Q"
- 200 mL "solución madre", compuesta por: 164g de acetato sódico anhidro + 229,5 mL de H<sub>2</sub>O milli-Q+ 378 mL de ácido acético glacial.

La solución madre se calienta a unos 60°C hasta su completa disolución y después se filtra en bomba de vacío y filtro de 0,22 micras (Millipore). Se puede guardar para posteriores preparaciones de la Fase B

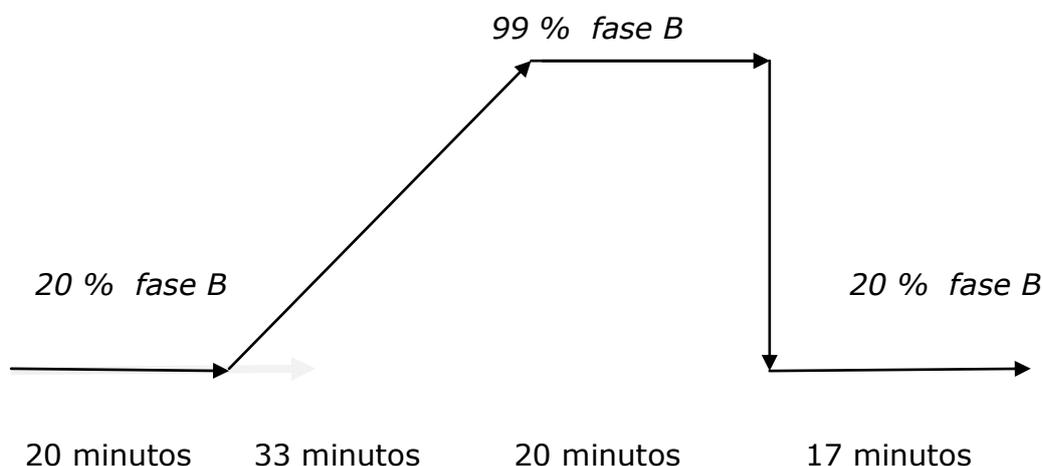
Antes de pasar por el HPLC, las fases A y B se desgasificarán por baño de ultrasonidos unos 20 minutos.

#### **3.2.4.5 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:**

- Flujo de las fases: 1.0 mL/min
- Detección en HPLC: se utiliza el detector UV a 365 nm.
- Columna : NH<sub>2</sub> de Spherisorb (20 x 0.4 cm).

### 3.2.4.6 MÉTODO CROMATOGRÁFICO:

Como se ha comentado anteriormente, este es un método "en gradiente" y la *secuencia de las fases móviles* para una columna nueva, a través del HPLC, es la siguiente

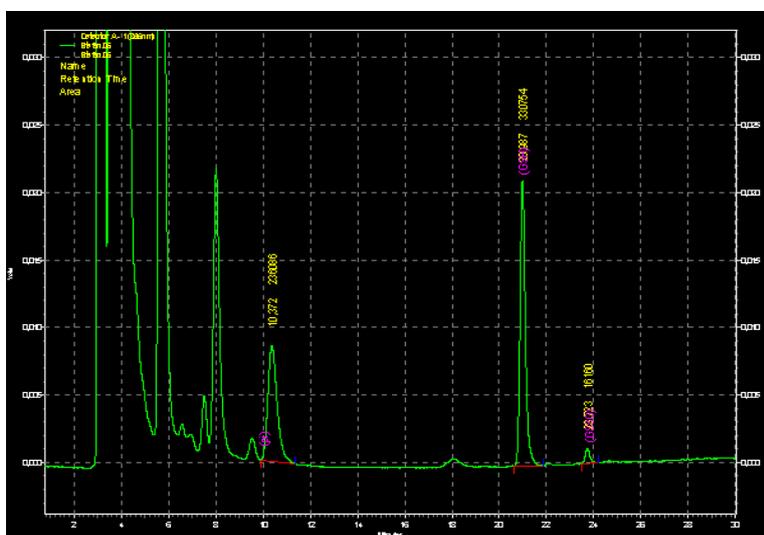


Programación "en gradiente" de la sucesión de Fases A y B para el análisis de glutatión (GSH y GSSG) en una muestra. Tiempo de duración = 90 minutos.

Una programación de muestras supone el repetir cada secuenciación anterior tantas veces como muestras se desee analizar. Hay que tener muy en cuenta algunos aspectos importantes respecto a esta *secuenciación*:

- 1 -Esta sucesión de fases móviles obedece al hecho de que para asegurar una correcta elución del  $\gamma$ -Glutamylglutamato, GSH y GSSG, deberemos verificar que el pico del GSH deberá salir durante la formación del gradiente y el pico del GSSG en la etapa donde la fase móvil corresponde a un 99 % de fase B.
- 2 -La programación explicada en el diagrama anterior es adecuada para una columna cromatográfica nueva, pero debido al hecho de que en dicha columna disminuirá, a través de su uso continuado, el número de "platos teóricos", los picos de los analitos indicados en el punto 1 disminuirán progresivamente su "tiempo de retención en la columna", por lo tanto, apoyándonos en los cromatogramas de los patrones derivatizados de GSH y GSSG, tendremos que reducir, también progresivamente, los minutos de

duración de cada una de las etapas de la secuenciación para lograr una correcta "ubicación" de los picos deseados (tal como se explica en el punto 1).



**Figura 3.4** Cromatograma de una muestra de sangre donde se pueden observar los picos del "Pi" o patrón interno (Glu-Glu) ( $TR=10,37$  min), GSH ( $tR=21$  min) y GSSG ( $tR=23,8$  min)

### 3.2.4.7 CÁLCULOS DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN TOTAL, GSH Y GSSG:

Si observamos el cromatograma de la **Fig.3.3**, en cada uno de los picos objeto de estudio (patrón interno, GSH y GSSG), el programa informático nos indica el Área del pico y este valor es el que consideraremos como:  $[P_{\text{interno}}]$ ,  $[GSH]$  y  $[GSSG]$  para los siguientes cálculos:

- Concentración **GSSG (REED)** =  $([GSSG] / [P_{\text{interno}}]) * 100 * 0,643$   
Llamaremos valor "A".
- Concentración **GSH (REED)** =  $([GSH] / [P_{\text{interno}}]) * 100 * 0,965$   
Llamaremos valor "B".
- Concentración **GLUTATIÓN TOTAL (REED)** =  $[B] + ([A] * 2)$   
Valor "C".
- Conc. **GLUTATIÓN TOTAL (REED)** = "C" x (1/dilución inicial)  
Valor "D".

- Conc. **GSSG** (Asensi *et al.*, 1994c) =  $([\text{GSSG}]/[\text{P}_{\text{interno}}]) * 100 * 0,643$   
Valor "E"

El valor "E" se multiplica por (1/dilución inicial), para corregir la dilución con el PCA, (por ejemplo la dilución con sangre es de 1/2)

- Concentración **GSH FINAL** (Asensi *et al.*, 1994c) = "D" - ("E" x 2):  
Porque hay 2 moles de GSSG en cada molécula de Glutati3n total.

### 3.3 TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviaci3n estándar. El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test de la T de Student, considerando que las diferencias son significativas para los valores de \*P<0,05; \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001.

En el caso del estudio de fragilidad en humanos, para la posible correlaci3n entre los niveles medios de MDA en plasma y la edad de los sujetos, se calcul3 el coeficiente de correlaci3n de Pearson.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los avances en el estudio del estrés oxidativo han sido posibles, en una gran parte, gracias a la mejora de las técnicas de medida a lo largo de los últimos 30 años, así como el aumento del uso y disponibilidad de herramientas necesarias para las mediciones (Fisher-Wellman *et al.*, 2009).

La evaluación del estrés oxidativo de los organismos vivos puede ser llevada a cabo mediante la utilización de marcadores biológicos; los cuales se definen como características que pueden ser medidas y valoradas de forma objetiva como indicadores de los procesos biológicos normales, de los procesos patogénicos o de las respuestas farmacológicas a un tratamiento terapéutico. Un enfoque básico del estudio del estrés oxidativo, como ya se ha comentado anteriormente, es la medición de la oxidación del glutatión, expresado como el cociente entre los niveles de glutatión reducido y oxidado, así como los niveles de peroxidación de los lípidos de membrana (niveles de MDA) en plasma y tejidos. Como es sabido, el glutatión tiene un rol central en la protección contra el estrés oxidativo y la detoxificación tanto de endobióticos potencialmente dañinos como de xenobióticos, siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular. Al ser el GSSG un metabolito capaz de atravesar fácilmente las membranas biológicas y acceder al torrente circulatorio, ocasiona un aumento del cociente GSSG/GSH en sangre, lo que explica el aspecto más interesante del glutatión como índice de estrés oxidativo, puesto que su nivel sanguíneo refleja el daño que se ha producido en otros tejidos (Jones *et al.*, 2000; Ríspoli *et al.*, 2013). Por lo tanto, el análisis del glutatión, especialmente de la forma reducida (GSH), en su forma oxidada (GSSG) y su cociente (GSSG/GSH) como expresión de sufrimiento metabólico intracelular se ha propuesto que puede ser un factor clave para el mantenimiento de la salud (Jones *et al.*, 2000; Guerra, 2001). La concentración de glutatión en sangre podría ser un indicador del riesgo de enfermedad junto con los niveles de peroxidación lipídica (Pryor WA, 1994). La problemática con la que nos encontramos es el de no disponer de unos valores umbrales para estos parámetros que nos permitan establecer a partir de cuáles poder considerar un estado patológico.

La aplicación, por otro lado, de un buen método analítico para la determinación de GSH, GSSG y MDA es primordial. Los métodos convencionales para la cuantificación de estos analitos o sus derivados son espectrofotométricos, fluorométricos, por bioluminiscencia y por HPLC acoplado a UV o fluorimetría (A. Pastore y cols, 2003). En los últimos años, estos análisis también se han extendido a espectrometría de masas (MS) acoplada con cromatografía de gases o cromatografía líquida. La cromatografía líquida se ha acoplado secuencialmente a la espectrometría de masas (LC-MS-MS) con el fin de obtener los beneficios de la sensibilidad del tándem MS y la selectividad de la cromatografía, aunque debido a la naturaleza hidrofílica y polar de estos analitos, queda por establecer una adecuada elección para la mejor columna LC, incluyendo cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), intercambio aniónico, intercambio iónico... para la cuantificación del GSH y GSSG (Yeo *et al.*, 2007).

Ahora bien, cualquier resultado de laboratorio carece de interés por sí mismo. Una primera aproximación para dotar de contenido el resultado de la determinación de un constituyente es su comparación con el valor de dicho constituyente en una población considerada como de "referencia", es decir, compararlo con los llamados **Valores de Referencia**. Es sabido también que cuando se examinan los resultados de una misma prueba o análisis en diversas poblaciones que difieren en edad, sexo, tipo de alimentación, etc..., los valores difieren también entre ellas. De ahí la necesidad de establecer distintos valores de referencia o valores umbrales para los diferentes grupos de edad, sexo, etc. de una población.

Es objetivo de esta tesis, por tanto, el intentar establecer unos "valores de referencia" para los marcadores: GSSG, GSH, el cociente GSSG/GSH y MDA como indicadores de estrés oxidativo medidos por HPLC. Los valores de dichos marcadores se expresarán como nanomol/mL en plasma y en sangre total, nanomol/g de tejido o nanomol/mg de proteína para hígado, nanomol/mg de proteína para mitocondrias hepáticas,  $\mu\text{mol/g}$  tejido en cerebro y mitocondrias de cerebro, para especies animales (ratones) y en humanos. Analizaremos los resultados obtenidos con el fin de poder definir **valores de referencia** en los que las condiciones del individuo y de la técnica estén bien establecidas.

#### 4.1 REVISIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA EN RATONES SANOS Y EN SITUACIONES ESPECIALES O PATOLÓGICAS, PARA LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO: GSH, GSSG, (GSSG/GSH)% Y MDA MEDIDOS POR HPLC.

##### 4.1.1 ESTUDIO CON RATONES C57BL/6J SOMETIDOS A ENTRENAMIENTO FÍSICO.

El objetivo general se basó en el estudio del efecto del ejercicio físico espontáneo durante toda la vida sobre el estrés oxidativo y su relación con la longevidad en ratones C57BL/6J.



Como se ha comentado previamente, se establecieron dos grupos experimentales (Grupo Sedentario y el Grupo Corredor) dividiendo al azar 144 ratones en dos grupos de 74 ratones macho en cada uno de los grupos. Los sacrificios se llevaron a cabo a lo largo de la curva de longevidad en unos puntos concretos de su supervivencia: en cada punto establecido (3 meses, 20 meses, 26 meses y a los 28 meses de vida) se escogieron al azar 4 ratones del grupo sedentario y 4 ratones al azar del grupo de ejercicio voluntario para verificar el estado del animal. Los ratones pertenecientes al grupo de corredores tenían acceso 24 horas al día a una rueda de 11,5 cm de diámetro, mientras que los ratones del grupo sedentario sólo podían desplazarse por la jaula.

En la tabla 4.1 se muestran los resultados de los niveles de peroxidación lipídica medidos en plasma, como MDA, en los 2 grupos de ratones.

	3 MESES	20 MESES	26 MESES	28 MESES
SEDENTARIO	0,10 ±0,06	0,15 ±0,02	0,21± 0,02**	0,25± 0,07**
EJERCICIO VOLUNTARIO	0,10 ±0,02	0,10 ±0,02	0,20±0,02**	0,22± 0,03**

**Tabla 4.1** Valores medios de MDA ( $\mu\text{M}$ ) medidos en plasma con sus desviaciones estándar. No se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos. La significación estadística entre los ratones de 26 y 28 meses respecto a los de 3 meses se expresa como \*\* $P < 0,01$ .

No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en las diferentes edades estudiadas, aspecto que se correlaciona con el hecho de que no se encontraron diferencias en su vida máxima (el ratón más viejo murió a los 950 días) ni tampoco en su vida media (740 días para el grupo de los sedentarios y 770 para los corredores). Este hecho nos demuestra que el ejercicio físico espontáneo en el grupo de los ratones corredores no previene el incremento del estrés oxidativo asociado a la edad. Sin embargo, sí que encontramos, tal como se puede apreciar en la tabla anterior, un importante incremento, estadísticamente significativo, de los niveles de MDA en plasma en ambos grupos conforme se va incrementando la edad de los ratones, habiendo pues una correlación positiva del aumento de la peroxidación lipídica en plasma con la edad, llegando a doblarse los valores iniciales al alcanzar los ratones la edad de 26 meses.

Estos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores en los que se ha demostrado que el envejecimiento aumenta el estrés oxidativo (Miquel, J., et al. 1980, Andziak, B., et al. 2006, Hekimi, S., et al. 2011). El hecho de que el ejercicio voluntario no disminuyera el estrés oxidativo inducido por el envejecimiento podría explicarse porque los roedores corrieron progresivamente menos conforme envejecían, de hecho, al llegar a la edad de los 23 meses ya no lo hicieron en absoluto. Sabemos que el ejercicio físico provoca efectos beneficiosos (Vina *et al.*, 2012; Garcia-Mesa *et al.*, 2014) y en recientes estudios se ha demostrado que el ejercicio físico en personas de edad avanzada tiene un efecto positivo en la composición corporal y en la capacidad funcional del músculo (Theou *et al.*, 2011), pero también hay evidencias en investigaciones que indican que los organismos viejos son más susceptibles al estrés oxidativo durante el ejercicio debido a cambios bioquímicos relacionados con la edad que facilitan la formación de ERO (Ji, 2001). Bejma y colaboradores ya encontraron en el año 2000 la falta de prevención en el estrés oxidativo con ejercicio en animales viejos (Bejma *et al.*, 2000), lo cual estaría de acuerdo con nuestros resultados.

	<b>MEDIA Y VALORES UMBRALES DE MDA</b>
<b>JÓVENES SANOS</b>	<b>0,22</b> [0,13 ; 0,31]
<b>RATONES JÓVENES CON ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>0,37</b> [0,27 ; 0,47]

**Tabla 4.1 a** Medias de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma con los valores umbrales para ratones, obtenidas de las publicaciones del grupo de investigación del Dr. José Viña Ribes

Se presentan en la *tabla 4.1.a* las medias y valores umbrales de MDA en plasma de ratones, obtenidas de las publicaciones del grupo del Dr. José Viña en los últimos años (valores que se exponen, con más detalle, en esta Memoria en el apartado 4.1.5)

Los valores medios de la peroxidación lipídica los presentamos como  $\mu\text{M}$  de MDA en plasma, determinados por el método de Wong S.H. y colaboradores en 1987 (Wong *et al.*, 1987b), cuyo protocolo ha sido descrito detalladamente en esta Memoria. Los valores medios obtenidos en estos ratones son similares a la media presentada en la *tabla 4.1.a*, resultante de las publicaciones realizadas por nuestro grupo y están de acuerdo con los presentados por grupos que miden MDA por HPLC, como es el caso de la tesis doctoral de la Dra. Berta Luzón Toro (realizada en la empresa "Puleva Biotech S.A." y la Universidad de Granada) en la que se presentan valores de MDA en plasma de ratón medidos por HPLC-fluorescencia. Un método similar al nuestro es seguido por Fukunaga y colaboradores (Fukunaga *et al.*, 1998), obteniendo valores en ratones control de  $0,90 \pm 0,50 \mu\text{M}$  y cuando someten al grupo de ratones a una dieta rica en colesterol, éstos llegan a niveles de  $1,90 \pm 0,50 \mu\text{M}$ . El grupo de Ribeiro AL y colaboradores (Ribeiro *et al.*, 2011) reportan unos valores en plasma de  $1,50 \mu\text{M} \pm 0,20$ , igualmente medidos por HPLC. Otros autores miden los niveles de este analito en linfocitos (Oltra *et al.*, 2001), en suero (Gao *et al.*, 2015) así como en orina (Galan-Chilet *et al.*, 2014), por lo que no son comparables con nuestros resultados.

Como se ha anotado previamente, la metodología por la que se va a determinar el analito es fundamental, por lo que queremos destacar el hecho de que en los

últimos años están proliferando los “kits comerciales” que permiten medir la absorbancia colorimétrica del aducto MDA-TBA<sub>2</sub> por espectrofotometría de manera más rápida que por HPLC, a pesar de ser menos específicos para el MDA, dados los valores obtenidos, que resultan ser mucho más elevados que cuando se utiliza la técnica cromatográfica. Valgan como ejemplo los siguientes resultados: con el kit “Cayman Chemical” Anna Panighini y colaboradores (Panighini *et al.*, 2013 ) obtienen unos valores de MDA en plasma de  $5,1 \pm 3,1$   $\mu\text{M}$ ; con el kit comercial “Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China”, Wang HL y colaboradores miden  $4,50 \pm 1,00$  nM MDA en plasma de ratón joven y sano (Wang *et al.*, 2015).

Finalmente, es necesario considerar el hecho de que para la evaluación de los niveles de oxidación lipídica en las membranas celulares, podemos encontrar numerosas publicaciones que presentan dichos niveles como TBARS (Boveris & Navarro, 2008; Navarro & Boveris, 2010), en lugar de como MDA, que es el que presentamos siempre en nuestro grupo.

El principio del método de medir TBARS en las células es hacer reaccionar el ácido tiobarbitúrico (TBA por sus siglas en inglés) con productos de oxidación secundaria de los lípidos para producir un cromógeno rosa atribuible al aducto MDA-TBA<sub>2</sub> con una absorción máxima a 532 nm. Al no ser específico para el MDA, puesto que el TBA puede reaccionar con lípidos oxidados, aldehídos saturados e insaturados, sacarosa y urea, para formar varios cromógenos, el resultado se reporta como sustancias reactivas con el TBA inespecíficas (TBARS), por lo que los valores son más altos que si se mide específicamente como MDA. Hamdy F. Moselhy y colaboradores (Moselhy *et al.*, 2013) demostraron la inexactitud que es inherente a los ensayos de TBARS en plasma que pretenden cuantificar MDA. Compararon la especificidad del ensayo TBARS mediante dos ensayos para MDA en plasma total. Tras derivatizar varias muestras diferentes de plasma, se tomaron cuatro alícuotas de cada una de ellas: unas se analizaron cromatográficamente para MDA (tanto por HPLC-UV, HPLC-FL como por LC/MS) y el resto se analizó por espectrofotometría UV para la determinación de TBARS. Los niveles de plasma total de MDA determinados por cualquiera de los 3 métodos que utilizaron cromatografía líquida fueron significativamente más bajos que los TBARS en plasma, en cada una de las muestras examinadas. Cada uno

de los detectores cromatográficos utilizados produjo una determinación precisa, sensible y exacta del MDA plasmático total. Esta observación está de acuerdo con lo reportado por Hong y colaboradores (Hong *et al.*, 2000) e indica que la determinación de TBARS mediante espectrofotometría UV conduce a una sobreestimación de los niveles de MDA en plasma. Además, la variación interindividual aparente en el nivel de MDA en plasma no fue evidente en el ensayo TBARS en plasma, por lo que se propone que el enfoque de TBARS puede limitar la probabilidad de detectar verdaderas diferencias en el nivel de peroxidación de lípidos en los estudios clínicos.

#### **4.1.2 ESTUDIO EN RATONES TRANSGÉNICOS DE LA CEPA C57BL/6J PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Los animales que utilizamos en este estudio son los ratones doble transgénicos APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> para la EA (Jankowsky *et al.*, 2004) cuya cepa de origen es C57BL/6J. A los ratones transgénicos se les nombró "TG" y a la cepa silvestre "WT".

En este experimento se midieron los niveles de MDA y de (GSSG/GSH)% en el hígado de los ratones objeto de estudio, a lo largo de su vida: en jóvenes (3-5 meses), adultos (10-13 meses) y en viejos (20-26 meses). Se eligió al hígado como órgano de estudio debido a que por su situación anatómica y a sus múltiples funciones bioquímicas, tiene un papel central en el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

##### **4.1.2.1 NIVELES DE MDA EN HÍGADO DE RATONES C57BL/6J Y TRANSGÉNICOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Los resultados se presentan en la *tabla 4.2*

	♂			♀		
	Jóvenes	Adultos	Viejos	Jóvenes	Adultas	Viejas
<b>WT</b>	2,70 ± 0,60	0,80 ± 0,01 <sup>&amp;&amp;</sup>	1,69 ± 1,26 <sup>&amp;&amp;</sup>	3,10 ± 0,04	1,38 ± 0,05 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	2,67 ± 1,31 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
<b>TG</b>	2,10 ± 0,80	0,62 ± 0,22 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	0,96 ± 0,40 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	4,60 ± 2,40*	1,86 ± 0,53 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	1,04 ± 0,27* <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>

**Tabla 4.2** Valores medios de **MDA** (nmol/mg proteína) medidos en **hígado**, con sus desviaciones estándar. Se presentan separadamente machos y hembras. La significación estadística se expresa como \* $P < 0,05$  del grupo TG respecto al WT y como <sup>&&</sup> $P < 0,01$ ; <sup>&&&</sup> $P < 0,001$  de los ratones adultos/as y viejos/as respecto a los/as jóvenes.

A la vista de los resultados, para este parámetro no encontramos diferencias significativas entre los dos tipos genéticos de ratones estudiados. Sin embargo, sí que encontramos mayores niveles de peroxidación lipídica en el hígado de todos los grupos de ratones en su etapa juvenil respecto a las edades adulta y en viejos/as, lo que es mucho más acentuado en los ratones transgénicos. Los datos expuestos formaron parte de la tesis doctoral del Dr. Vicente Bonet Costa, titulada: " Estudio del estrés oxidativo hepático asociado a la enfermedad de Alzheimer. Efecto del tratamiento con bexaroteno y/o genisteína" en la que se obtuvieron resultados de otros indicadores de estrés oxidativo, concluyendo finalmente que el estado oxidativo hepático disminuye en los ratones APPswe/PS1dE9, tanto machos como hembras, con la edad. Una posible hipótesis que pueda explicar los resultados expuestos en este apartado es el concepto de la hormesis, la cual postula que pequeñas agresiones continuas acaban provocando una respuesta adaptativa, que reduce el daño provocado (Calabrese *et al.*, 1987).

Los valores de MDA encontrados en el hígado de los ratones WT abarcan desde 0,43 nmol/mg proteína (1,69-1,26) en los machos viejos hasta 3,98 nmol/mg proteína (2,67+1,31) en hembras viejas, resultados que están en el orden de la media obtenida por nuestro, tal como se muestra en la tabla 4.10, del apartado 4.1.5 de esta Memoria (aunque en esta tabla los valores se dan por mg de tejido). También están de acuerdo con los datos obtenidos en el estudio que se presenta en el siguiente apartado con ratones de las cepas SAMP8 y SAMR1.

Revisando los numerosos datos disponibles en la literatura, encontramos valores algo más elevados cuando se determina este parámetro en hígado mediante métodos espectrofotométricos o como TBARS. Xiaojiang Li y colaboradores (Li *et al.*, 2015) reportan unos valores de  $12,20 \pm 2,20$  nmol/mg proteína determinados por un método colorimétrico comercial para TBA de "Beyotime Biotechnology, Jiangsu, China"; Ling-Lei Kong y cols (Kong *et al.*, 2015) obtienen valores de  $7,00 \pm 2,10$  nmol/mg prot al determinar MDA en hígado de ratones control mediante el kit "Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China". Así mismo, también se encuentran referencias de valores muy por debajo de los expuestos en este apartado, como los  $0,12 \pm 0,01$  nmol/mg proteína que publica Amel M. Soliman (Soliman *et al.*, 2015) al utilizar el kit "Bio-Diagnostic-Egypt".

Al comparar los niveles entre machos y hembras de cada grupo en las tres etapas, sí que se observan diferencias estadísticamente significativas, siendo los niveles más altos en las hembras jóvenes y adultas del tipo TG respecto a los machos TG, lo cual podría ser esperable puesto que las hembras desarrollan más Alzheimer que los machos. Sin embargo, este mismo efecto se observa también en las hembras WT, de lo que podemos deducir que las hembras tienen mayor lipoperoxidación que los machos en el hígado a estas edades. Este es un hecho poco esperable, conocido el papel protector de los estrógenos en las hembras en época fértil (Borras *et al.*, 2003), no obstante, no es un caso aislado pues Liu JR ya encontró en hígado de ratones hembra unos valores de  $1,17 \pm 0,22$  U MDA/mg prot frente a  $1,07 \pm 0,13$  en machos (Liu *et al.*, 2010).

#### **4.1.2.2 NIVELES DE (GSSG/GSH)% EN HÍGADO DE RATONES C57BL/6J Y TRANSGÉNICOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Los resultados se presentan en la *tabla 4.3*

	♂			♀		
	Jóvenes	Adultos	Viejos	Jóvenes	Adultas	Viejas
<b>WT</b>	0,42 ± 0,27	2,34 ± 0,97 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	1,81 ± 0,72 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	0,41 ± 0,29	1,76 ± 2,00 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	1,79 ± 0,54 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
<b>TG</b>	0,52 ± 0,32	1,99 ± 0,75 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	2,62 ± 0,94 <sup>*&amp;&amp;&amp;</sup>	0,34 ± 0,20	2,16 ± 2,30 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	2,01 ± 2,13 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>

**Tabla 4.3** Valores medios de **(GSSG/GSH)%** medidos en hígado, con sus desviaciones estándar. Se presentan separadamente machos y hembras. La significación estadística se expresa como \* $P < 0,05$  entre ambos grupos (WT y TG) y como <sup>&&&</sup> $P < 0,001$  entre los ratones de más edad respecto a los jóvenes.

Con el parámetro (GSSG/GSH)% como índice de oxidación celular, no encontramos diferencias significativas debidas al sexo, aunque sí las hay según la edad de los ratones, en las dos cepas estudiadas. Tanto en los ratones WT como en los TG (machos y hembras) hay un considerable aumento de los valores de (GSSG/GSH)% con la edad, llegándose a cuadruplicar los niveles a partir de la edad adulta respecto a los ratones jóvenes. Estos datos están de acuerdo con la teoría del envejecimiento de los radicales libres de Harman (Harman, 1956a) expuesta anteriormente, según la cual, los animales deberían mostrar un aumento del estrés oxidativo con la edad. Las medias de cada grupo de ratones, así como los valores umbrales obtenidos (desde el cociente 0,12 como valor más bajo obtenido en ratones jóvenes hembras WT, hasta el valor de 4,46 en ratones hembras adultas TG, como valor más alto) se ajustan a los valores de referencia presentados en la tabla 4.10 sobre los valores publicados por nuestro grupo desde 1989 y que resumimos en la tabla 4.4

	MEDIA Y VALORES UMBRALES DE (GSSG/GSH)%
<b>JÓVENES SANOS</b>	<b>1,91</b> [0,31 ; 3,8]
<b>VIEJOS SANOS</b>	<b>6,15</b> [4,4 ; 7,4]
<b>JÓVENES EN SITUACIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO</b> (con una dieta altamente energética, tumor ascítico de Ehrlich o bien irradiados con rayos X)	<b>1,36</b> [0,46 ; 2,08]

**Tabla 4.4** Medias del cociente **(GSSG/GSH)%** en hígado con los valores umbrales para ratones, obtenidas de las publicaciones del Dr. José Viña Ribes

En cuanto a la ausencia de correlación entre las medidas de MDA y el cociente (GSSG/GSH)% cabe decir que en la actualidad no existe un biomarcador único que permita la objetividad en la determinación y caracterización del estrés oxidativo (Ríspoli *et al.*, 2013), así como el hecho de que existen muchos factores capaces de afectarlo (Cheeseman & Slater, 1993). Para poder caracterizar el estado de oxidación de un sujeto se recurre generalmente a la valoración de un conjunto de biomarcadores con el fin de poseer una visión global de su estado fisiológico. En nuestro caso tenemos solamente 2 índices de oxidación: la medición del MDA considerado como el representante más sensible del daño fosfolipídico de la membrana celular (Arab & Steghens, 2004) y el cociente (GSSG/GSH)% como expresión de sufrimiento metabólico intracelular (Jones *et al.*, 2002), por lo que al indicar el estado de estrés oxidativo en ámbitos celulares distintos no siempre son esperables los mismos niveles de oxidación.

#### **4.1.3 ESTUDIO EN RATONES SAMP8 (ENVEJECIMIENTO ACELERADO) Y SAMR1 (RESISTENTES AL ENVEJECIMIENTO).**

Se han utilizado ratones de las cepas SAMP8 (del inglés "senescence prone mice") y SAMR1 (del inglés "senescence resistant mice"), cuyos progenitores procedían de la colonia del Animalario de la Universidad de Granada. El ratón de envejecimiento acelerado SAMP8 es un ratón caracterizado por su rápida progresión hacia el envejecimiento una vez ha alcanzado la edad de reproducción. Estos ratones se obtuvieron en la Universidad de Kyoto, por selección fenotípica de un grupo de ratones de la cepa AKR/J que mostraban manifestaciones seniles de forma temprana. El modelo SAMR1 es un ratón resistente al envejecimiento y por ese motivo es utilizado como cepa control de los SAMP8. La causa principal del envejecimiento acelerado en estos ratones sería su elevado nivel de estrés oxidativo debido a una disfunción mitocondrial, hecho que se ha demostrado en diferentes trabajos experimentales (Mori *et al.*, 1998; Hosokawa, 2002; Rodriguez Manas, 2008; Borras *et al.*, 2009).

El total de animales utilizados fue de 64 ratones macho SAMR1 y 80 ratones macho SAMP8 de 2 y 10 meses de edad a la fecha del sacrificio.

La finalidad de este estudio fue investigar el efecto de la diferente velocidad de envejecimiento sobre los niveles oxidativos en el hígado de ratones de las cepas SAMP8 y SAMR1.

#### **4.1.3.1 NIVELES DE MDA EN HÍGADO DE RATONES SAMP8 Y SAMR1.**

Los resultados se muestran en la *tabla 4.5*

	Jóvenes	Viejos
	MDA(nmol/mg prot)	
Ratones SAMP8	1,64 ±0,82	4,21 ± 2,19*
Ratones SAMR1	2,91 ± 2,33	5,51 ± 4,90

**Tabla 4.5** Valores medios de **MDA** (nmol/mg proteína) medidos en **hígado**, con sus desviaciones estándar. No hay diferencias significativas entre ambos grupos. La significación estadística entre viejos y jóvenes de los respectivos grupos, se expresa como \* $P < 0,05$

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de MDA entre los grupos de animales jóvenes y los de animales viejos de las dos cepas objeto de estudio a pesar de sus diferencias en el proceso de envejecimiento.

La edad sí que indujo un aumento en ambas cepas, aunque sólo fueron significativos los niveles de MDA en los ratones SAMP8, lo que nos indica que los animales viejos presentaron mayores niveles de oxidación lipídica, lo que puede atribuirse a una tasa mayor de radicales libres generados por los organismos viejos (Stadtman, 1992; Sohal *et al.*, 1993). Estos valores coinciden con los obtenidos por Su M. y colaboradores (Su *et al.*, 2014) que presentan  $2,3 \pm 0,2$  nmol MDA/mg prot en hígado de ratón, determinados por el kit "Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, China".

#### **4.1.3.2 NIVELES DE GSH, GSSG Y (GSSG/GSH)% EN HÍGADO DE RATONES SAMP8 Y SAMR1.**

Los resultados se muestran en la *tabla 4.6*

	Ratones SAMP8			Ratones SAMR1		
	GSH	GSSG	(GSSG/GSH) %	GSH	GSSG	(GSSG/GSH) %
<b>Jóvenes</b>	0,54 ± 0,04	0,02±0,01	1,06±1,04	0,57 ± 0,03	0,08±0,02	1,41±0,94
<b>Viejos</b>	0,57 ± 0,02	0,02±0,002	0,99±1,28	0,42 ± 0,02	0,02±0,01	2,47±2,17***

**Tabla 4.6** Valores medios medidos en **hígado** de glutatión (nmol/mg proteína), con sus desviaciones estándar de los ratones SAMP8 y SAMR1. Las diferencias significativas entre ambas cepas se expresan como \*\*\* $P < 0,001$ .

Al comparar los resultados en ambas cepas, en contra de lo esperado, no encontramos diferencias significativas ni por efecto de la edad ni por el tipo de la cepa.

Cabe destacar el valor más alto, estadísticamente significativo, del cociente (GSSG/GSH)% en el grupo de los ratones viejos de la cepa SAMR1 frente a los viejos de la cepa SAMP8, los que precisamente tienen resistencia al envejecimiento. Estos valores se presentaron en la tesis doctoral de la Dra. Sara Cuesta Sancho, de la Universidad Complutense de Madrid, cuyo título fue "Estudio de los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento pancreático y hepático. Modulación por hormona de crecimiento y/o melatonina", en la que se pudo comprobar que en los ratones SAMP8 el envejecimiento produce un aumento de otros marcadores de oxidación como óxido nítrico, hemoxigenasas y nitrogenasas, a la vez que una disminución de la defensa antioxidante tanto en el hígado como en el páncreas y dado que en los ratones de la cepa SAMR1 no se observaron casi alteraciones con la edad, se concluyó que esta cepa se puede considerar un buen control de las alteraciones debidas al envejecimiento.

Como se puede observar en las tablas 4.5 y 4.6, las unidades en que presentamos actualmente los parámetros medidos en hígado, así como en otros órganos, son nmol/mg de proteína para MDA, GSH y GSSG, coincidentes con las publicadas por otros autores (Jin & Yin, 2012a; Musacco-Sebio *et al.*, 2014a; Zhu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015).

Los valores de referencia publicados por nuestro grupo quedan recogidos en el apartado 4.1.6, en el que se presentan representaciones gráficas de los valores medios de los parámetros medidos por HPLC de ratones sanos y de ratones en condiciones especiales o patológicas. Presentamos un resumen de los valores publicados por nuestro grupo hasta el año 2008, en la *tabla 4.7*, en los que los valores de GSH y GSSG se expresan por mg de tejido.

	<b>MEDIA Y VALORES UMBRALES DE GSH</b> (nmol/mg tejido)	<b>MEDIA Y VALORES UMBRALES DE GSSG</b> (nmol/mg tejido)	<b>MEDIA Y VALORES UMBRALES DE (GSSG/GSH)%</b>
<b>JÓVENES SANOS</b>	<b>6,88</b> [4,00 ; 9,58]	<b>0,14</b> [0,02 ; 0,26]	<b>1,91</b> [0,31 ; 3,80]
<b>VIEJOS SANOS</b>	<b>4,60</b> [3,90 ; 5,30]	<b>0,28</b> [0,17 ; 0,39]	<b>6,15</b> [4,40 ; 7,40]
<b>JÓVENES EN SITUACIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO</b> ( <i>tumor ascítico de Ehrlich, irradiados con rayos X, o con una dieta altamente energética</i> )	<b>5,04</b> [1,90 ; 9,07]	<b>0,07</b> [0,04 ; 0,10]	<b>1,36</b> [0,46 ; 2,08]

**Tabla 4.7** Medias de los valores de GSH, GSSG y del cociente (GSSG/GSH)% en **hígado**, con los valores umbrales para ratones, obtenidas de las publicaciones del Dr. José Viña Ribes

En relación a la metodología empleada, nuestro grupo utiliza el protocolo descrito por Reed y colaboradores (Reed *et al.*, 1980), modificado en 1994 por Asensi y colaboradores (Asensi *et al.*, 1994c) y que detallamos en el apartado de "Materiales y Métodos".

Al revisar la bibliografía, hay que destacar que nos encontramos con numerosas variantes tanto en la metodología utilizada como en las unidades de medida en que los grupos de investigación presentan los valores obtenidos de glutatión, lo que no nos permite poder compararlos con nuestros resultados. Masato Ohbuchi y colaboradores (Ohbuchi *et al.*, 2009) determinan GSH en hígado de ratón por el método enzimático basado en la publicación de Tietze (Tietze, 1969), obteniendo unos valores de  $4,60 \pm 0,20$  mmoles por mL de homogenado de hígado (solución 1:4 con TCA 10%) y el cociente GSH/GSSG lo cuantifican por HPLC tras derivatizar los grupos aminos de GSH y GSSG también

según Reed (Reed *et al.*, 1980). Hay otros grupos que lo cuantifican utilizando métodos espectrofotométricos, como Xiaojiang Li y colaboradores (Li *et al.*, 2015) que obtienen  $50,00 \pm 5,00$  mg de GSH/g proteína gracias a un método enzimático en el que se precipitan los homogenados del tejido con ácido sulfosalicílico 15% y se recoge el sobrenadante, leyéndose su absorbancia a 412nm. Amel M. Soliman y colaboradores (Soliman *et al.*, 2015), al igual que miden el MDA en tejidos, obtienen  $0,05 \pm 0,01$  mg GSH/mg prot utilizando el kit de la casa comercial "Bio-Diagnostic-Egypt". Otros grupos presentan sus resultados cuantificando el analito por gramo de tejido, algunos de los cuales obtienen valores cercanos a los presentados en la tabla 4.7, como Popescu LA y colaboradores (Popescu *et al.*, 2013), estos investigadores reportan unos valores de  $10,20 \mu\text{mol/g}$  tejido al medir el contenido de tioles totales mediante una técnica colorimétrica basada en la producción de un color amarillo cuando el reactivo 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB, Sigma Chemical Co.) es añadido a compuestos con grupos sulfhidrilos proteínicos, leyendo la absorbancia a 412 nm. Este método ha sido también utilizado por Jatsa y colaboradores (Jatsa *et al.*, 2015) quienes publican  $3,50 \pm 0,30 \mu\text{mol}$  GSH/g hígado en ratones control.

Por otro lado, no nos es posible comparar los valores del cociente GSSG/GSH con publicaciones que expresan los valores de este parámetro en mV según la ecuación de Nerst:  $E_h = E_o + (RT/nF) \ln([GSSG]/[GSH])^2$ , donde una menor negatividad significa una mayor oxidación (Fitzpatrick *et al.*, 2012a; Morris *et al.*, 2012; Roede *et al.*, 2013). Otros autores, como Masato y colaboradores (Ohbuchi *et al.*, 2009) lo expresan como niveles de GSH/GSSG medidos por HPLC después de haber derivatizado los grupos aminos correspondientes con 2,4-dinitrofluorobenzeno, según el método utilizado por nuestro grupo (Reed *et al.*, 1980) al igual que A. Boveris y colaboradores (Musacco-Sebio *et al.*, 2014b).

#### **4.1.4 ESTUDIO DE LA CURVA DE SUPERVIVENCIA DE RATONES OF1 ALIMENTADOS CON UNA DIETA RICA EN SOJA.**

Con el objetivo de determinar el posible efecto beneficioso de la soja sobre la longevidad realizamos una curva de supervivencia en poblaciones controladas de ratones OF1 machos. Se emplearon un total de 157



ratones albinos machos que se dividieron en dos grupos experimentales según la dieta, un grupo de 81 ratones alimentados con dieta sin soja y el otro de 76 ratones con dieta rica en soja.

En este estudio se presentaron las concentraciones de MDA en las mitocondrias hepáticas de los ratones OF1 machos alimentados con dieta rica en soja y los comparamos con los alimentados con dieta sin soja. La medición en estos orgánulos celulares se eligió en base al hecho de que la generación continua de ERO por la mitocondria a lo largo de la vida celular, origina un estrés oxidativo mitocondrial "crónico" relacionado con la edad, el cual juega un papel clave en el envejecimiento (tabla 4.8).

	<b>3 MESES</b>	<b>12 MESES</b>	<b>18 MESES</b>	<b>23 MESES</b>
<b>CONTROL</b>	2,10 ± 0,90	19,20 ± 9,10	7,50 ± 2,00	5,80 ± 1,20
<b>DIETA CON SOJA</b>	7,20 ± 4,90***	17,20 ± 5,70***	11,20 ± 5,40***	2,50 ± 0,50***

**Tabla 4.8** Valores medios de **MDA** (nmol/mg proteína) medidos en mitocondrias de hígado, con sus derivaciones estándar. La significación estadística se expresa como \*\*\* $P < 0,001$  del grupo de ratones sometidos a dieta con soja frente al grupo control

Al comparar los datos de los ratones alimentados con dieta rica en soja respecto a los controles, vemos diferencias significativas en las diferentes edades consideradas, sin embargo no podemos concluir que la dieta rica en isoflavonas de soja sea un factor que modifique aumentando o disminuyendo de forma general la lipoperoxidación de las mitocondrias de hígado en los ratones OF1 a lo largo de su vida puesto que hay fluctuaciones importantes según la edad considerada.

En cuanto a la variación del MDA con la edad, cuando los ratones tenían un año de vida, los valores de MDA resultaron más altos de lo esperable, lo que puede deberse a que la muestra se haya oxidado a la hora del procesamiento. A los 23 meses de edad se observa un efecto beneficioso del consumo de una dieta rica en soja sobre los niveles de MDA en las mitocondrias hepáticas de ratones OF1

frente a ratones que no ingieren soja ya que los de más avanzada edad tienen menos que los más jóvenes. En la interpretación de estos resultados tenemos que añadir que la vida media fue prácticamente la misma para ambos grupos (496 días en el grupo control y 504 días en el grupo alimentado con dieta rica en soja) y en cuanto a la vida máxima, tampoco se encontraron diferencias, alcanzando ambos grupos una vida máxima de 98 semanas.

Lo que observamos en este estudio puede indicar que la suplementación con antioxidantes como las isoflavonas de soja, no provoca ningún efecto sobre los niveles de peroxidación lipídica, bajo condiciones fisiológicas normales. Esto también fue descrito por Barbosa et al (Barbosa *et al.*, 2011). Sin embargo, podría ser beneficioso en situaciones patológicas, como se observa en ratones con obesidad y el hígado graso inducido por la dieta alta en grasas (Lee *et al.*, 2006). Este hecho podría explicar los valores más bajos, estadísticamente significativos, hallados en los ratones más viejos (23 meses) alimentados con dieta rica en soja frente a los controles, al estar protegidos contra la peroxidación lipídica.

Las unidades en que presentamos los valores de MDA son nmol/mg proteína en mitocondrias, como otros autores presentan TBARS también por mg de proteínas en mitocondrias de hígado de ratón (Boveris & Navarro, 2008; Jin & Yin, 2012b). Sin embargo, aun referenciando los valores por mg de proteínas, la metodología utilizada y el hecho de medir TBARS en lugar de sólo MDA pueden llegar a marcar enormes diferencias entre los valores obtenidos entre los grupos de investigación, como ejemplo presentamos los resultados obtenidos por Navarro y colaboradores (Navarro *et al.*, 2005), quienes publican unos valores de  $3,80 \pm 0,30$  picomoles de TBARS por miligramo de proteína mitocondrial en ratones de 28 semanas, determinados por el método de Fraga y colaboradores (Fraga *et al.*, 1988), los cuales distan mucho de los presentados en esta tesis ( $2,10 \pm 0,90$  nmol/mg proteína en ratones control de 3 meses).

#### **4.1.5 REVISIÓN DE LOS VALORES DE GLUTATIÓN Y MDA MEDIDOS POR HPLC, PUBLICADOS POR NUESTRO GRUPO.**

Los resultados obtenidos en muestras de plasma, hígado, hepatocitos aislados, cerebro y en mitocondrias de cerebro de ratones, publicados por el grupo de

investigación del Dr. José Viña desde el año 1989 al 2008 se exponen a continuación en la tablas nº 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 y la tabla 4.13. En cada tabla se diferencian dos grupos principales: el grupo de "animales sanos" en el que hemos considerado los ratones "control" y el grupo de "animales en condiciones especiales" donde se recogen los datos obtenidos de los diversos experimentos llevados a cabo en cada una de las publicaciones expuestas. Dentro de estos últimos grupos se distinguen los grupos de jóvenes y viejos con mayor y con menor estrés oxidativo tras el tratamiento experimentado.

Al final de cada grupo se ha calculado el valor medio de los valores publicados para cada parámetro y se han incluido los valores mínimo y máximo (valores umbrales), encontrados dentro del grupo considerado, como intervalos de referencia. Al no recogerse en todas las publicaciones los valores del cociente (GSSG/GSH)%, para poder presentarlos en estas tablas, los valores que faltaban se han calculado a partir de las medias estadísticas de los parámetros GSSG y GSH, por lo que se presentan entre paréntesis sin desviación estándar.

		<b>SANGRE</b>			
GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	(GSSG/GSH) %	GSH (mM)	GSSG (mM)	MDA (µM) PLASMA
<b>JÓVENES SANOS</b>	<i>Ratones OF1 utilizados como control. (Estrela et al., 1992)</i>	(0,30) (n=5)	0,40 ± 0,04 (n=5)	0,0012 ± 0,0003 (n=6)	
	<i>Ratones utilizados como control. (Terradez et al., 1993)</i>		0,40 ± 0,04 (n=5)		
	<i>Ratones OF1, control. (Navarro et al., 1997)</i>	(0,38) (n=10)	1,27 ± 0,11 (n=10)	0,0049±0,002 (n=10)	
	<i>Ratones OF1, control. (García-de-la-Asuncion et al., 2007)</i>	(3,70) (n=7)	0,92 ± 0,08 (n=7)	0,034 ± 0,01 (n=7)	0,22 ± 0,09 (n=7)
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>1,34</b> [0,3 ; 3,70] (n=22)	<b>0,86</b> [0,36; 1,38] (n=27)	<b>0,013</b> [0,001 ; 0,04] (n=23)	<b>0,22</b> [0,13 ; 0,31] (n=7)
	<i>Ratones OF1 tras 7 días de inocularles un tumor.(Estrela et al., 1992)</i>	(0,6) (n=4)	0,2 ± 0,10 (n=4)	0,0012 ± 0,0003 (n=6)	

Ratones OF1 tras 14 días de inocularles un tumor. (Estrela et al., 1992)	(1,2) (n=6)	0,10 ± 0,04 (n=7)	0,0012 ± 0,003 (n=6)	
Ratones tras 7 días de inocularles un tumor (Terradez et al., 1993)		0,20 ± 0,10 (n=5)		
Ratones tras 14 días de inocularles un tumor.(Terradez et al., 1993)		0,10 ± 0,04 (n=5)		
Ratones cepa OF1, tras 24 h de haberlos irradiado con rayos X (por debajo de LD50 para ratones). (Navarro et al., 1997)	(1,87) (n=10)	1,07 ± 0,09 (n=10)	0,020 ± 0,003 (n=10)	
Ratones cepa OF1 tratados con AZT (3'ácido-2',3'-dideoximidina) como droga contra el SIDA (40 días: 10mg/kg peso y día)(García-de-la-Asunción et al., 2007)	(6,3) (n=7)	0,95 ± 0,11 (n=7)	0,06 ± 0,02 (n=7)	0,37 ± 0,10 (n=7)
<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>2,63</b> [0,60 ; 6,30] (n=27)	<b>0,53</b> [0,06 ; 1,16] (n=38)	<b>0,022</b> [0,009 ; 0,062] (n=29)	<b>0,37</b> [0,27 ; 0,47] (n=7)

**Tabla 4.9** Valores medios y desviaciones estándar de los parámetros de glutatión (mM) medidos en **sangre** y MDA ( $\mu$ M) en **plasma**, obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989

Las medias obtenidas de glutatión y MDA para los ratones utilizados como control y las obtenidas de los ratones en condiciones fisiopatológicas presentan unos valores umbrales bastante amplios especialmente en el cociente GSSG/GSH (García-de-la-Asunción et al., 2007), lo que nos indica la variabilidad entre las medidas de este parámetro en sangre. No obstante, hay que destacar que las medias obtenidas en el cociente (GSSG/GSH)%, GSSG, GSH en sangre y en el valor de MDA en plasma, demuestran unos valores más altos del estado oxidativo encontrados en los ratones jóvenes cuando presentan tumores, han sido irradiados o bien han sido sometidos a tratamiento farmacológico.

Hay que considerar que estos valores medios han sido obtenidos a partir de valores poblacionales entre los que se encuentra una gran variabilidad respecto a la media grupal obtenida, por lo que no podemos concluir la existencia de valores umbrales, que delimiten claramente una situación fisiológica de una condición fisiopatológica en ratones. Como ejemplo exponemos el caso de la media obtenida para el cociente (GSSG/GSH)% en sangre: el valor medio es de 1,34 para un ratón joven y sano, sin embargo, esta media se ha obtenido de un grupo

de 22 ratones utilizados como controles en diversos experimentos, entre los que se han encontrado valores extremos (0,30 a 3,70). Al considerar la media obtenida a partir de 27 ratones jóvenes en condiciones fisiopatológicas de estrés oxidativo, se obtiene un valor medio de 2,63 para dicho cociente, menor del valor umbral máximo encontrado en el grupo de ratones jóvenes y sanos. Ahora bien, el valor máximo encontrado en este segundo grupo es de 6,30; valor que por sí mismo sí que nos puede indicar la existencia de una situación patológica en un ratón joven.

Como hemos descrito previamente, nuestros resultados representan el glutatión medido en sangre total de ratón, lo que nos diferencia frente a otros grupos como Smita y colaboradores (Iyer *et al.*, 2010), quienes obtienen unos valores muchos más bajos al medirlo en plasma (0,020±0,002 mM de GSH y 0,005±0,001 mM de GSSG), utilizando nuestra misma metodología.

		<b>HÍGADO</b>			
GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	(GSSG/GSH)%	GSH (nmol/mg tejido)	GSSG (nmol/mg tejido)	MDA (nmol/g tejido)
<b>JÓVENES SANOS</b>	<i>Ratones control. (Sastre et al., 1989)</i>	1,36 (n=10)	5,20 ± 1,20 (n=10)		
	<i>Jóvenes. (Vina et al., 1992)</i>	(3,8) (n=9)	5,50 ± 0,59 (n=9)	0,21 ± 0,05 (n=12)	
	<i>Ratones control. (Estrela et al., 1992)</i>	(1,49) (n=5)	6,70 ± 0,8 (n=5)	0,10 ± 0,05 (n=5)	
	<i>Ratones control. (Terradez et al., 1993)</i>		6,70 ± 0,80 (n=5)		
	<i>Ratones control. (Navarro et al., 1997)</i>	(0,31) (n=6)	6,80 ± 0,86 (n=6)	0,021 ± 0,01 (n=6)	
	<i>Ratones control. (Han et al., 2000)</i>		9,00 ± 0,58 (n=15)		1,70 ± 0,21 (n=16)
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>1,91</b> [0,31 ; 3,80] (n=16)	<b>6,88</b> [4,00 ; 9,58] (n=50)	<b>0,14</b> [0,02 ; 0,25] (n=23)	<b>1,70 ±</b> 0,21 (n=16)
<b>VIEJOS SANOS</b>	<i>Viejos. (Vina et al., 1992)</i>	<b>(6,15)</b> (n=13)	<b>4,60 ±</b> 0,70 (n=13)	<b>0,28 ±</b> 0,11 (n=13)	

<b>JÓVENES EN CONDICIONES ESPECIALES</b>	Ratones alimentados, durante 4 semanas, con una dieta altamente energética (tipo "cafetería"). (Sastre et al., 1989)		2,3 ± 0,70 (n=11)		
	Adultos machos a los 7 días de inocularles intraperitonealmente un tumor ascítico de Ehrlich. (Estrela et al., 1992; Terradez et al., 1993)	(1,64) (n=5)	6,10 ± 1,00 (n=5)	0,10 ± 0,03 (n=5)	
	Adultos machos a los 14 días de inocularles intraperitonealmente un tumor ascítico de Ehrlich. (Estrela et al., 1992; Terradez et al., 1993)	(2,08) (n=5)	4,80 ± 0,70 (n=5)	0,10 ± 0,05 (n=5)	
	Ratones macho 24 h después de irradiarlas con rayos X. (Navarro et al., 1997)	0,46 (n=6)	8,50 ± 0,57 (n=6)	0,039 ± 0,018 (n=6)	
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>1,36</b> [0,46 ; 2,08] (n=16)	<b>5,04</b> [1,9 ; 9,07] (n=27)	<b>0,069</b> [0,039 ; 0,10] (n=16)	
	Efecto de una <u>dieta suplementada</u> con 30 ppm de <u>Vitamina E</u> y 0,5% de glutatión, durante 6 meses (Han et al., 2000)		<b>11,10</b> ± 1,33 (n=15)		<b>0,89</b> ± 0,014 (n=16)

**Tabla 4.10** Valores medios y desviaciones estándar medidos en **hígado**, de glutatión (nmol/mg tejido) y MDA (nmol/g tejido) obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989

		<b>HEPATOCITOS AISLADOS</b>			
GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	(GSSG/GSH) %	GSH (nmol/mg tejido)	GSSG (nmol/mg tejido)	MDA (nmol/g tejido )
<b>JÓVENES SANOS</b>	Ratones control. (Sastre et al., 1989)	<b>(1,74)</b> (n=6)	<b>6,10</b> ± 1,70 (n=6)	<b>0,106</b> ± 0,092 (n=6)	
<b>DIETA ESPECIAL</b>	Ratones alimentados, durante 4 semanas, con una dieta altamente energética (tipo "cafetería").(Sastre et al., 1989)	<b>(1,68)</b> (n=6)	<b>3,40</b> ± 0,50 (n=6)	<b>0,057</b> ± 0,010 (n=6)	

**Tabla 4.11** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en **hepatocitos aislados**, de glutatión (nmol/mg tejido) obtenidos de las citas bibliográficas.

		<b>CEREBRO</b>		
GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	(GSSG/GSH) %	GSH (nmol/mg tejido)	GSSG (nmol/mg tejido)
<b>JÓVENES SANOS</b>	<i>Ratones control. (Terradez et al., 1993)</i>		1,50 ± 0,20 (n=5)	
	<i>Ratones control (Navarro et al., 1997)</i>	1,26± 0,001 (n=6)	1,50 ± 0,22 (n=6)	0,019± 0,006 (n=6)
	<i>Ratones control (Vina et al., 1992; Pallardo et al., 1998)</i>	(2,28) (n=9)	1,40 ± 0,60 (n=12)	0,032 ± 0,013 (n=9)
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>1,87</b> [1,25 ; 2,28] (n=15)	<b>1,45</b> [0,8 ; 2,00] (n=23)	<b>0,027</b> [0,013 ; 0,045] (n=15)
<b>VIEJOS SANOS</b>	<i>Ratones control viejos de 18 meses de edad. (Vina et al., 1992)</i>	(4,75) (n=13)	1,20 ± 0,20 (n=13)	0,057 ± 0,018 (n=13)
	<i>Ratones control viejos de 18 meses de edad (Pallardo et al., 1998)</i>	(5,18) (n=13)	1,10 ± 0,20 (n=13)	0,057 ±0,018 (n=13)
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>4,96</b> [4,75 ;5,18] (n=16)	<b>1,15</b> [0,90 ; 1,40] (n=26)	<b>0,057</b> [0,039 ; 0,075] (n=26)
<b>JÓVENES EN CONDIC ESPECIALES</b>	<i>Machos a los 7 días de inocularles intraperitonealmente un tumor ascítico de Ehrlich. (Terradez et al., 1993)</i>		1,70 ± 0,20 (n=5)	
	<i>Machos a los 14 días de inocularles intraperitonealmente un tumor ascítico de Ehrlich. (Terradez et al., 1993)</i>		1,50 ± 0,20 (n=5)	
	<i>Ratones macho 24 h después de irradiarlas con rayos X. (Navarro et al., 1997)</i>	(1,33) (n=6)	1,80 ± 0,19 (n=6)	0,024 ±0,015 (n=6)
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>1,33</b> (n=6)	<b>1,67</b> [1,3 ; 1,99] (n=16)	<b>0,024</b> [0,009 ; 0,039] (n=6)

<b>VIEJOS EN CONDICIONES ESPECIALES</b>	<i>Ratones viejos tratados con un antioxidante oral (N-(2R)-3-acetyl-2-methylthiazolidine-4-carbonyl-β-Ala methyl ester:0,67 nmol/kg cuerpo y día durante 6 meses).</i> (Pallardo et al., 1998)	(4,33) (n=8)	0,9 ± 0,2 (n=8)	0,039 ± 0,013 (n=10)
	<i>Ratones viejos tratados con un antioxidante oral (Glutación reducido:0,67 nmol/kg cuerpo y día durante 6 meses).</i> (Pallardo et al., 1998)	(3,44) (n=13)	1,60 ± 0,40 (n=13)	0,055 ± 0,014 (n=13)
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>3,78</b> [3,44 ; 4,33] (n=21)	<b>1,33</b> [0,7 ; 2,00] (n=21)	<b>0,048</b> [0,026 ; 0,069] (n=16)

**Tabla 4.12** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en **cerebro**, de glutación (nmol/mg tejido) obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989

GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	MITOCONDRIAS DE CEREBRO		
		(GSSG/GSH) %	GSH (nmol/mg tejido)	GSSG (nmol/mg tejido)
<b>JÓVENES SANOS</b>	<i>Ratones control jóvenes de 6 meses.</i> (Pallardo et al., 1998)	<b>0,91</b> (n=4)	<b>0,036 ±</b> 0,012 (n=5)	<b>0,00033 ±</b> 0,00013 (n=4)
<b>VIEJOS SANOS</b>	<i>Ratones control viejos de 18 meses.</i> (Pallardo et al., 1998)	<b>11,8</b> (n=3)	<b>0,016 ±</b> 0,004 (n=3)	<b>0,0019 ±</b> 0,0002 (n=3)
<b>VIEJOS TRATADOS</b>	<i>Ratones viejos tratados con un antioxidante oral (Glutación reducido:0,67 nmol/kg cuerpo y día durante 6 meses).</i> (Pallardo et al., 1998)	<b>2,0</b> (n=3)	<b>0,022 ±</b> 0,007 (n=3)	<b>0,00044 ±</b> 0,00012 (n=3)

**Tabla 4.13** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en **mitocondrias de cerebro**, de Glutación (nmol/mg tejido) obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989

Revisando los valores encontrados en la bibliografía de nuestro grupo, expuestos en las tablas anteriores, podemos concluir que en los órganos, células y orgánulos celulares estudiados, la evolución del estado oxidativo encontrado entre los grupos de ratones jóvenes y viejos sigue el patrón descrito según la teoría del envejecimiento de los radicales libres de Harman (Harman, 1956b). Sabemos que los radicales libres se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos celulares y que cuando

se presenta una situación patológica esta producción se incrementa sustancialmente, provocando un estrés oxidativo. Ésto queda patente al comparar las medias entre los grupos "control" y los que se encuentran en situaciones fisiopatológicas, tanto en ratones jóvenes como viejos. En las medias obtenidas para cada órgano y componente celular estudiado, comprobamos que cuando los ratones envejecen o bien sufren procesos patológicos incrementan el cociente (GSSG/GSH)%, los valores de GSSG y MDA, además de disminuir la cantidad de GSH celular. También es de destacar el hecho de que la ingesta de antioxidantes mejora considerablemente el estado oxidativo del ratón (Pallardo *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2000) El efecto beneficioso de la ingesta de antioxidantes ha sido corroborado en multitud de publicaciones (Jin & Yin, 2012b; Ghule *et al.*, 2015). A la vista de los valores expuestos, hay que resaltar los bajos niveles de GSH y de GSSG encontrados en las mitocondrias de cerebro.

En cuanto a los valores publicados en nuestro grupo desde 1989, queremos destacar la similitud entre los valores recogidos para cada órgano, en cada parámetro estudiado, teniendo en cuenta que el primer artículo data del año 1989.

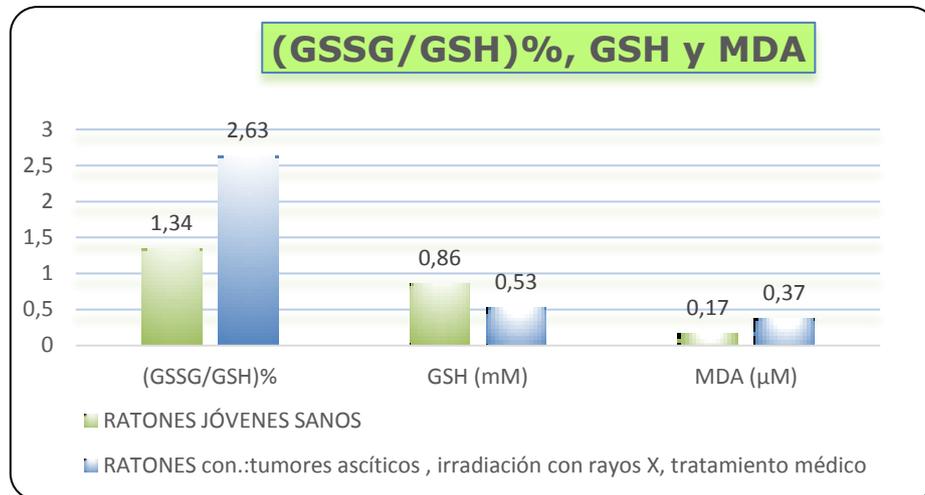
Respecto a las unidades de medida en tejidos, hay que hacer notar que en estas tablas, al recoger los resultados de las primeras publicaciones, los presentamos como nmol/mg tejido.

#### **4.1.6 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS VALORES MEDIOS DE LOS PARÁMETROS MEDIDOS POR HPLC PARA RATONES SANOS Y EN CONDICIONES ESPECIALES O PATOLÓGICAS, RECOPIADOS EN ESTA TESIS.**

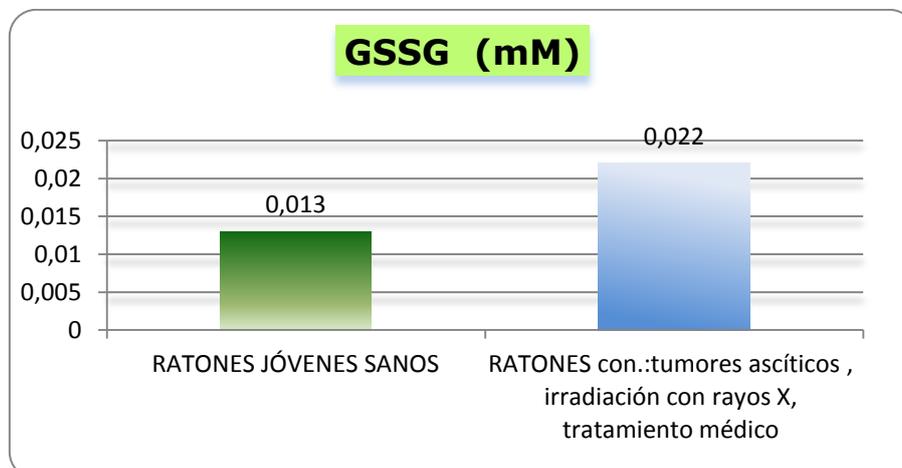
A continuación se presentan las representaciones gráficas del compendio de los valores medios (resultantes de los estudios experimentales y la recopilación bibliográfica) para los parámetros de estrés oxidativo medidos por HPLC (GSH, GSSG, (GSSG/GSH)% y MDA) en ratones sanos y en ratones en situaciones patológicas o especiales, obtenidos en muestras de sangre total y plasma (**figuras 4.1, 4.2 y 4.3**), hígado y mitocondrias de hígado (**figuras 4.4, 4.5 y figura 4.6**), cerebro y mitocondrias de cerebro (**figura 4.7 y figura 4.8**) estudiados en la presente tesis.

Se presentan las medias, ya que los valores umbrales se recogen en las tablas del apartado 4.1.5

#### 4.1.6.1 VALORES MEDIOS DEL COCIENTE (GSSG/GSH)%, GSH, GSSG EN SANGRE Y MDA EN PLASMA.



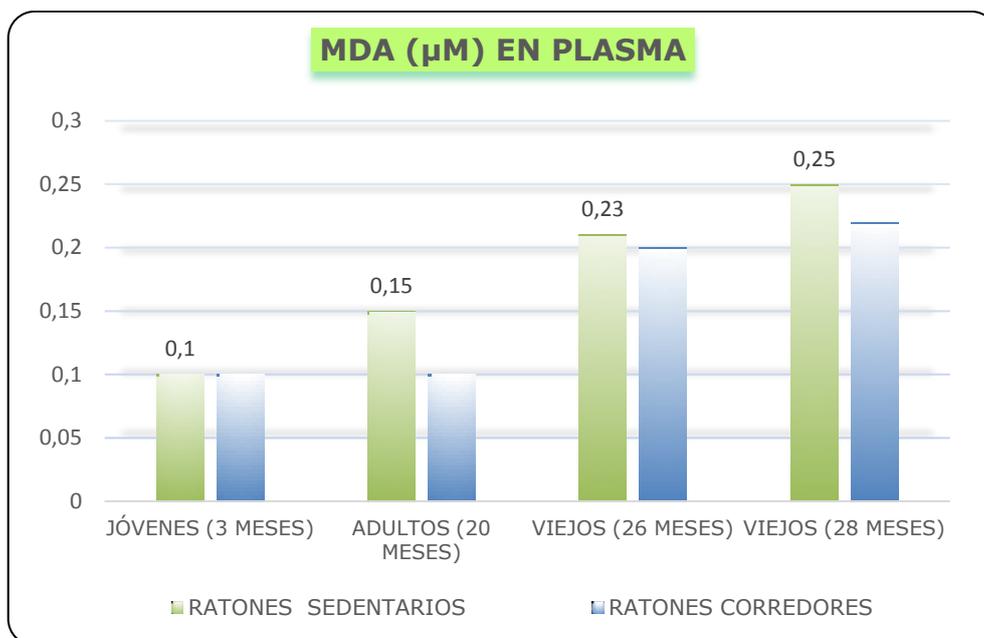
**Figura 4.1** Comparación de los valores de (GSSG/GSH)%, GSH (mM) en sangre y MDA (µM) en plasma de **ratones jóvenes sanos** y en **situaciones fisiopatológicas**



**Figura 4.2** Comparación de los valores de GSSG en sangre de **ratones jóvenes sanos** y en **situaciones fisiopatológicas**

El cociente (GSSG/GSH)% nos indica claramente el incremento, estadísticamente significativo, del nivel de oxidación en sangre que sufren los ratones jóvenes que se encuentran en situaciones fisiopatológicas, como las descritas en la tabla 4.7 (tumores ascíticos, procesos de irradiación con rayos X...) frente a los ratones sanos (obtenemos valores de 2,63 frente a 1,34 en los

ratones control). Efecto que se ve acompañado de una disminución, igualmente significativa, de los niveles de GSH en sangre (0,86 mM versus 0,53 mM) y un aumento en el valor de GSSG en sangre (0,013 mM versus 0,022 mM en los animales enfermos) y de MDA en plasma (0,17  $\mu$ M versus 0,37  $\mu$ M).



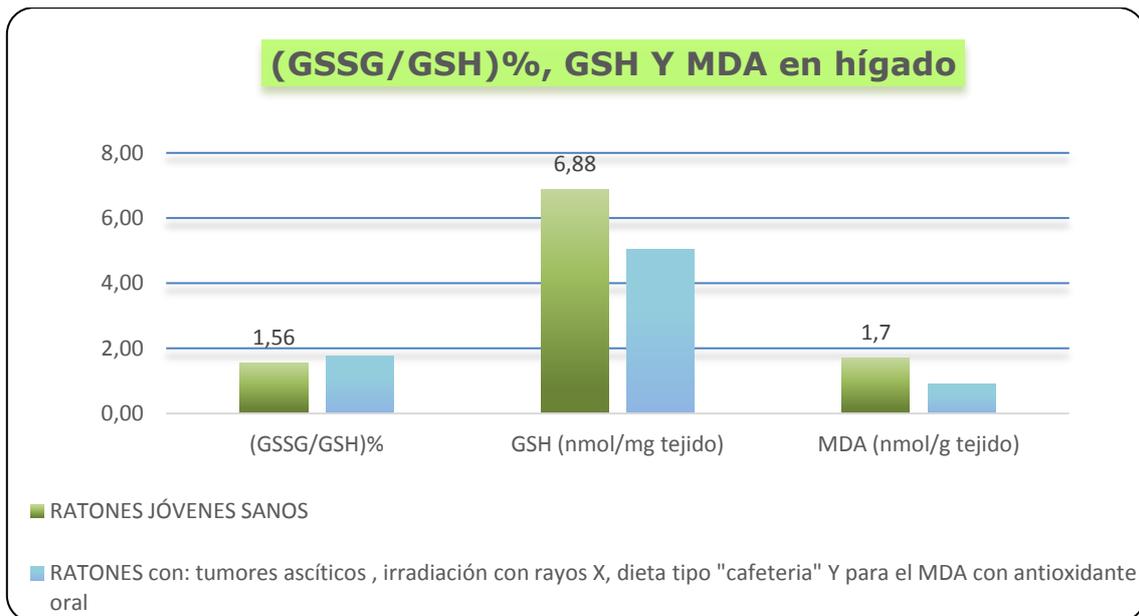
**Figura 4.3** Comparación de los valores medios de MDA ( $\mu$ M) en plasma en **ratones sedentarios y corredores**, conforme aumenta su edad

El aumento anteriormente señalado del estrés oxidativo en situaciones patológicas se invierte cuando a los ratones se les somete a un tratamiento que favorece su situación redox, como es el realizar ejercicio físico de manera voluntaria (ver figura 4.3). En este caso, los niveles de MDA en plasma en ratones adultos y viejos ejercitados disminuyeron respecto al grupo de ratones sedentarios, sin llegar a ser estadísticamente significativa esta diferencia. Tómese esta figura para verificar la correlación positiva entre los niveles de la lipoperoxidación en plasma y la edad en los ratones. Tendencia que se muestra igualmente en humanos, como se comprobará en el capítulo correspondiente.

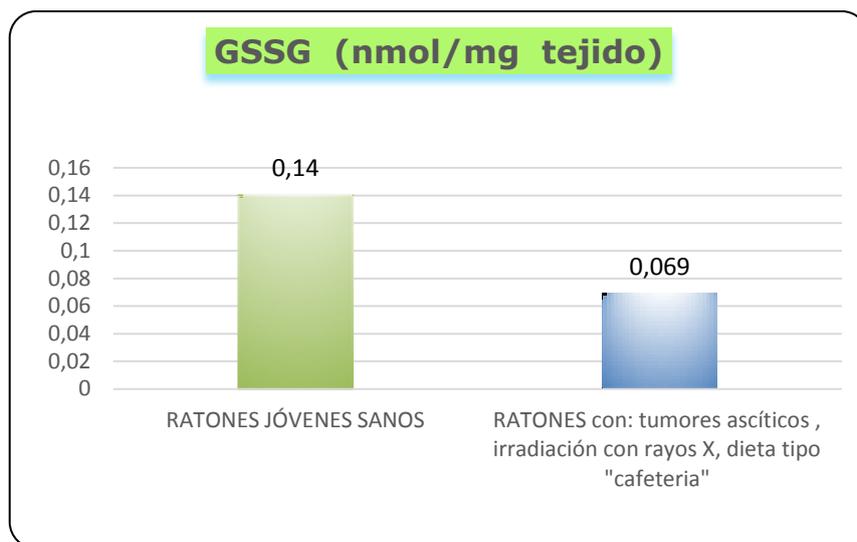
#### **4.1.6.2 VALORES MEDIOS DEL COCIENTE (GSSG/GSH)%, GSH, GSSG Y MDA EN HÍGADO, EN MITOCONDRIAS Y EN HEPATOCITOS AISLADOS.**

Como se puede observar en la **figura 4.4** al comparar los niveles de oxidación del hígado entre ratones jóvenes sanos y ratones jóvenes en situaciones fisiopatológicas, son estadísticamente significativos tanto el mayor nivel de GSSG como el menor valor de GSH encontrados en el segundo grupo. También es significativa la diferencia existente entre las medias de los valores de MDA pertenecientes a ratones jóvenes control y otro grupo de ratones igualmente jóvenes que fue tratado con un antioxidante oral, hecho que se ha presentado en dicha figura.

Hay que hacer notar la diferencia entre las unidades en que se presentan los valores de MDA en las **figuras 4.4** y **4.6**. En la primera figura, la media se mide como nmol/g tejido, mientras que en la siguiente figura las unidades son nmol/mg proteína. Este cambio se debe a la preferencia, en los últimos años, de expresar los valores de MDA por mg de proteína y no ya por gramo de tejido como se recoge en las primeras publicaciones de nuestro grupo (al igual que con los valores de glutatión en tejidos), puesto que parece más acertado determinar los mg de proteína de la muestra que sólo el peso del tejido tomado.

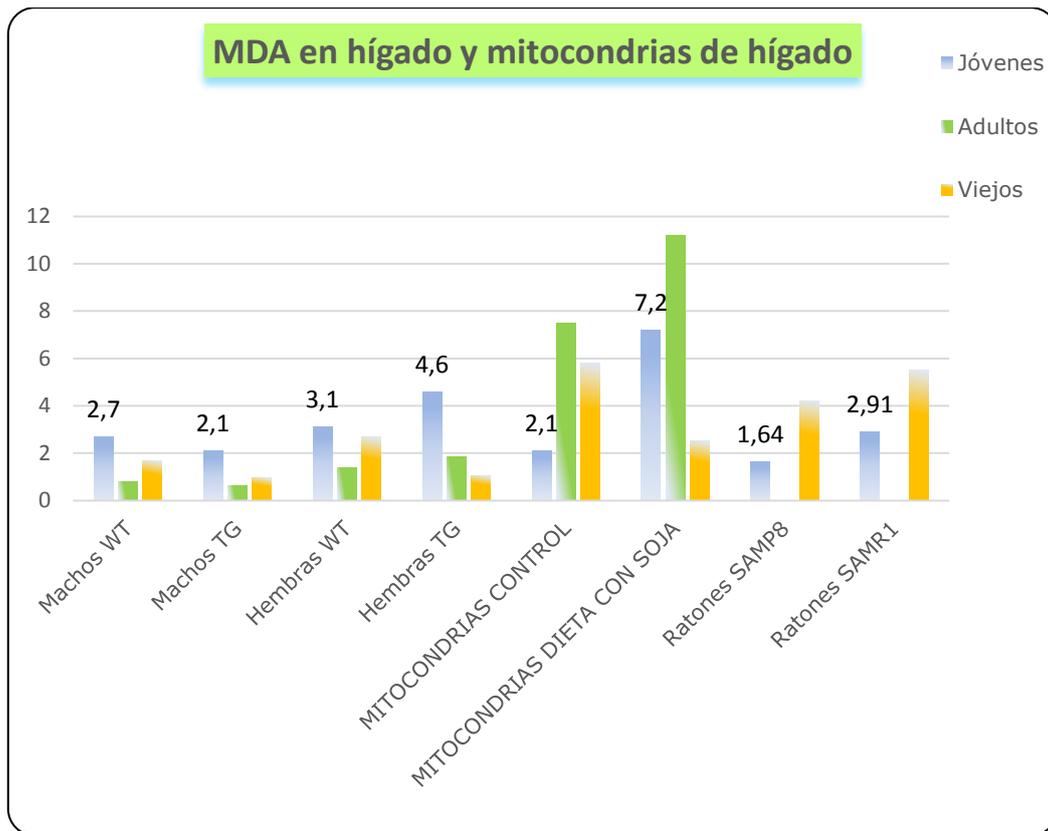


**Figura 4.4** Comparación de los valores de (GSSG/GSH)%, GSH (nmol/g tejido) y MDA (nmol/g tejido) de **ratones jóvenes sanos** y **en situaciones fisiopatológicas** obtenidos en muestras de hígado



**Figura 4.5** Comparación de los valores de GSSG (nmol/mg tejido) de **ratones jóvenes sanos** y **en situaciones fisiopatológicas** obtenidos en muestras de hígado

En las **Figuras 4.4** y **4.5** podemos concluir que el efecto más significativo en el hígado de los ratones jóvenes sometidos a procesos fisiopatológicos respecto a un ratón igualmente joven pero sin patologías, son la disminución de GSH en sangre (6,88 nmol/mg hígado versus 5,04 nmol/mg hígado), atribuible a una menor tasa de síntesis del mismo en estos ratones y al incremento del cociente (GSSG/GSH)% (1,56 versus 1,75).



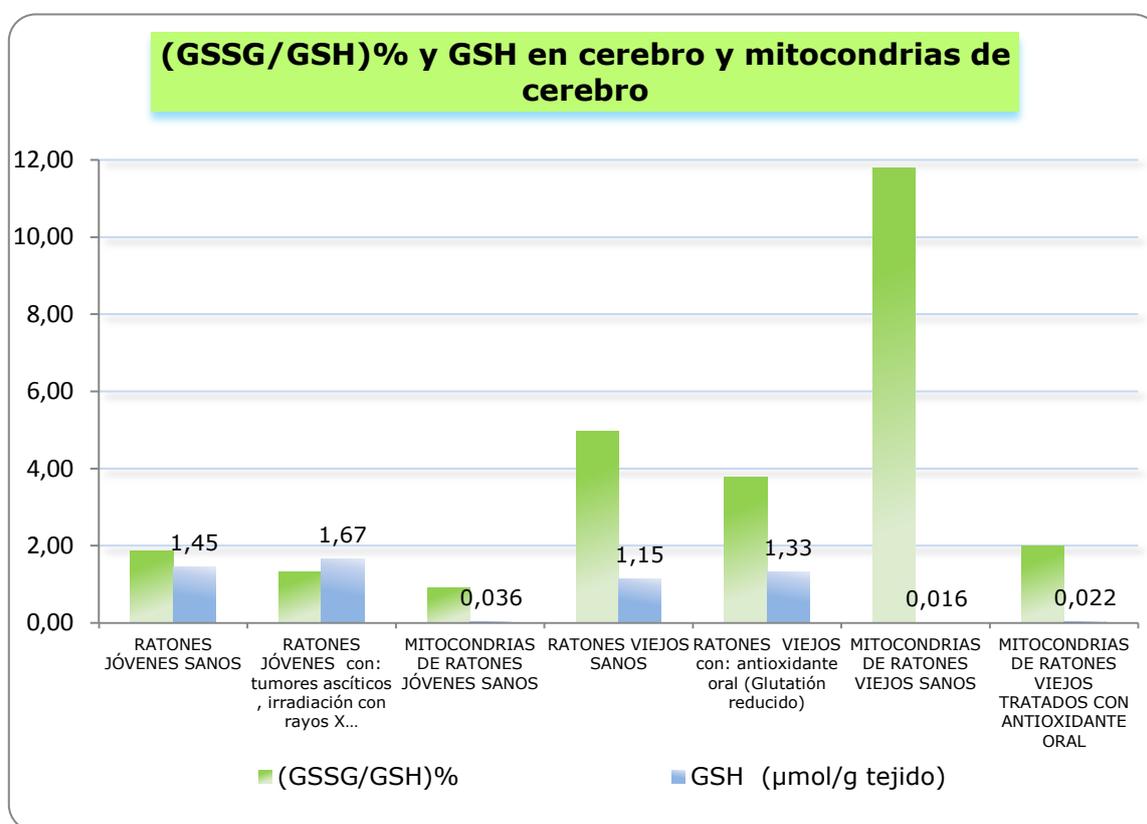
**Figura 4.6** Valores de MDA (nmol/mg proteína) en hígado de **ratones** jóvenes, adultos y viejos sanos (WT), **ratones transgénicos para Alzheimer (TG)** (jóvenes, adultos y viejos), machos y hembras, así como en **ratones SAMP8** y **ratones SAMR1** (jóvenes y viejos), así como en **mitocondrias de hígado** de ratones control y en ratones alimentados con soja

La evolución de las medias de MDA en mitocondrias de hígado se puede seguir en la *Figura 4.6*, en la que comparamos los niveles encontrados en mitocondrias de ratones control, tanto en jóvenes como en adultos y viejos, con los de las mitocondrias de los ratones homólogos que han sido alimentados con una dieta rica en soja (en jóvenes control obtenemos una media de  $2,10 \pm 0,90$  nmol/mg proteína mitocondrial). La alimentación con soja parece ejercer un efecto favorable al disminuir significativamente los niveles de MDA en las mitocondrias de ratones cuando llegan a la vejez, efecto no observado en edades previas.

Hay destacar los mayores niveles de lipoperoxidación que presentan las mitocondrias de hígado frente a los encontrados en el propio órgano (especialmente en los adultos), diferencias que responden al metabolismo llevado a cabo por estos orgánulos puesto que las mitocondrias constituyen la principal fuente de radicales libres de la célula (Miquel *et al.*, 1980; Droge, 2002).

Respecto a los **hepatocitos aislados**, tal como se expone en la tabla 4.11, las medias han sido obtenidas de un estudio con ratones sometidos a una dieta tipo “cafetería” altamente energética y el resultado mostró que las células aisladas de los ratones control presentaron niveles más bajos de oxidación al tener mayores niveles de GSH, tal como ocurre en el hígado (Sastre *et al.*, 1989). En el cociente (GSSG/GSH)% no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, aunque sí se encontraron menores niveles de GSSG en los hepatocitos aislados del grupo de ratones con dieta hipercalórica.

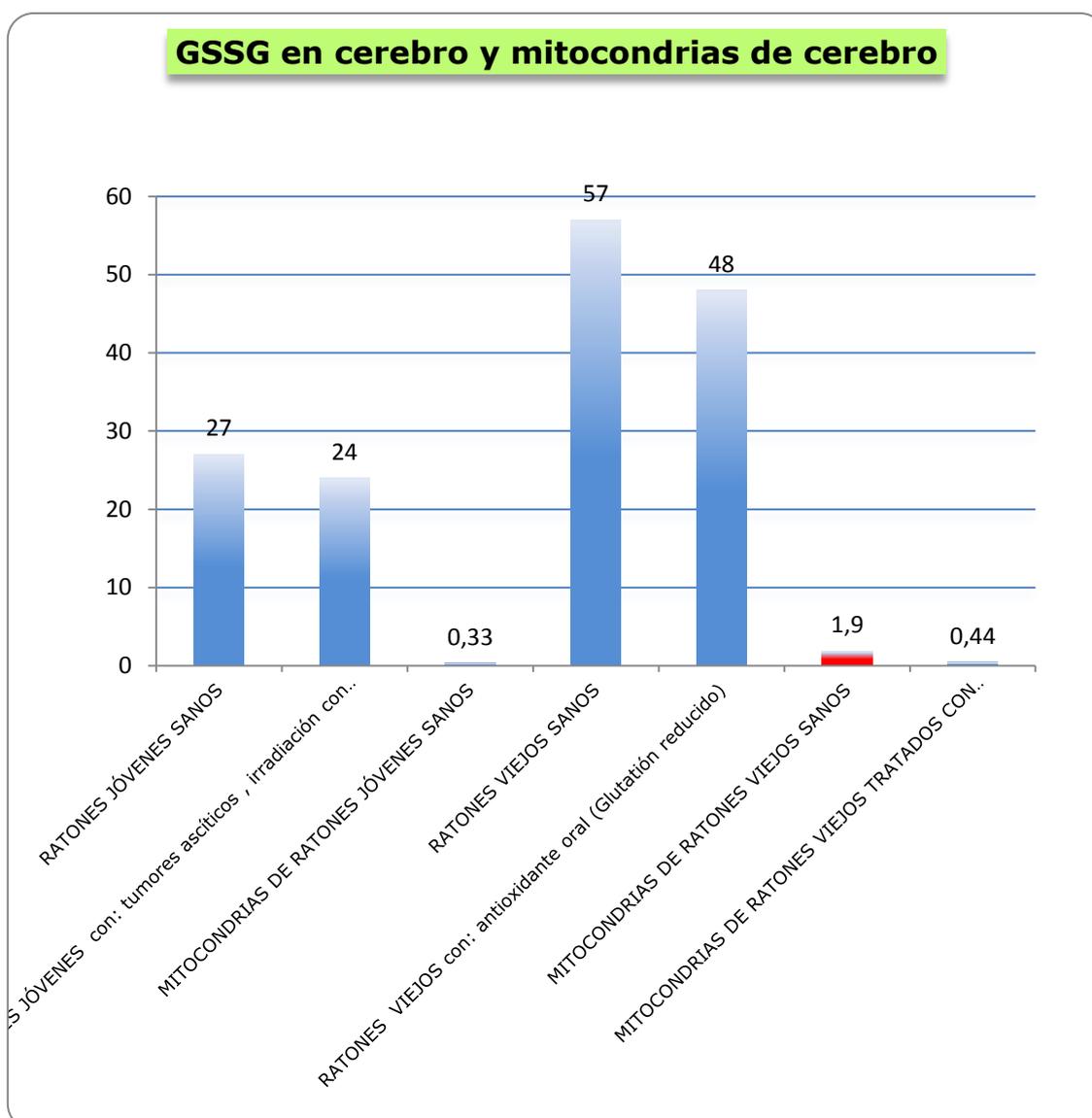
#### 4.1.6.3 VALORES MEDIOS DEL ÍNDICE (GSSG/GSH)%, GSH, GSSG EN CEREBRO Y EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO.



**Figura 4. 7** Comparación de los valores de (GSSG/GSH)% y GSH ( $\mu\text{mol/g}$  tejido) en cerebros y sus correspondientes mitocondrias. Están presentes cerebros de **ratones jóvenes sanos** y en **situaciones fisiopatológicas, ratones viejos sanos y ratones viejos con ingesta de antioxidante**. Medias en **mitocondrias de cerebro de ratones jóvenes y viejos controles y en ratones viejos con ingesta de antioxidante**

En la *Figura 4.7* se presentan las medias para el cociente (GSSG/GSH)% y GSH, tanto en cerebro como en mitocondrias de cerebro y en la *Figura 4.8* los valores para GSSG. Hay que destacar los bajos valores de GSSG y de GSH

encontrados en las mitocondrias respecto al cerebro del que proceden ( $1,90 \pm 0,20$  nmol GSSG/g mitocondrias frente a  $57$  [39 - 75] nmol GSSG/g tejido en ratones viejos), así como con los niveles de GSH ( $0,016 \pm 0,004$   $\mu$ mol GSH/g mitocondrias en ratones viejos sanos frente a  $1,15$  [0,90 - 1,40]  $\mu$ mol GSH/g cerebro en ratones también viejos y sanos).



**Figura 4.8** Valores de GSSG (nmol/mg de tejido) en **cerebro** de **ratones jóvenes sanos**, **ratones jóvenes en situaciones fisiopatológicas**, **ratones viejos sanos** y **con ingesta de antioxidante**. Medias en **mitocondrias de cerebro de ratones jóvenes control**, **ratones viejos control** y de **ratones viejos con ingesta de antioxidante**

Se presentan unos valores significativamente más altos del cociente (GSSG/GSH)% en los cerebros de ratones viejos frente a los jóvenes, como se muestra en la *Figura 4.7*; estos valores nos demuestran que los cerebros de los

ratones jóvenes, incluso los que se encuentran en condiciones fisiopatológicas, están en mejores condiciones redox que los de los ratones viejos que han sido sometidos a un tratamiento con un antioxidante oral (los ratones viejos con tratamiento de antioxidantes presentan una media de 3,78 [3,44 - 4,33] en dicho cociente, frente a los ratones jóvenes enfermos que arrojan una media de 1,33). Esta misma tendencia se repite con las mitocondrias del cerebro, en las que destaca el alto valor de la relación (GSSG/GSH)% encontrado en las mitocondrias de los ratones viejos sanos (11,80) respecto a los de ratones jóvenes sanos (0,91).

Estos resultados están de acuerdo con el concepto general de que las funciones fisiológicas que dependen de la respuesta integrada del sistema nervioso central son las más afectadas por el envejecimiento. Se ha reconocido que el envejecimiento se asocia con una disminución de la función mitocondrial, considerada principalmente como la transferencia de electrones y la respiración, en una serie de órganos como cerebro, corazón, hígado y riñón. Las mitocondrias de cerebro se ven más afectadas por el proceso de envejecimiento que las mitocondrias de otros órganos (Navarro *et al.*, 2002; Navarro & Boveris, 2004).

#### **4.2 VALORES DE REFERENCIA EN NIÑOS, JÓVENES Y ADULTOS HUMANOS SANOS Y EN CONDICIONES ESPECIALES O PATOLÓGICAS, PARA LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO: GSH, GSSG, (GSSG/GSH)% Y MDA MEDIDOS POR HPLC.**

##### **4.2.1 ESTUDIO CON NIÑOS DEPORTISTAS.**

El estudio se llevó a cabo en un grupo de escolares, de entre 10 y 15 años de edad, considerándose como "población de estudio" a 14 niños reclutados en los Clubs Ciclistas de Almazora y Onda (Castellón) que realizaban sesiones de entrenamiento de ciclismo (al menos 2-3 días por semana), y competición durante el fin de semana, a los que se les realizó la extracción de una muestra de sangre al inicio del entrenamiento de la temporada (considerados como "controles") y al final de dicho período (unos 7 meses).

En la tabla 4.14 de resultados podemos observar cómo disminuye significativamente el valor de MDA en plasma tras los meses de entrenamiento aumentando significativamente, sin embargo, los valores de GSSG y con ello, la relación (GSSG/GSH)% en sangre de los niños deportistas frente a los controles.

	MDA ( $\mu\text{M}$ )	GSSG (mM)	GSH (mM)	(GSSG/GSH) %
<b>Muestra pre-entrenamiento (CONTROL)</b>	0,63 $\pm$ 0,22	0,026 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,41	2,18 $\pm$ 0,60
<b>Muestra post-entrenamiento</b>	0,38 $\pm$ 0,21*	0,058 $\pm$ 0,04*	1,24 $\pm$ 0,86	5,30 $\pm$ 4,70***

**Tabla 4.14** Valores de medias y desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en el estudio con niños deportistas. La significación estadística se expresa como \* $P < 0,05$  y \*\*\* $P < 0,001$  entre las muestras post y pre-entrenamiento

Se sabe que la práctica regular de ejercicio físico está asociada con múltiples bondades sobre el organismo (aumento del tono muscular, pérdida de peso, mejoría funcional del aparato cardiovascular, aumento del metabolismo energético y de las defensas antioxidantes, aumento de la fuerza y de la resistencia y disminución de la osteoporosis, entre otros) (Kostka, 1999), aunque también durante la actividad física, aún en individuos entrenados, se puede llegar a incrementar notablemente la producción de radicales libres y, por lo tanto, será mayor el requerimiento de mecanismos de defensa antioxidante (Sies, 1991; Sies & De Groot, 1993). En particular, la relación entre el ejercicio y el estrés oxidativo es extremadamente compleja, dependiendo de la modalidad, intensidad y duración del ejercicio. Un entrenamiento moderado y regular parece beneficioso para la salud y el estrés oxidativo. Por el contrario, el ejercicio agudo conduce a un aumento del estrés oxidativo, aunque este mismo estímulo es necesario para permitir una especial regulación de las defensas antioxidantes endógenas (hormesis) (Radak *et al.*, 2005; Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Pingitore *et al.*, 2015).

La disminución de los valores de MDA en plasma en los niños entrenados podría obedecer a los beneficios proporcionados por el ejercicio regular disminuyendo la lipoperoxidación de las membranas celulares. Un incremento del glutatión oxidado en sangre tras sesiones de entrenamiento físico cuando el ejercicio ha sido intenso, ya ha sido reportado en la bibliografía. Laaksonen y colaboradores (Laaksonen *et al.*, 1999) encontraron que el GSSG se incrementó un 50% después de pedalear durante 40 minutos al 60% del consumo máximo de oxígeno. Ji y colaboradores (Ji, 1993) examinaron el mecanismo de cambio de glutatión en sangre como respuesta al ejercicio, encontrando que la relación glutatión oxidado/glutatión reducido así como el glutatión total se incrementaron como consecuencia de un ejercicio consistente en pedalear desde el 70% del consumo máximo de oxígeno hasta el agotamiento.

Nuestros valores de MDA en el plasma de niños sanos ( $0,63 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ) son del mismo orden que los obtenidos por Elisabeth Fabian y colaboradores (Fabian *et al.*, 2013) quienes en un estudio con niños asmáticos de entre 5 y 15 años de edad, publican  $0,86 \pm 0,18 \mu\text{M}$  de MDA en el plasma de niños control y  $1,22 \pm 0,38 \mu\text{M}$  en plasma de niños asmáticos, cuantificándolo por HPLC. También mediante derivatización de la muestra y posterior detección por HPLC (con detector de UV), Thierry Dine y colaboradores (Dine *et al.*, 2014) miden el MDA en plasma de niños ( $3,30 \pm 0,08 \mu\text{M}$ ), obteniendo unos valores superiores a los de nuestro grupo. En cuanto a los valores de glutatión en sangre, los obtenidos en este estudio ( $1,19 \pm 0,41 \text{mM}$  GSH) se ajustan a las medias resultantes en la bibliografía publicada por el Dr. José Viña, para humanos jóvenes y adultos, expuestas en el apartado 4.2.6 de esta Memoria. Parisotto y colaboradores (Parisotto *et al.*, 2015) al estudiar el estrés oxidativo en niños con síndrome de Down, encuentran unos valores muy similares a los de nuestro grupo ( $1,31 \pm 0,04 \text{mM}$  GSH en sangre total en el grupo de los niños control) analizando el glutatión por espectrofotometría. Este mismo autor también mide la lipoperoxidación en el plasma de niños como indicador de su estado redox, pero al valorarlo como TBARS y no como MDA (método ya comentado previamente en esta tesis) obtiene unos valores superiores a los aquí expuestos ( $13,60 \pm 0,30 \mu\text{M}$ ).

#### 4.2.2 ESTUDIO EN UNA POBLACIÓN DE JÓVENES SALUDABLES, BASADO EN LA MODIFICACIÓN DE SU DIETA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANTIOXIDANTE: EL PIMENTÓN DE NOVELDA O EL PIMENTÓN DE LA VERA.

Este estudio se llevó a cabo con dos grupos de sujetos jóvenes, a los que se les sometió durante 30 días a una dieta basada en la administración (2g/día) de dos tipos distintos de pimentón (bien a través de la ingesta de embutidos o como condimento) con el objetivo de estudiar su posible efecto antioxidante. A uno de los grupos se les administró un tipo de pimentón no ahumado del Levante español (de Novelda) y al segundo grupo el pimentón ahumado de la Vera (Cáceres) siendo 25 el número de individuos seleccionados para el primer grupo y 28 para el segundo.

Los resultados se presentan en la tabla 4.15, en la que se observa el efecto beneficioso de la ingesta del pimentón de la Vera sobre los valores de estos parámetros, representados por una disminución significativa de los niveles de GSSG en sangre y MDA en plasma, acompañados de un también significativo aumento de GSH en sangre. En el mismo estudio, se comprobó igualmente el efecto originado en la dieta por la ingesta del pimentón de Novelda, con menor potencial antioxidante que el pimentón ahumado.

	MDA ( $\mu\text{M}$ )	GSSG (mM)	GSH (mM)	(GSSG/GSH)%
<b>INICIO: control</b> (n=53)	0,85 $\pm$ 0,22	0,015 $\pm$ 0,01	2,07 $\pm$ 0,09	6,00 $\pm$ 2,40
<b>30 días de dieta con pimentón de Levante</b> (n=25)	0,82 $\pm$ 0,09	0,012 $\pm$ 0,01**	2,26 $\pm$ 0,07**	5,60 $\pm$ 3,80**
<b>30 días de dieta con pimentón de la Vera</b> (n=28)	0,56 $\pm$ 0,12***	0,009 $\pm$ 0,003**	3,60 $\pm$ 0,14**	3,00 $\pm$ 1,90***

**Tabla 4.15** Valores medios y desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en el estudio de la dieta con los dos tipos de pimentón. La significación estadística respecto a los controles se expresa como \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$

Además de sus propiedades antioxidantes, se ha demostrado que, en general, todos los tipos de pimentón, nacionales e internacionales, ayudan a regular el colesterol y los triglicéridos. Es más, todos ellos contienen una sustancia, la

capsaicina, que dota a este producto de un ligero saber picante y al mismo tiempo le concede efectos anticancerígenos (Issekutz *et al.*, 1950; Sánchez *et al.*, 2007).

El proceso de deshidratación al que es sometido el pimiento, en el caso del pimentón de la Vera, se lleva a cabo mediante humo procedente de la combustión de madera (encina o roble) y comparte, con otros alimentos ahumados, el riesgo de contener en su estructura componentes procedentes del aroma de humo, los PAH (hidrocarburos policíclicos aromáticos), que son sustancias potencialmente tóxicas para la salud, cuyo contenido máximo en los productos alimenticios está regulado por la Directiva 05/10 (Directiva 2005/10/CE) de la Comisión Europea. Por este motivo, el principal objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del secado-ahumado en dicho pimentón sobre los sistemas antioxidantes en sujetos jóvenes y sanos, formando parte de la tesis doctoral "Efectos de la administración del pimentón de la Vera sobre los sistemas antioxidantes" del Dr. Jesús Martín Gómez Encinas, desarrollada en el Dpto. de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura, en colaboración con el grupo de investigación del Dr. José Viña, financiado por la Consejería de Sanidad y Consumo.

A la vista de los resultados obtenidos tras la ingesta en la dieta de los dos tipos de pimentón, se confirmó el efecto antioxidante de este condimento, máxime en el caso del pimentón de la Vera, el cual parece ser debido precisamente a la aplicación del humo de la leña de encina sobre el pimentón extremeño durante la fase de su procesado. Como hemos señalado anteriormente, hay evidencias científicas que apoyan el hecho de que dosis bajas de PAH pueden aumentar el mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo (Cossu *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 2001; Lin & Yang, 2007).

Los valores obtenidos de estos parámetros, tanto de glutatión como de MDA, están de acuerdo con los datos publicados en nuestro grupo, que se presentarán en la tablas 4.20 y 4.21 de esta Memoria. Los niveles de MDA, igualmente son similares a los publicados por Fernando Moreto y colaboradores (Moreto *et al.*, 2014), quienes estudiaron el impacto del síndrome metabólico sobre los niveles del MDA en plasma, determinándolo (como nuestro grupo) por HPLC. Los

resultados obtenidos por este grupo fueron de  $0,80 \pm 0,28 \mu\text{M}$  en personas sanas de 37 años de edad. No podemos comparar estos valores con autores que no lo evalúan en plasma, como Galan-Chilet y colaboradores (Galan-Chilet *et al.*, 2014), quienes en un estudio con una población de sujetos españoles de entre 18 y 85 años de edad, miden este parámetro en orina (al igual que lo hacen con el glutatión y otros parámetros indicadores del estado redox en humanos).

Al considerar los valores de glutatión medidos en sangre, la media obtenida de GSH es de  $2,07 \pm 0,09 \text{ mM}$  y para GSSG de  $0,015 \pm 0,010 \text{ mM}$  en el grupo de jóvenes sanos que no tomaron dieta antioxidante. Como ya se ha expuesto en el capítulo dedicado al estudio en ratones, no es sencillo poder comparar nuestros resultados con otros grupos, dada la variabilidad existente con la metodología de cuantificación empleada y con el medio biológico en el que se evalúa el parámetro. Silvana López y colaboradores (Lopez *et al.*, 2015) realizaron un estudio, igualmente en jóvenes universitarios, sobre el efecto de la presencia de Sb(V) en sangre, determinando el cociente (GSSG/GSH)% como índice de estrés oxidativo en plasma y aunque el método empleado fue un espectrofotómetro con detector de fluorescencia, sus valores ( $2,86 \pm 0,50$  para dicho cociente), quedan unas unidades por debajo de los presentados por nuestro grupo en este capítulo ( $6,00 \pm 2,40$  como (GSSG/GSH)%), hecho atribuible a que tanto el GSH como el GSSG fueron medidos en plasma y no en sangre total.

#### **4.2.3 ESTUDIO CON ENFERMOS RENALES SOMETIDOS A PROCESOS DE DIÁLISIS.**

Como es sabido, la disminución de GSH y el aumento del cociente GSSG/GSH, están asociados con el envejecimiento y con la patogénesis de varias enfermedades en el humano (Halliwell & Gutteridge, 1989; Weber, 1990; Hopps *et al.*, 2010). Con los resultados expuestos en estos tres últimos capítulos, intentamos encontrar valores umbrales en los parámetros estudiados que nos ayuden a delimitar un estado patológico de un estado fisiológico sano en humanos.

En el grupo de enfermos renales, como se ha indicado en el apartado de "Material y Métodos" el estudio englobó a 8 personas sanas consideradas como "controles" y a un grupo de 36 enfermos renales (5 personas con prediálisis, 3

personas con diálisis peritoneal, y 28 con hemodiálisis). Los valores obtenidos se presentan en la *tabla 4.16*

	<b>MDA(<math>\mu</math>M)</b>	<b>GSSG (mM)</b>	<b>GSH (mM)</b>	<b>(GSSG/GSH)%</b>
<b>CONTROL</b> (n=8)	0,43 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,26	1,67 $\pm$ 0,56
<b>PREDIÁLISIS</b> (n=5)	4,94 $\pm$ 3,00**	0,07 $\pm$ 0,05**	1,68 $\pm$ 0,30**	3,81 $\pm$ 1,91**
<b>DIÁLISIS PERITONEAL</b> (n=3)	33,10 $\pm$ 15,70**	0,13 $\pm$ 0,05**	1,46 $\pm$ 0,80**	10,08 $\pm$ 5,09**
<b>HEMODIÁLISIS</b> (n=28)	5,00 $\pm$ 4,83**	0,04 $\pm$ 0,04**	1,19 $\pm$ 0,44**	3,54 $\pm$ 3,71**

**Tabla 4.16** Valores medios con sus desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en cada grupo de los enfermos renales (prediálisis, diálisis peritoneal y hemodiálisis) respecto a los controles. La significación estadística respecto a los controles se expresa como \*\* $P < 0,01$

En la *Tabla 4.16* pueden apreciarse los elevados valores de MDA en plasma en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal (33,10 $\pm$ 15,70  $\mu$ M) frente a unos valores de sólo 0,43 $\pm$ 0,07  $\mu$ M en los controles y de GSSG en sangre de los mismos pacientes sometidos a diálisis peritoneal (0,13 $\pm$ 0,05 mM) respecto a 0,02 $\pm$ 0,05 mM en los controles. Así pues, tienen especial relevancia estos valores encontrados en este grupo de enfermos renales, efecto que también queda reflejado en el alto valor del cociente (GSSG/GSH)% (10,08 $\pm$ 5,09), en comparación con los enfermos que aún no están sometidos a diálisis (3,81 $\pm$ 1,91) e incluso los de hemodiálisis (3,54 $\pm$ 3,71). Sin embargo, es patente también un aumento del GSH en sangre en los tres grupos de enfermos renales respecto al grupo control considerado (0,75  $\pm$  0,26 mM), lo que puede indicar un aumento en la síntesis del mismo como mecanismo biológico de defensa antioxidante o de la conservación del mismo por activación de otros sistemas antioxidantes compensatorios.

Este aumento del estado oxidativo de los enfermos renales frente a los sujetos sanos está en concordancia con trabajos similares, algunos de ellos se comentan a continuación: Dña. M<sup>a</sup> Jesús Puchades Montesa, presentó su tesis doctoral "Estudio del estrés oxidativo en pacientes con enfermedad renal crónica:

prediálisis, hemodiálisis y diálisis peritoneal” en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia en 2011, (Puchades Montesa *et al.*, 2009) determinando los valores de GSH, GSSG y MDA por HPLC en el mismo tipo de pacientes, pero midiéndolo en células mononucleares aisladas mediante centrifugación con Ficoll-Hypaque de Sigma, por lo que las medias obtenidas no son comparables. Otro grupo de investigadores de México que llevaron a cabo un estudio similar es el de Angélica Rangel y colaboradores (Rangel-Lopez *et al.*, 2013), la metodología que se especifica en la publicación es la rutinaria utilizada en laboratorios clínicos de los hospitales y al medir MDA en sangre los mayores valores obtenidos los encuentran en el grupo de prediálisis y de diálisis peritoneal. Las medias obtenidas en su grupo control son de  $4,60 \pm 0,90 \mu\text{M}$ , superiores a las obtenidas en nuestro grupo, aunque para los enfermos oscilan desde los  $5,30 \pm 1,70 \mu\text{M}$  en los enfermos de hemodiálisis hasta los  $6,60 \pm 1,70 \mu\text{M}$  en los enfermos que están en pre-diálisis, valores muy similares a los expuestos en la *Tabla 4.16*, aunque hay que considerar que son niveles de MDA en sangre y no sólo en plasma (como lo medimos en nuestro grupo). Tucker y colaboradores (Tucker *et al.*, 2013) también estudian los niveles de estrés oxidativo entre sujetos sanos y enfermos renales, aunque al medir los niveles de los parámetros indicados en linfocitos periféricos, no podemos realizar comparaciones con los valores obtenidos por nuestro grupo. Por último, el grupo de Ogunro PS (Ogunro *et al.*, 2014) estudian el efecto de las membranas de diálisis sobre los enfermos renales al someterlos al propio proceso de diálisis, pero aunque miden los niveles de glutatión y lipoperoxidación en sangre total, expresan los valores de GSH en sujetos sanos y enfermos como  $\mu\text{mol/mg Hb}$ , utilizando espectrofotometría en lugar de cromatografía, por lo que tampoco son comparables, obteniendo asimismo unos valores de  $3,98 \pm 0,60 \mu\text{M}$  para MDA en los enfermos en prediálisis, los cuales se asemejan a los obtenidos por nuestro grupo en el plasma.

#### **4.2.4 ESTUDIO CON ENFERMOS DIABÉTICOS TIPO I Y TIPO II, PERSONAS CON OBESIDAD MÓRBIDA Y MUJERES CON OVARIO POLIQUÍSTICO.**

En esta investigación participaron 71 pacientes adultos con diabetes tipo I, diabetes tipo II, obesidad mórbida y ovario poliquístico del servicio de Endocrinología del Hospital Doctor Peset de Valencia, los cuales fueron informados sobre las características y los fines del estudio. Los resultados de las mediciones se exponen en la *Tabla 4.17*

	<b>GSSG (mM)</b>	<b>GSH (mM)</b>	<b>(GSSG/GSH)%</b>
<b>CONTROL</b> (n=16)	0,08 ± 0,05	1,49 ± 0,68	10,51 ± 4,04
<b>OBESIDAD MÓRBIDA</b> (n=10)	0,05± 0,041*	1,46± 0,30	3,58± 2,96**
<b>DIABETES MELLITUS-1</b> (n= 19)	0,05± 0,04*	1,16± 0,33**	4,24± 3,03**
<b>DIABETES MELLITUS-2</b> (n= 22 )	0,06± 0,08	1,24 ± 0,45	7,41 ± 9,20
<b>OVARIO POLIQUÍSTICO</b> (n= 4)	0,06 ± 0,02	1,28 ± 0,16	4,64 ± 1,72*

**Tabla 4.17** Valores medios con sus desviaciones estándar de los parámetros de estrés oxidativo en el estudio con enfermos del Servicio de Endocrinología del Hospital Peset de Valencia. La significación estadística respecto a los controles se expresa como \*P<0,05; \*\*P<0,01

Como se ha señalado en la introducción, el estrés oxidativo tiene un papel importante en la aparición y progresión de la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. De hecho, numerosos factores de riesgo para la diabetes, tales como aumento de la edad, la obesidad y los hábitos alimenticios poco saludables, predisponen hacia un estado de estrés oxidativo que contribuye ampliamente a la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas y/o la muerte y el deterioro de la sensibilidad a la insulina (Brownlee, 1992). De igual manera, otras patologías relacionadas con el sistema endocrino muestran niveles altos de oxidación celular (Keaney *et al.*, 2003; Ríspoli *et al.*, 2013).

Dentro de este grupo de pacientes, el efecto más significativo se observó en unos menores valores de GSH respecto al grupo control, experimentado por los

enfermos que sufrían diabetes mellitus tipo 1 ( $1,16 \pm 0,33$  mM respecto a un valor de  $1,49 \pm 0,68$  mM en humanos sanos), resultados que son coincidentes con la bibliografía. Jiménez-Osorio y colaboradores (Jimenez-Osorio *et al.*, 2014), aunque determinan GSH en plasma, muestran valores de  $6,00 \pm 0,20$   $\mu$ M en sujetos sanos frente a  $3,20 \pm 0,50$   $\mu$ M en sujetos con diabetes mellitus 2. El citado grupo no encuentra diferencias significativas con los valores de GSSG ni con el cociente (GSH/GSSG)% de los pacientes diabéticos respecto a los humanos "control", al igual que entre nuestros grupos objeto de estudio.

Los datos recogidos en las publicaciones del grupo de investigación del Dr. José Viña correspondientes a los valores de los parámetros estudiados en la sangre de adultos sanos y cuyos valores se presentan en la *Tabla 4.18*, arrojan unos valores medios en concordancia con los expuestos en estos dos últimos capítulos.

<b>MEDIAS Y VALORES UMBRALES EN ADULTOS SANOS</b>	(GSSG/GSH)%	GSH (mM)	GSSG (mM)	MDA( $\mu$ M) <b>(PLASMA)</b>
	<b>3,45</b> [1,3 ; 14,55]	<b>1,05</b> [0,49 ; 2,17]	<b>0,044</b> [0,007; 0,130]	<b>1,25</b> [0,36 ; 2,8]

**Tabla 4.18** Medias y valores umbrales de los valores de GSH, GSSG y del cociente (GSSG/GSH)% en sangre y MDA en plasma de adultos sanos, obtenidas de las publicaciones del Dr. José Viña Ribes

Sin embargo, a pesar de existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de adultos sanos y los adultos enfermos estudiados, no podemos establecer unos valores de glutatión en sangre y de MDA en plasma que permitan separar taxativamente una situación patológica de otra fisiológica, pues la variabilidad encontrada en los valores de los sujetos sanos que formaron parte de los grupos controles no nos lo permiten.

#### **4.2.5 ESTUDIO DE LOS VALORES DE MALONDIALDEHÍDO EN HUMANOS, EN DISTINTOS ESTADÍOS DE FRAGILIDAD.**

Los siguientes resultados se obtuvieron a partir de un estudio poblacional longitudinal, el Estudio de Toledo de Envejecimiento Saludable (ETES), cuyo objetivo fue identificar la fragilidad en ancianos y relacionarla con posibles

biomarcadores que puedan ayudar a la detección precoz de este síndrome geriátrico.

Una vez entrevistados y recogidos los datos clínicos de los sujetos, se seleccionaron para el estudio bioquímico un total de 776 sujetos de los cuales se disponía de muestra de plasma y fenotipo de fragilidad según los criterios de Fried (Fried *et al.*, 2001). De los 776 sujetos reclutados 423 se clasificaron como no frágiles, 288 como pre frágiles y 65 como frágiles. El rango de edades de los sujetos osciló entre los 65 y 95 años de edad, incluyendo hombres y mujeres en ambos grupos.

En la *Tabla 4.19* se reflejan los estadísticos descriptivos de la variable niveles de MDA en plasma para cada uno de los grupos estudiados (no frágil, pre frágil y frágil).

Grupo	Sexo	n	Media ( $\mu\text{M}$ ) $\pm$ DE
No frágil	Todos	423	<b>2,19 <math>\pm</math> 2,04</b>
	Hombre	179	2,44 $\pm$ 2,30
	Mujer	244	2,01 $\pm$ 1,82
Pre frágil	Todos	288	<b>2,80 <math>\pm</math> 2,66**</b>
	Hombre	120	2,56 $\pm$ 2,36
	Mujer	168	2,95 $\pm$ 2,88
Frágil	Todos	65	<b>3,63 <math>\pm</math> 3,10**</b>
	Hombre	21	3,04 $\pm$ 2,28
	Mujer	44	3,91 $\pm$ 3,41

**Tabla 4.19** Estadísticos descriptivos para la variable: niveles de MDA en plasma ( $\mu\text{M}$ ) en los diferentes grupos estudiados (no frágil, pre frágil y frágil). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar. La significación estadística se expresa como \*\* $P < 0,01$  de los sujetos prefrágiles y frágiles respecto a los no frágiles

Dado que existe una gran evidencia científica de que el estrés oxidativo aumenta con la edad de los individuos (Sohal, 1993; Harman, 2001) y que, por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio sugieren que las mujeres presentan menores niveles de daño oxidativo que los hombres debido al papel

protector que ejercen los estrógenos (Borras *et al.*, 2003), se hace necesario determinar la posible influencia de la edad en los resultados obtenidos, así como las posibles diferencias significativas en los niveles medios de MDA en plasma en los diferentes grupos estudiados (no frágil, pre frágil y frágil), en función del sexo del sujeto. Para la posible correlación entre los niveles medios de MDA en plasma y la edad de los sujetos (teniendo en cuenta el rango acotado de edad) se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, no obteniéndose correlación significativa.

Al estudiar las posibles diferencias significativas en los niveles medios de MDA en plasma en función del sexo, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, acompañada de la corrección de Bonferroni, sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, con los resultados de las diferencias significativas entre los tres grupos según el nivel de fragilidad, sí que se observa un aumento gradual en los niveles de MDA desde el grupo de los no frágiles hasta el grupo de los frágiles, pudiendo concluir que los niveles de lipoperoxidación en plasma dependen directamente del grado de fragilidad en el sujeto. Esta conclusión está de acuerdo con los resultados de Wu y colaboradores quienes demostraron mayores niveles de daño oxidativo al DNA en los individuos frágiles comparados con los no frágiles (Wu *et al.*, 2009), así como Serviddio y colaboradores quienes también encontraron mayores niveles de aductos del MDA e hidroxil-2,3-nonanal y del ratio GSSG/GSH en los individuos frágiles, en comparación con los no frágiles (Serviddio *et al.*, 2009). Estos valores encontrados en personas mayores de 65 años son además, significativamente superiores a los valores medios encontrados por nuestro grupo en los grupos de adultos sanos (1,76  $\mu$ M [0,90; 2,3]).

#### **4.2.6 REVISIÓN DE LOS VALORES DE GLUTATIÓN Y MDA, MEDIDOS POR HPLC, PUBLICADOS EN LOS ÚLTIMOS AÑOS POR NUESTRO GRUPO.**

Los resultados obtenidos para los parámetros de glutatión en muestras de sangre y para MDA en plasma, publicados por el grupo de investigación del Dr. José Viña desde el año 1989 al 2008 se exponen a continuación en las *Tablas* nº 4.20 y 4.21. En la primera tabla se presentan las medias obtenidas de todos los

grupos control considerados como humanos sanos en cada una de las publicaciones. En la siguiente tabla se recogen las medias obtenidas en los grupos de humanos en "condiciones especiales" de cada una de las publicaciones expuestas. Como ya se anotado en el capítulo correspondiente a los datos obtenidos en ratones, los valores del cociente (GSSG/GSH)% que no se han publicado en los artículos correspondientes, se han calculado a partir de las medias estadísticas de los parámetros GSSG y GSH, por lo que se presentan entre paréntesis sin desviación estándar.

GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	SANGRE			
		(GSSG/GSH)%	GSH (mM)	GSSG (mM)	MDA (µM) (PLASMA)
<b>RECIÉN NACIDOS</b>	<i>Recién nacidos de 40 semanas sin asfixia. (Vento et al., 2001)</i>	(1,99) n=26	1,005 ± 0,157 (n=26)	0,020 ± 0,005 (n=26)	
	<i>Recién nacidos de 40 semanas con asfixia moderada, reanimados con aire ambiental. (Vento et al., 2001)</i>	(5,15) n=19	0,970 ± 0,160 (n=19)	0,050 ± 0,007 (n=19)	
	<i>Sangre de la arteria umbilical de recién nacidos control. (Vento et al., 2002)</i>	(2,15) n=54	1,025 ± 0,16 (n=54)	0,022 ± 0,007 (n=54)	
	<i>Sangre de la arteria umbilical de recién nacidos reanimados con aire ambiental (Vento et al., 2002)</i>	(6,39) n=65	0,955 ± 0,154 (n=65)	0,061 ± 0,007 (n=65)	
	<i>Sangre de la arteria umbilical de recién nacidos control. (Vento et al., 2003)</i>	(2,15) n=22	1,025 ± 0,166 (n=22)	0,022 ± 0,007 (n=22)	
	<i>Sangre de la arteria umbilical de recién nacidos reanimados con aire del 21% O2 ambiental). (Vento et al., 2003)</i>	(10,92) n=51	0,760 ± 0,110 (n=51)	0,083 ± 0,010 (n=51)	
	<i>Sangre de la arteria umbilical de recién nacidos control. (Vento et al., 2005)</i>	(2,61) n=20	0,995 ± 0,116 (n=20)	0,026 ± 0,008 (n=20)	
	<i>Sangre de la arteria umbilical de recién nacidos reanimados con aire ambiental (Vento et al., 2005)</i>	(7,79) n=17	0,898 ± 0,105 (n=17)	0,070 ± 0,010 (n=17)	
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>(5,05)</b> [1,99; 10,92] n=274	<b>0,95</b> [0,65 ; 1,19] (n=274)	<b>0,048</b> [0,015 ; 0,093] (n=274)	

<b>JÓVENES SANOS</b>	<i>Humanos jóvenes sin realizar ejercicio. (Sastre et al., 1992a)</i>	(3,62) n=15	0,80 ± 0,30 (n=19)	0,029 ± 0,010 (n=15)	
	<i>CONTROL SIN EJERCICIO (hombres atletas, no profesionales y bien entrenados, de 24 años de media y 75 kg/175 cm de media). (Vina et al., 2000a)</i>	(4,20) n=3	1,07 ± 0,06 (n=4)	0,045 ± 0,011 (n=3)	
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>(3,82)</b> n=19	<b>0,84</b> [0,50 ; 1,13] (n=24)	<b>0,032</b> [0,019 ; 0,056] (n=19)	
<b>ADULTOS SANOS</b>	<i>Controles sanos (adultos voluntarios). (Vina et al., 2000a)</i>	(3,65) n=19	0,80 ± 0,30 (n=19)	0,029 ± 0,01 (n=19)	
	<i>Controles: adultos voluntarios y sedentarios. (Vina et al., 2000a).</i>	(5,35) n=5	0,841 ± 0,32 (n=5)	0,045 ± 0,007 (n=5)	
	<i>Grupo control: humanos sanos sin consumo crónico de alcohol. (Minana et al., 2002)</i>	4,10 ± 0,80 (n=8)	1,22 (n=8)	0,050 ± 0,010 (n=8)	2,30 ± 0,50 (n=8)
	<i>Grupo control de los pacientes diabéticos (Desco et al., 2002)</i>	2,31 ± 1,57 (n=5)	0,919 ± 0,069 (n=5)	0,021 ± 0,014 (n=5)	0,90 ± 0,35 (n=5)
	<i>Pacientes control de 57 años (Lloret et al., 2009).</i>	2,2 ± 0,90 (n=9)	1,14 (n=9)	0,025 ± 0,012 (n=9)	
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>3,45</b> [ 1,3; 5,35] (n=46)	<b>0,96</b> [0,50 ; 1,22] (n=46)	<b>0,032</b> [0,007; 0,060] (n=46)	<b>1,76</b> [0,55 ; 2,80] (n=13)
<b>CULTIVO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE PULMÓN (obtenido de toracotomías de pacientes )</b>					
GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	(GSSG/GS H)%	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	MDA (nmol/mg protein)
<b>ADULTOS SANOS</b>	<i>Control. (Cortijo et al., 1999)</i>	0,71 ± 0,28 (n=5)	17 ± 2,00 (n=5)	0,081 ± 0,03 (n=5)	7,80 ± 0,83 (n=5)

**Tabla 4.20** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en **sangre, plasma** y en **cultivos** de células de músculo liso, de los valores de los parámetros de (GSSG/GSH)%, GSH, GSSG y MDA en grupos controles de humanos, obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989

		SANGRE			
GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	(GSSG/GSH) %	GSH (mM)	GSSG (mM)	MDA (µM) PLASMA
RECIÉN NACIDOS REANIMADOS 100% O <sub>2</sub>	<i>Recién nacidos de 40 semanas con asfixia moderada, reanimados con 100% oxígeno. (Vento et al., 2001)</i>	(4,57) n=21	1,290 ± 0,160 (n=21)	0,059 ± 0,005 (n=21)	
	<i>Sangre de la arteria umbilical de recién nacido reanimados con 100% oxígeno. (M. Vento et al. 2002)</i>	(5,83) n=69	1,150 ± 0,150 (n=69)	0,067 ± 0,009 (n=69)	
	<i>Sangre de la arterial umbilical de recién nacidos reanimados con 100% O<sub>2</sub>. (Vento et al., 2003)</i>	(12,05) n=55	0,83± 0,10 (n=55)	0,10 ± 0,138 (n=55)	
	<i>Sangre de la arterial umbilical de recién nacidos reanimados con 100% O<sub>2</sub>. (Vento et al., 2005)</i>	(5,88) n=22	1,020± 0,148 (n=22)	0,060± 0,008 (n=22)	
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA: SITUACIONES ESTRESANTES</b>	<b>7,75</b> [4,57; 12,05] (n=167)	<b>1,04</b> [0,73 ; 1,45] (n=167)	<b>0,058</b> [0,052 ; 0,238] (n=167)	
JÓVENES EN SITUACIONES ESTRESANTES	<i>Humanos jóvenes tras 20 minutos con ejercicio extenuante. (Sastre et al., 1992a)</i>	(7,5) n=10	0,80 ± 0,14 (n=10)	0,060 ± 0,015 (n=10)	
	<i>Humanos jóvenes 30 minutos después del ejercicio extenuante (Sastre et al., 1992a)</i>	(9,55) n=3	0,45 ± 0,16 (n=3)	0,043 ± 0,015 (n=3)	
	<i>Humanos jóvenes 60 minutos después del ejercicio extenuante (Sastre et al., 1992a)</i>	(7,0) n=3	0,30 ± 0,13 (n=3)	0,021 ± 0,09 (n=3)	
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>7,73</b> [7,00 ; 9,55] (n=16)	<b>0,65</b> [0,27 ; 0,81] (n=16)	<b>0,049</b> [0,012 ; 0,075] (n=16)	

<b>JÓVENES EN CONDICIONES ANTIOXIDANTES</b>	<i>Hombres atletas, no profesionales y bien entrenados, de 24 años de media y 75 kg/175 cm de media).(Viña et al., 2000a)</i>	(5,38) n=3	1,17 ± 0,18 (n=3)	0,063 ± 0,015 (n=3)	
	<i>Jóvenes sin ejercicio + Alopurinol (8 mg/350 µL dimethyl sulfóxido+ 650 µL agua) inyectada peritonealmente. (Viña et al., 2000a)</i>	(4,40) n=3	1,16 ± 0,13 (n=3)	0,051 ± 0,004 (n=3)	
	<i>Jóvenes con ejercicio + Alopurinol (8 mg/350 µL dimethyl sulfóxido+ 650 µL agua) inyectada peritonealmente. (Viña et al., 2000a)</i>	(4,70) n=3	1,19 ± 0,24 (n=3)	0,056 ± 0,009 (n=3)	
	<b>MEDIAS E INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	<b>4,82</b> [4,40 ; 5,38] (n=9)	<b>1,17</b> [0,90 ; 1,43] (n=9)	<b>0,06</b> [0,051 ; 0,078] (n=9)	
<b>ADULTOS EN SITUACIONES FISIOPATOLÓGICAS Y/O SITUACIONES ESPECIALES</b>	<i>Adultos con COP (Obstrucción Crónica Pulmonar). (Vina et al., 1996)</i>	(2,83) n=9	0,88 ± 0,17 (n=9)	0,025 ± 0,13 (n=9)	
	<i>Pacientes varones enfermos de COP (de 64 años).(Heunks et al., 1999)</i>	4,6 ± 0,9 (n=8)	0,88 ± 0,02 (n=8)	0,04 ± 0,005 (n=8)	0,68 ± 0,08 (n=8)
	<i>Pacientes con COP. (Viña et al., 2000b)</i>	(4,02) n=5	0,77 ± 0,062 (n=5)	0,031 ± 0,007 (n=5)	0,55 ± 0,20 (n=5)
	<b>Medias e intervalos de referencia de enfermos de COP</b>	<b>3,72</b> [2,830; 4,6] (n=22)	<b>0,86</b> [0,77 ; 1,05 ] (n=22)	<b>0,032</b> [0,012 ; 0,04] (n=22)	<b>0,63</b> [0,35 ; 0,76] (n=13)
	<i>Pacientes con COP, 3 min. después de un ejercicio leve. (Viña et al., 2000b)</i>				1,25 ± 0,5 (n=5)
	<i>Pacientes con COP, 60 min. después de un ejercicio leve. (Viña et al., 2000b)</i>				1,50 ± 0,75 (n=5)

<b>Pacientes con episodios de apnea severa</b> (con + de 50 hipoapneas/hora y saturación O <sub>2</sub> <70%). (Lloret et al., 2007)	(21,34) n=12	0,670± 0,25 (n=12)	0,143± 0,083 (n=12)	2,00 ± 0,98 (n=12)
Mujeres con <b>cáncer de mama</b> . (Navarro et al., 1997)	(2,51) n=12	0,995 ± 0,19 (n=12)	0,025 ± 0,006 (n=12)	
Humanos de ambos sexos con <b>cáncer de pulmón</b> . (Navarro et al., 1997)	(2,50) n=12	1,037 ± 0,098 (n=12)	0,026 ± 0,005 (n=12)	
<b>Pacientes Diabéticos Tipo 1</b> (toman 300 mg de alopurinol/día) durante 14 días. (Desco et al., 2002)	7,64 ± 4,62 (n=12)	0,894 ± 0,145 (n=12)	0,070 ± 0,035 (n=12)	1,61 ± 0,82 (n=12)
Humanos <b>con cirrosis por alcohol pero sin consumirlo</b> al menos en 5 meses. (Minana et al., 2002)	4,2 ± 2,8 (n=11)	(1,00)	0,042 ± 0,015 (n=11)	2,70 ± 0,55 (n=11)
Humanos <b>con cirrosis por alcohol con consumo continuado</b> del mismo. (Minana et al., 2002)	7,0 ± 1,6 (n=8)	(1,13)	0,079 ± 0,020 (n=8)	3,51 ± 0,45 (n=8)
Humanos sin enfermedad hepática pero con <b>consumo crónico de alcohol</b> . (Minana et al., 2002)	8,2 ± 2,8 (n=11)	(1,34)	1,10 ± 0,030 (n=11)	5,90 ± 2,05 (n=11)
Pacientes anestesiados con un 30% de oxígeno para una <b>cirugía de colon</b> . (García de la Asunción et al., 2007).	(5,62) n=15	0,80 ± 0,10 (n=15)	0,045 ± 0,015 (n=15)	0,65 ± 0,25 (n=15)
Pacientes anestesiados con un 80% de oxígeno para una <b>cirugía de colon</b> . (García de la Asunción et al., 2007).	(3,33) n=15	0,90 ± 0,30 (n=15)	0,030 ± 0,010 (n=15)	0,50 ± 0,30 (n=15)
Pacientes de 57 años con <b>enfermedad de Alzheimer (con demencia severa)</b> . (Lloret et al., 2009)	4,5± 0,95 (n=9)	(1,11)	0,050 ± 0,020 (n=9)	7,4 ± 0,020 (n=33)

Adultos voluntarios y sedentarios después de <b>ejercicio físico extenuante</b> . (Vina et al., 2000b)	(12,5) n=5	0,664 ± 0,10 (n=5)	0,083 ± 0,009 (n=5)	
<b>Corredores de maratón</b> (37 años ± 8 años) con muestreo previo a la carrera.(Gomez-Cabrera et al., 2006).				0,80± 0,3 (n=25)
<b>Corredores de maratón</b> ,37 años ± 8 años, (suministrando Alopurinol:300 mg oralmente, 2h antes de la carrera y con <u>muestreo previo a la carrera</u> ). (Gomez-Cabrera et al., 2006)				1,15± 0,3 (n=25)
<b>Corredores de maratón</b> , 37 años ± 8 años,(suministrando Alopurinol:300 mg oralmente, 2h antes de la carrera y <u>con muestreo posterior a la carrera</u> ). (Gomez-Cabrera et al., 2006)				1,00± 0,28 (n=25)
<b>INTERVALOS DE REFERENCIA</b>	[ 2,5; 12,5 ] (n=73)	[0,56 ; 1,34 ] (n=75)	[0,019 ; 1,13] (n=144)	[0,40 ; 7,42] (n=215)

## ANÁLISIS EN MUESTRAS DE NEUTRÓFILOS

GRUPO DE EDAD	REFERENCIA DE LA PUBLICACIÓN	(GSSG/GS H)%	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	MDA(n mol/mg protein )
<b>ADULTOS</b>	<i>Pacientes con COP (con pérdida de músculo pulmonar), no fumadores, antes de ejercicio.</i> (Van Helvoort et al., 2006)	5,40± 1,0 (n=10)	1,103± 0,08 (n=10)	0,052± 0,06 (n=10)	<b>TBARS</b> 0,70± 0,1 (n=10)
	<i>Pacientes con COP (con pérdida de músculo pulmonar), no fumadores, después de ejercicio en bicicleta hasta extenuación.</i> (Van Helvoort et al., 2006).	6,00± 1,0 (n=10)	0,803± 0,08 (n=10)	0,059± 0,05 (n=10)	<b>TBARS</b> 0,80± 0,15 (n=10)
	<i>Pacientes con COP (con pérdida de músculo pulmonar), fumadores, antes de ejercicio.</i> (Van Helvoort et al., 2006).	7,10± 1,3 (n=20)	0,777± 0,05 (n=20)	0,049± 0,005 (n=20)	<b>TBARS</b> 1,05±0,2 (n=20)

Pacientes con COP (con pérdida de músculo pulmonar), fumadores, después de ejercicio en bicicleta hasta extenuación. (Van Helvoort et al., 2006)	12,10± 1,1 (n=20)	0,663± 0,08 (n=10)	0,062± 0,005 (n=10)	<b>TBARS</b> 1,40±0 ,215 (n=20)
--	----------------------	--------------------------	---------------------------	--

**Tabla 4.21** Valores medios y desviaciones estándar, medidos en **sangre, plasma** y en **cultivos celulares de músculo liso**, de los valores de los parámetros de (GSSG/GSH)%, GSH, GSSG y MDA, en humanos en condiciones especiales o en situaciones fisiopatológicas, obtenidos de las citas bibliográficas desde 1989

Recopilando los resultados de las *tablas 4.20 y 4.21* junto a los obtenidos en los capítulos previos (*tablas 4.14, 4.15, 4.16 y 4.17*), obtenemos el conjunto de medias y sus correspondientes valores umbrales para los niveles de GSH, GSSG y (GSSG/GSH)% en sangre y MDA en plasma a lo largo de las etapas de un ser humano sano que presentamos en la **tabla 4.22**.

	<b>GSH (mM )</b>	<b>GSSG (mM)</b>	<b>(GSSG/GSH) %</b>	<b>MDA (µM)</b>
<b>RECIÉN NACIDOS</b>	<b>0,95</b> [0,65 ; 1,19]	<b>0,048</b> [0,015 ; 0,093]	<b>5,05</b> [1,99 ; 10,92]	
<b>NIÑOS</b>	<b>1,19 ***</b> [0,78 ; 1,60]	<b>0,026***</b> [0,016 ; 0,036]	<b>2,18 ***</b> [1,58 ; 2,78]	<b>0,63</b> [0,41 ; 0,85]
<b>JÓVENES</b>	<b>0,94***</b> [0,50 ; 2,16]	<b>0,019***</b> [0,015; 0,056]	<b>5,42 ***</b> [3,62 ; 8,40]	<b>0,85 ***</b> [0,62 ; 1,22]
<b>ADULTOS</b>	<b>1,05 *</b> [0,49 ; 2,17]	<b>0,044*</b> [0,007 ; 0,13]	<b>3,67***</b> [1,3 ; 14,55]	<b>1,25 ***</b> [0,36; 2,8]
<b>ANCIANOS</b>				<b>2,54***`</b> [2,19; 3,63]

**Tabla 4.22** Valores medios de GSH, GSSG y (GSSG/GSH)% en sangre y MDA en plasma, con sus valores umbrales durante las etapas de la vida de un ser humano sano, desde el nacimiento hasta la edad adulta, con las medias de MDA para ancianos (desde no frágiles hasta frágiles). La significación estadística respecto a los recién nacidos o niños (en el caso de MDA) se expresa como \*P<0,05 y \*\*\*P<0,001

Como puede apreciarse en la *tabla 4.22*, nos encontramos con unos valores especialmente altos de GSSG y (GSSG/GSH)% en el recién nacido, acompañados de unos bajos niveles de GSH. Valores que irán deviniendo en la etapa infantil y juvenil hacia una mejora del componente antioxidante (teniendo sus mejores

condiciones en los niños), pero que, sin embargo, en la etapa adulta vuelven a aparecer como niveles altos de oxidación en sangre.

Los valores obtenidos por nuestro grupo son concordantes con los obtenidos por otros grupos que utilizan la misma metodología. Moreto y colaboradores (Moreto *et al.*, 2014) estudiaron el impacto del síndrome metabólico sobre los niveles del MDA en plasma, determinándolo por HPLC. Los resultados obtenidos fueron de  $0,80 \pm 0,28 \mu\text{M}$  en personas sanas, con una media de 37 años de edad y unas concentraciones significativamente diferentes en adultos con síndrome metabólico ( $0,95 \pm 0,34 \mu\text{M}$  MDA).

En cuanto a los valores medios de glutatión en sangre, nuestros resultados también están de acuerdo con la bibliografía, puesto que, como es sabido, en el interior celular la mayoría de GSH se encuentra en el citosol, con concentraciones que van desde 1 hasta 11 mM, mientras que las concentraciones de GSSG son mucho más bajas (Smith *et al.*, 1996). Así mismo, en el plasma de adultos sanos, el rango de concentraciones de GSH oscila entre 2 a 4  $\mu\text{M}$ , con un potencial redox GSH/GSSG de aproximadamente  $-137 \pm 9$  mV (medido según Ecuación de Nerst) (Jones *et al.*, 2000). Al medir nuestro grupo los niveles de GSH y GSSG en sangre total, nuestros valores deben de estar por encima de los resultados publicados por los autores que lo miden en plasma.

Anne M. Fitzpatrick y colaboradores (Fitzpatrick *et al.*, 2012b) realizaron un exhaustivo estudio sobre los niveles de glutatión en humanos sanos y en humanos asmáticos, en el que reportan unos valores de 2-4  $\mu\text{M}$  de GSH en el plasma de adultos sanos, determinándolo por HPLC. Nuestras investigaciones recogen valores desde 0,49 a 2,17 mM de GSH en adultos sanos, más altos (como es esperable) al reflejar el contenido del GSH en sangre. Wood LG y colaboradores (Wood *et al.*, 2008), en otro estudio con humanos sanos y enfermos establecen valores similares a los de nuestro grupo, obteniendo 0,025 [0,007 - 0,042] mM de GSSG y 0,91 [0,67 - 0,10] mM de GSH en sangre, para adultos sanos.

Respecto a nuestro objetivo de poder determinar valores umbrales que delimiten una situación fisiológica de otra patológica para humanos, a la vista de los datos expuestos, tenemos que concluir que no existen unos valores a partir

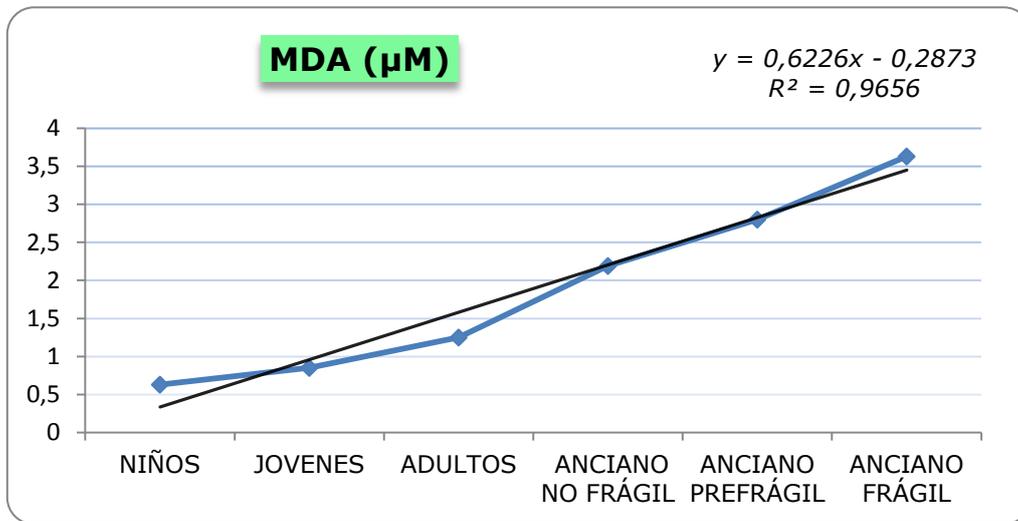
de los cuales podemos distinguir una situación fisiológica de una situación patológica. Valga como ejemplo la bibliografía recogida sobre recién nacidos en las tablas 4.20 y 4.21: la media de GSSG en sangre en los sanos es de 0,048 mM, con valores umbrales en el grupo entre 0,015mM y 0,093mM, sin embargo en el grupo de los recién nacidos reanimados con 100% de oxígeno la media obtenida para este mismo parámetro es de 0,058mM, con un valor umbral inferior que coincide con valores de un recién nacido sano (0,052 mM). Otra consideración merece el valor umbral superior de GSSG en recién nacidos con reanimación pulmonar 100% oxígeno (0,238 mM), un nivel en sangre muy alejado del máximo valor encontrado en los recién nacidos que no necesitaron reanimación, por lo que este dato "por sí mismo" sí que es un indicador de la existencia de alguna patología en un recién nacido.

#### **4.2.7 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS VALORES MEDIOS E INTERVALOS DE REFERENCIA DE LOS PARÁMETROS MEDIDOS EN HUMANOS SANOS Y EN SITUACIONES ESPECIALES O FISIOPATOLÓGICAS, RECOPIADOS TRAS LOS ESTUDIOS.**

Al ser objetivo de la presente tesis el encontrar valores medios e intervalos de referencia de los parámetros GSH, GSSG y (GSSG/GSH)% en sangre y MDA en plasma, en las diferentes etapas de un ser humano, tanto en sujetos sanos como para sujetos en condiciones especiales o fisiopatológicas, se compararán todas las medias de humanos expuestas en esta tesis mediante gráficos. Para ello presentamos las **Figuras 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12.**

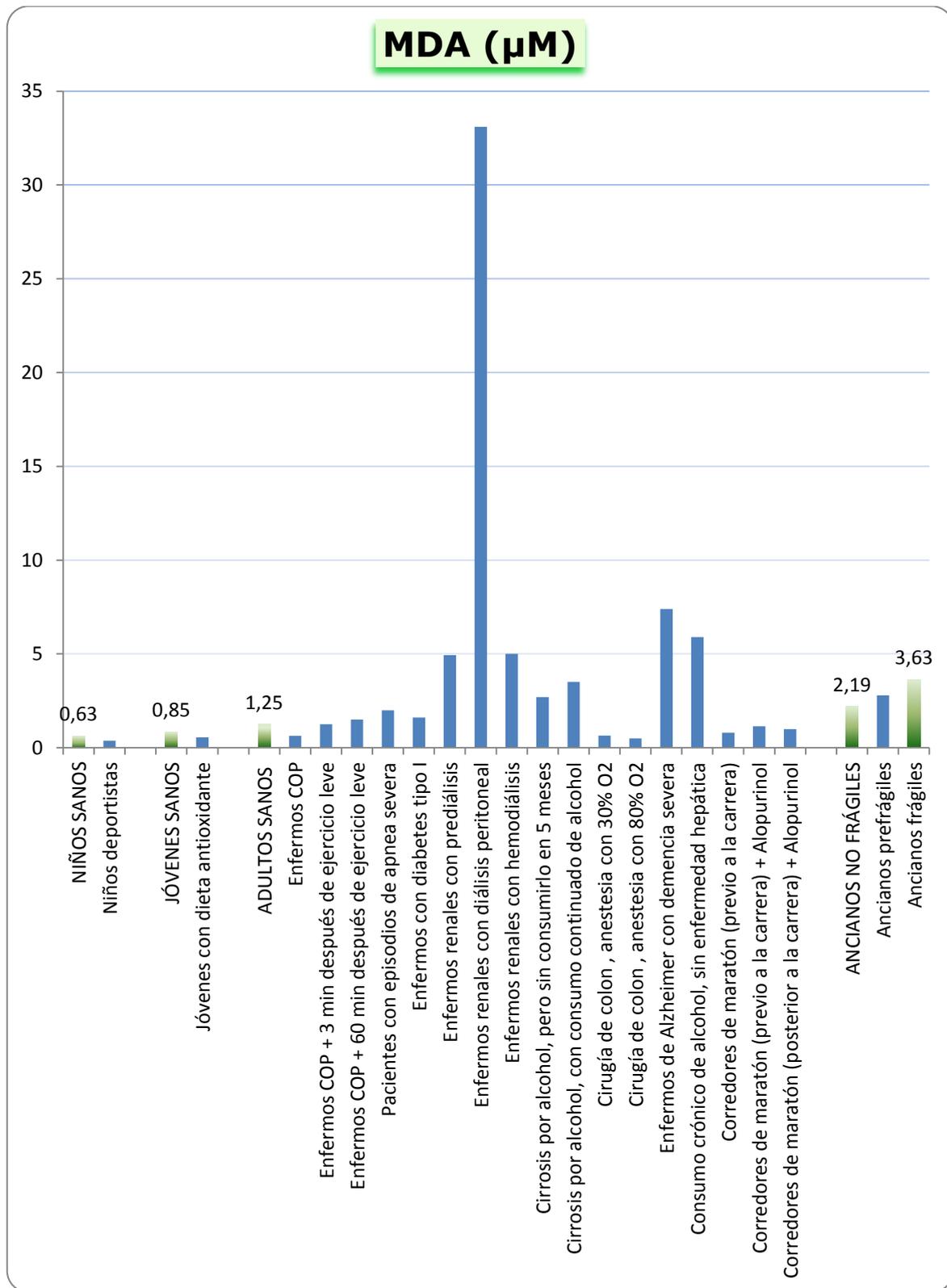
Mención especial hay que hacer a los niveles de MDA en plasma. Como se observa en la *Figura 4.9*, la evolución de estos valores desde la etapa infantil hasta la etapa de vejez de un anciano con la condición de frágil, se puede ajustar a una regresión lineal, llegando en la etapa de vejez del ser humano a sus niveles más altos (incluyendo la condición de fragilidad en una persona anciana). En vista de estos resultados, aunque no podamos definir valores umbrales que delimiten las etapas entre niños, jóvenes, adultos y ancianos, sí que encontramos valores medios representativos de cada una de estas etapas. Así, un valor de 0,63  $\mu$ M MDA en plasma nos indica que el sujeto del que procede es

un humano muy joven o en el lado opuesto, un valor de 2,80  $\mu\text{M}$  MDA en plasma es indicativo de una edad avanzada en el ser humano.

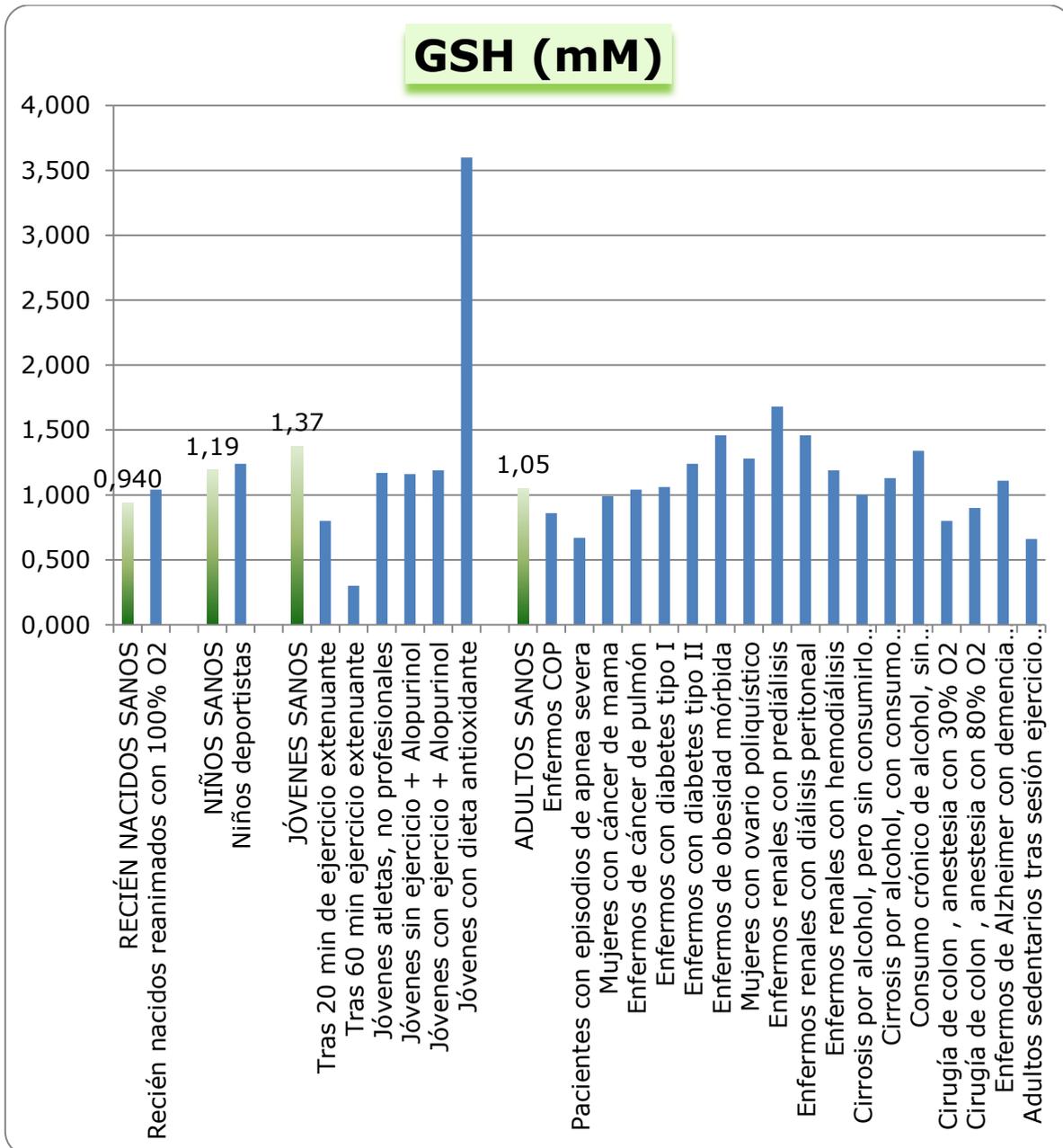


**Figura 4.9** Representación gráfica de la evolución de los valores medios de MDA en un humano sano desde la etapa infantil hasta la vejez

Al comparar las medias de los niveles de MDA en plasma entre humanos sanos y humanos en condiciones especiales o patológicas en la *Figura 4.10*, se hace patente el elevadísimo nivel de peroxidación lipídica encontrado en el plasma de los pacientes sometidos a diálisis peritoneal, presentando un incremento del 2648% respecto a la media de adultos sanos. En la misma gráfica también podemos comprobar los beneficios proporcionados tanto por el ejercicio físico en el grupo de niños (al disminuir sus niveles de MDA plasmático en un 40%), como por una dieta antioxidante en un grupo de jóvenes (disminuyendo sus niveles de MDA un 34%).

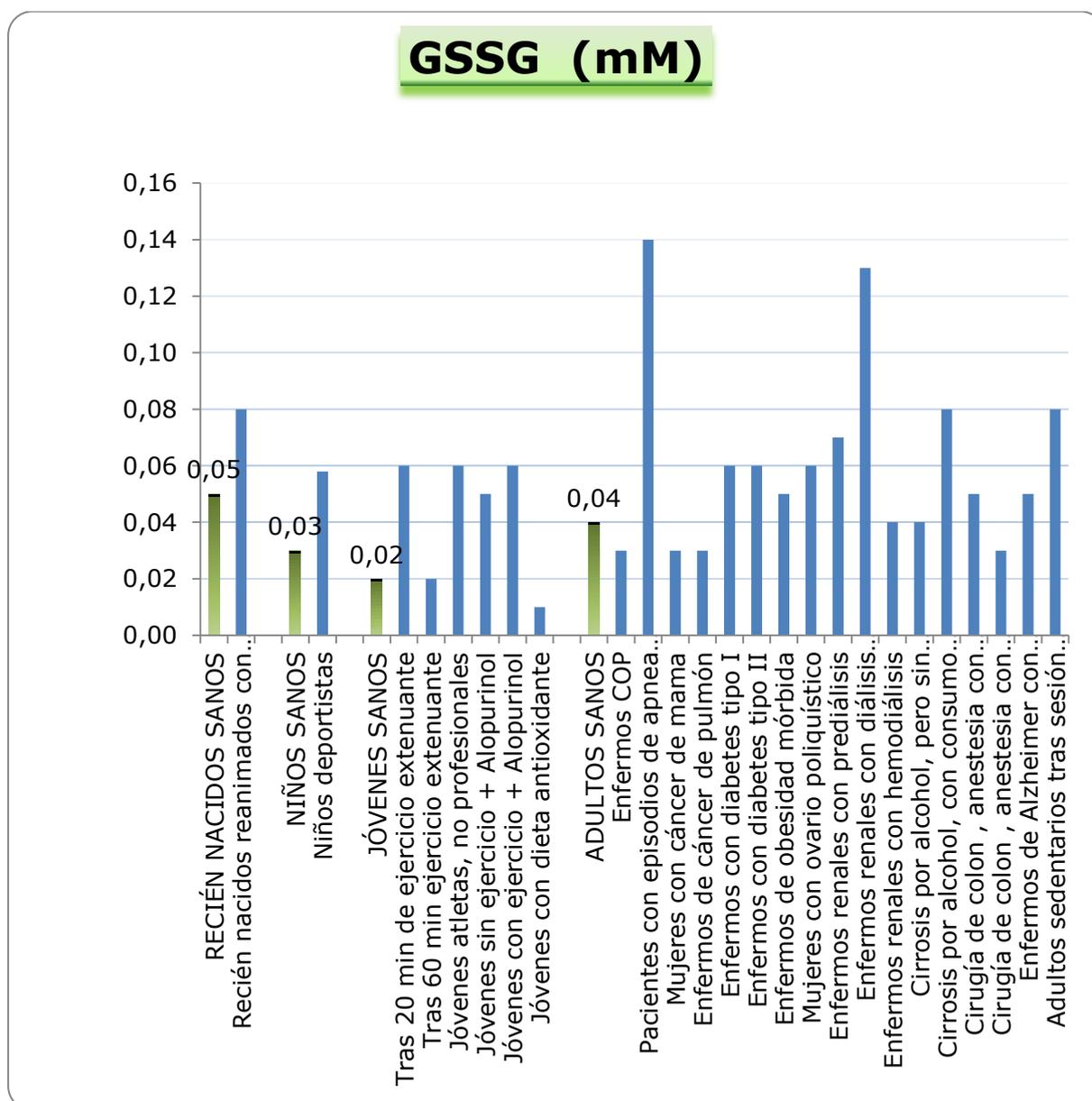


**Figura 4.10** Comparación de los valores de MDA considerados en recién nacidos, niños, jóvenes, adultos y ancianos en condiciones especiales y en diversas situaciones patológicas respecto a las medias obtenidas en humanos sanos



**Figura 4.11** Comparación de los valores de GSH (mM) en sangre, considerados en recién nacidos, niños, jóvenes y adultos en condiciones especiales y en diversas situaciones patológicas respecto a las medias obtenidas en humanos sanos

En la *Figura 4.11* podemos comprobar el enorme beneficio proporcionado por una dieta antioxidante del pimentón de la Vera en jóvenes sanos al elevar sus niveles medios de GSH en sangre desde 0,94 mM a 3,60 mM (un 282%). En contraposición, el efecto más negativo sobre estos niveles de GSH se observa también en sujetos jóvenes y es ocasionado por una sesión de ejercicio extenuante de 60 minutos de duración, la cual llega a disminuir los niveles iniciales en un 68%.



**Figura 4.12** Comparación de los valores de GSSG (mM) en sangre considerados en recién nacidos, niños, jóvenes y adultos en condiciones especiales y en diversas situaciones patológicas respecto a las medias obtenidas en humanos sanos

La Figura 4.12 nos muestra el marcado aumento en los niveles de GSSG en sangre que presentan los pacientes con episodios de apnea severa, quienes aumentan sus niveles de GSSG desde una media de 0,04mM para adultos sanos a un valor de 0,14 mM, seguidos por los enfermos renales con diálisis peritoneal, quienes ven aumentados sus niveles de GSSG en un 225%. En cuanto a la reducción de GSSG en sangre, una dieta antioxidante en jóvenes sanos es el procedimiento más efectivo, consiguiendo disminuir dichos niveles un 50% respecto a la media (0,02 mM), en comparación con los procedimientos expuestos.





## **CONCLUSIONES**



## 5 CONCLUSIONES

En base a los resultados recogidos en esta Memoria, podemos concluir:

**1. El envejecimiento, en ratones, se asocia con un aumento en los parámetros de estrés oxidativo estudiados en la presente tesis. Los valores de referencia encontrados son los siguientes:**

- En plasma: 0,17  $\mu$ M de MDA [0,04 - 0,31] en jóvenes de 3-6 meses vs 0,25 [0,18 - 0,32]  $\mu$ M en ratones de 28 meses.
- En sangre de ratones jóvenes:
  - ✓ GSSG: 0,013 mM [0,001 - 0,04].
  - ✓ GSH: 0,86 mM [0,36 - 1,38].
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 1,34 [0,3 - 3,70].
- En hígado:
  - ✓ MDA: 1,7 [1,49 - 1,91] nmol/g tejido o bien 2,70 [2,1 - 3,3] nmol/mg proteína en ratones jóvenes vs 1,69 [0,43 - 2,95] nmol/mg proteína en viejos.
  - ✓ GSSG: 0,14 nmol/mg tejido [0,02 - 0,25] en jóvenes vs 0,28 nmol/mg tejido [0,17 - 0,46] en viejos.
  - ✓ GSH: 6,88 nmol/mg tejido [4,00 - 9,58] vs 4,6 nmol/mg tejido [3,90 - 5,30] en viejos.
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 1,56 [0,42 - 3,8] en jóvenes vs 3,63 en viejos [1,09 - 6,15].
- En mitocondrias de hígado:
  - ✓ MDA (ratón de 3 meses): 2,10 [1,20 - 3,80] nmol/mg proteína.
  - ✓ MDA (ratón de 23 meses): 5,80 [4,6 - 7,00] nmol/mg proteína.
- En hepatocitos:
  - ✓ GSSG: 0,11 [0,02 - 0,20] nmol/mg hepatocitos.
  - ✓ GSH: 6,10 [4,4 - 7,8] nmol/mg hepatocitos.

- En cerebro:
  - ✓ GSSG: 0,027 nmol/mg tejido [0,013 - 0,045] en jóvenes vs 0,057 nmol/mg tejido en viejos [0,039 - 0,075].
  - ✓ GSH: 1,45 nmol/mg tejido [0,8 - 1,72] en jóvenes vs a 1,15 nmol/mg tejido [0,90 - 1,40] en viejos.
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 1,87 [1,25 - 2,28] en jóvenes vs 4,96 [4,75 - 5,18] en viejos.
- En mitocondrias de cerebro:
  - ✓ GSSG: 0,00033 [0,0002 - 0,00046] nmol/mg tejido en jóvenes vs 0,0019 [0,0017 - 0,0021] en viejos.
  - ✓ GSH: 0,04 [0,02 - 0,05] nmol/mg tejido en jóvenes vs 0,016 [0,012 - 0,02] en viejos.
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 0,91 en jóvenes frente a 11,8 en viejos.

**2. En distintas situaciones fisiopatológicas en ratones (tumor ascítico, irradiación con rayos X, dieta altamente energética, tratamiento con AZT como droga contra el virus VIH), se produce un aumento generalizado en la lipoperoxidación acompañado de un descenso en los niveles de GSH. Sin embargo, no en todos los casos, se produce un incremento de los niveles de GSSG. Los valores de referencia encontrados son los siguientes:**

- En plasma: 0,37 [0,27; 0,47]  $\mu$ M de MDA en jóvenes.
- En sangre:
  - ✓ GSSG: 0,022 [0,009 - 0,062] mM .
  - ✓ GSH: 0,53 [0,06 - 1,16] mM .
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 2,63 [0,60 - 6,30].
- En hígado:
  - ✓ MDA: 2,70 [2,1 - 3,3] nmol/mg proteína.
  - ✓ GSSG: 0,07 [0,04 - 0,10] nmol/mg tejido.
  - ✓ GSH: 1,67 [1,30 - 1,99] nmol/mg tejido .

- ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 1,36 [0,46 - 2,10].
- En hepatocitos aislados:
  - ✓ GSSG: 0,06 [0,05 - 0,07] nmol/mg hepatocitos.
  - ✓ GSH: 3,40 [2,90 - 3,9] nmol/mg hepatocitos.
- En cerebro:
  - ✓ GSSG: 0,02 [0,01 - 0,04] nmol/mg tejido en jóvenes a 0,05 [0,03 - 0,07] nmol/mg tejido en viejos.
  - ✓ GSH: 1,67 [1,30 - 1,99] nmol/mg tejido en jóvenes a 1,33 [0,70 - 2,00] nmol/mg tejido en viejos.
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 1,33 en jóvenes a 3,78 en viejos.
- En mitocondrias de cerebro:
  - ✓ GSSG: 0,00044 [0,00032 - 0,00056] nmol/mg tejido en viejos.
  - ✓ GSH: 0,022 [0,015 - 0,029] nmol/mg tejido en viejos.

**3. Los valores de referencia obtenidos en humanos sanos, en humanos en condiciones fisiopatológicas (como la reanimación en recién nacidos con O<sub>2</sub> 100%, pacientes con obstrucción crónica pulmonar (COP), pacientes con COP y tras realizar ejercicios leves, pacientes con episodios de apnea severa, enfermos con cáncer de pulmón, pacientes con diabetes, enfermos renales, adultos con cirrosis, enfermos tras cirugía de colon, mujeres con cáncer de mama, mujeres con ovario poliquístico, enfermos de Alzheimer) o bien en situaciones especiales (entrenamiento físico, tratamiento antioxidante) a lo largo de las etapas de la vida son:**

- En sangre de recién nacidos:
  - ✓ GSSG: 0,05 mM [0,015 - 0,093] en recién nacidos sanos a 0,06 mM [0,05 - 0,24] en recién nacidos con reanimación asistida.
  - ✓ GSH: 0,95 mM [0,65 - 1,19] en recién nacidos sanos a 1,04 mM [0,73 - 1,04] en recién nacidos con reanimación asistida.

- ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 5,05 [1,99 - 10,92] en recién nacidos sanos a 7,75 mM [4,57 - 12,05] en recién nacidos con reanimación asistida.
- En sangre de niños:
  - ✓ MDA en plasma: 0,63 [0,41 - 0,85]  $\mu$ M.
  - ✓ GSSG: 0,026 [0,025 - 0,027] mM.
  - ✓ GSH: 1,19 [0,78 - 1,6] mM.
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 2,18 [1,58 - 2,78].
- En sangre de jóvenes:
  - ✓ MDA en plasma: 0,85 [0,62 - 1,22]  $\mu$ M y 0,56  $\mu$ M [0,44 - 0,68] con una dieta antioxidante.
  - ✓ GSSG: 0,022 [0,014 - 0,045] mM en sanos, disminuyendo hasta 0,017 [0,009 - 0,063] mM en condiciones antioxidantes (bien ejercicio físico o con dieta antioxidante) y elevándose a 0,049 [0,012 - 0,075] mM por efecto del ejercicio extenuante.
  - ✓ GSH: 0,94 [0,50 - 2,16] mM en sanos, subiendo a 2,71 [0,90 - 3,74] mM en condiciones antioxidantes (ejercicio físico o toma de antioxidantes) y bajando a valores de 0,65 [0,27 - 0,81] mM por el efecto de sesiones con ejercicio extenuante.
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 5,42 de media en sanos [3,62 - 6,00], que disminuye a 4,31 [1,10 - 5,38] en condiciones antioxidantes (ejercicio físico o dieta antioxidante) y se eleva a 7,73 [7,00 - 9,55] cuando una persona joven realiza sesiones de ejercicio extenuante.
- En sangre de adultos:
  - ✓ MDA en plasma: 1,25 [0,4 - 2,3]  $\mu$ M en sanos vs 3,28 [0,5 - 4,94]  $\mu$ M en situaciones fisiopatológicas.
  - ✓ GSSG: 0,044 [0,01 - 0,13] mM en sanos vs 0,102 [0,025 - 1,10] mM en situaciones fisiopatológicas.
  - ✓ GSH: 1,05 [0,49 - 2,17] mM en sanos vs 1,07 [0,66 - 1,68] mM en situaciones fisiopatológicas.
  - ✓ Cociente (GSSG/GSH)%: 3,67 [1,30 - 14,55] en sanos vs 5,81 [2,50 - 21,34].

- En personas ancianas:
  - ✓ MDA en plasma: 2,19 [0,15 - 4,23]  $\mu\text{M}$  en ancianos no frágiles, 2,80 [0,14 - 5,46]  $\mu\text{M}$  en pre-frágiles y 3,63 [0,53 - 6,73]  $\mu\text{M}$  en frágiles.

**4. La variabilidad en los parámetros de estrés oxidativo estudiados en la presente tesis (MDA y glutatión) dificulta el establecimiento de valores umbrales que distingan una situación fisiológica de otra patológica, tanto en ratones como en humanos.**



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 6 BIBLIOGRAFÍA.

- Abbott Dy & Andrews RS. (1973). *Introducción a la Cromatografía*. España.
- Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G & De Luca G. (1996). The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **327**, 207-214.
- Ames BN. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264.
- Ames BN, Shigenaga MK & Hagen TM. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7915-7922.
- Arab K & Steghens J. (2004). Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem* **325(1)**, 5.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM & Vina J. (1994a). Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* **234**, 367-371.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Estrela JM & Viña J. (1994b). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical Biochemistry* **217**, 323-328.
- Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela JM & Viña J. (1994c). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical Biochemistry* **217**, 323-328.
- Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B & Rowlands CC. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol* **87**, 2032-2036.
- Avello M & Suwalsky M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepc) [online]* **494**, 11.
- Azadbakht L, Kimiagar M, Mehrabi Y, Esmailzadeh A, Hu FB & Willett WC. (2007). Soy consumption, markers of inflammation, and endothelial function: a cross-over study in postmenopausal women with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* **30**, 967-973.
- Barbosa A, Lajolo F & Genovese M. (2011). Effect of free or protein-associated soy isoflavones on the antioxidant status in rats. *J Sci Food Agric* **91(4)**, 10.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R & Sinclair DA. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337-342.
- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ & Holsboer F. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* **51**, 535-541.

- Bejma J, Ramires P & Ji LL. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand* **169**, 343-351.
- Bernabeu AS, Triana BEG, Casanova AE & Piñeiro JCG. (2004). El estrés oxidativo en la insuficiencia renal crónica. *Rev Cubana Invest Bioméd* **23.n 2**.
- Bird RP & Draper HH. (1984). Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol* **105**, 299-305.
- Bokov A, Chaudhuri A & Richardson A. (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* **125**, 811-826.
- Borel P, Grolier P, Boirie Y, Simonet L, Verdier E, Rochette Y, Alexandre-Gouabau MC, Beaufriere B, Lairon D & Azais-Braesco V. (1998). Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects. *J Lab Clin Med* **132**, 61-66.
- Borrás C GJ, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardó FV., . Mann G E, Viña J. (2006). Genistein, a soy isoflavone, upregulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2 and NFkappaB. *Faseb J In Press*.
- Borras C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV & Vina J. (2003). Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* **34**, 546-552.
- Borras C, Stvolinsky S, Lopez-Grueso R, Fedorova T, Gambini J, Boldyrev A & Vina J. (2009). Low in vivo brain glucose consumption and high oxidative stress in accelerated aging. *FEBS Lett* **583**, 2287-2293.
- Bortz WM, 2nd. (2002). A conceptual framework of frailty: a review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, M283-288.
- Boveris A & Navarro A. (2008). Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med* **44**, 224-229.
- Boveris A, Oshino N & Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxyde. *Biochem J* **128**, 617-630.
- Braithwaite A & J SF. (1996). *Chromatographics Methods*.
- Breen AP & Murphy JA. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad Biol Med* **18**, 1033-1077.
- Brownlee M. (1992). Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* **15**, 1835-1843.
- Bustos A-S, C. CJ, Carolina P, Gimena D, Marco T, A. AJ & Mauricio PJ. (2012). Cuantificación de resveratrol en vinos mediante HPLC *Rev Bol Quim* **29**, 5.
- Cabezudo MD. (1988). *Biografía de Mikhail Semenovich Tswett*, vol. 1º.
- Cadenas E & Sies H. (1985). Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul* **23**, 217-237.
- Calabrese EJ, McCarthy ME & Kenyon E. (1987). The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys* **52**, 531-541.

- Capdevila J, Chacos N, Werringloer J, Prough RA & Estabrook RW. (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5362-5366.
- Cases V & M. y Gómez Hens A. (1990). *Técnicas Analíticas de Separación*. Barcelona.
- Clegg A, Young J, Iliffe S, Rikkert MO & Rockwood K. (2013). Frailty in elderly people. *Lancet* **381**, 752-762.
- Cortijo J, Marti-Cabrera M, de la Asuncion JG, Pallardo FV, Esteras A, Bruseghini L, Vina J & Morcillo EJ. (1999). Contraction of human airways by oxidative stress protection by N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* **27**, 392-400.
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A & Vasseur P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Environ Saf* **38**, 122-131.
- Chance B, Sies H & Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- Cheeseman KH & Slater TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* **49**, 588-603.
- Cheung C, Zheng G, Li A, Richardson B & Lam P. (2001). Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology* **52**, 14.
- Dabrio MV. (2000). *Cromatografía y electroforesis en columna*. Barcelona.
- Dam PV, Bravenboer B & Asbeck B. (1996). Effects of insulin treatment on endoneural and systemic oxidative stress. *Eur J Clin Invest* **26**, 6.
- Davies KJ, Packer L & Brooks GA. (1982a). Exercise bioenergetics following sprint training. *Arch Biochem Biophys* **215**, 260-265.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA & Packer L. (1982b). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 1198-1205.
- Davies KJA, Delsignore ME & Lin SW. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* **262**, 9902-9907.
- Dean RT, Gieseg S & Davies MJ. (1993). Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci* **18**, 437-441.
- Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, Sastre J & Vina J. (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* **51**, 1118-1124.
- Dine T, Gressier B, Luyckx M, Gottrand F, Michaud L & Kambia N. (2014). Plasma malondialdehyde levels in children on 12-hour cyclic parenteral nutrition: are there health risks? *Pediatr Dev Pathol* **17**, 286-291.
- Ding XCM, Pernecky S & Vaz. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J* **6**.

- Dolphin D. (1988). The generation of free radicals during de normal and abnormal functioning of citocromes P450. In *Oxygen radicals in biology and medicine*, ed. Simic MGT, K.A.; Ward, F. F., Sonntag, C., pp. 491-500.
- Donald R & Johns MD. (1995). Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* **333**, 638-644.
- Doroshov JH & Davies KJ. (1983). Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin. *Biochem Pharmacol* **32**, 2935-2939.
- Douglas A, Skoog F, James Holler, Stanley R & Crouch. (2007). "*Principles of Instrumental Analysis*".
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.
- Dröge W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* **82**, 47-96.
- Durackova Z, Bergendi L, Liptakova A & Muchova J. (1993). Free radicals derived from oxygen, and medicine. *Bratisl Lek Listy* **94**, 419-434.
- Ensrud KE, Ewing SK, Cawthon PM, Fink HA, Taylor BC, Cauley JA, Dam TT, Marshall LM, Orwoll ES & Cummings SR. (2009). A comparison of frailty indexes for the prediction of falls, disability, fractures, and mortality in older men. *J Am Geriatr Soc* **57**, 492-498.
- Erdman JW, Jr., Bierer TL & Gugger ET. (1993). Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* **691**, 76-85.
- Esterbauer H, Schaur RJ & Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* **11**, 81-128.
- Estrela JM, Hernandez R, Terradez P, Asensi M, Puertes IR & Vina J. (1992). Regulation of glutathione metabolism in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem J* **286 ( Pt 1)**, 257-262.
- Fabian E, Poloskey P, Kosa L, Elmadfa I & Rethy LA. (2013). Nutritional supplements and plasma antioxidants in childhood asthma. *Wien Klin Wochenschr* **125**, 309-315.
- Fenton. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Trans* **65**, 899-910.
- Fischer RB & Peters DG. (1987). *Compendio de análisis químico cuantitativo*. México D.F.
- Fisher-Wellman K, Bell HK & Bloomer RJ. (2009). Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxid Med Cell Longev* **2**, 43-51.
- Fitzpatrick A, Jones D & Brown L. (2012a). Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **17(2)**, 33.

- Fitzpatrick AM, Jones DP & Brown LA. (2012b). Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **17**, 375-408.
- Forstrom JW, Zakowski JJ & Tappel AL. (1978). Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**, 2639-2644.
- Foster RR & Estabrook RW. (1993). Is oxygen an essential nutrient? *Annu Rev Nutr* **13**, 383-403.
- Fraga CG, Leibovitz BE & Tappel AL. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* **4**, 155-161.
- Freeman BA & Crapo J. (1982a). Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**, 412-426.
- Freeman BA & Crapo JD. (1982b). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**, 412-426.
- Frei B. (1994a). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* **97**, 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Frei B. (1994b). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med* **97**, 5S-13S.
- Frei B, Stocker R & Ames BN. (1988). Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 9748-9752.
- Fridovich I. (1974). Superoxide dismutase. *Adv Enzymol* **41**, 35-97.
- Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G & McBurnie MA. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**, M146-156.
- Fries JF. (1980). Aging, natural death, and the compression of morbidity. *N Engl J Med* **303**, 130-135.
- Fuchs J, Weber S, Podda M, Groth N, Herrling T, Packer L & Kaufmann R. (2003). HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* **34**, 330-336.
- Fukunaga K, Takama K & Suzuki T. (1995). High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Anal Biochem* **230**, 20-23.
- Fukunaga K, Yoshida M & Nakazono N. (1998). A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* **12**, 300-303.
- Furukawa S, Fujita T & Shimabukuro M. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Clin Invest* **114**, 9.
- Galan-Chilet I, Tellez-Plaza M, Guallar E, De Marco G, Lopez-Izquierdo R, Gonzalez-Manzano I, Carmen Tormos M, Martin-Nunez GM, Rojo-Martinez G, Saez GT,

- Martin-Escudero JC, Redon J & Javier Chaves F. (2014). Plasma selenium levels and oxidative stress biomarkers: a gene-environment interaction population-based study. *Free Radic Biol Med* **74**, 229-236.
- Gambini J, Grueso RL, Olaso G, Inglés M, Abdelaziz K, Alami ME, Costa VB, Borrás C & Viña J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatría y Gerontología* **48**, 10.
- Gao M, Zhao Z, Lv P, Li Y, Gao J, Zhang M & Zhao B. (2015). Quantitative combination of natural anti-oxidants prevents metabolic syndrome by reducing oxidative stress. *Redox Biol* **6**, 11.
- García-de-la-Asunción J, Gómez-Cambronero LG, Del Olmo ML, Pallardo FV, Sastre J & Vina J. (2007). Vitamins C and E prevent AZT-induced leukopenia and loss of cellularity in bone marrow. Studies in mice. *Free Radic Res* **41**, 330-334.
- García-Mesa Y, Pareja-Galeano H, Bonet-Costa V, Revilla S, Gómez-Cabrera MC, Gambini J, Giménez-Llort L, Cristofol R, Vina J & Sanfeliu C. (2014). Physical exercise neuroprotects ovariectomized 3xTg-AD mice through BDNF mechanisms. *Psychoneuroendocrinology* **45**, 154-166.
- García de la Asunción J, Belda FJ, Greif R, Barber G, Vina J & Sastre J. (2007). Inspired supplemental oxygen reduces markers of oxidative stress during elective colon surgery. *Br J Surg* **94**, 475-477.
- Ghule AE, Kandhare AD, Jadhav SS, Zanwar AA & Bodhankar SL. (2015). Omega-3-fatty acid adds to the protective effect of flax lignan concentrate in pressure overload-induced myocardial hypertrophy in rats via modulation of oxidative stress and apoptosis. *Int Immunopharmacol* **28**, 751-763.
- Giulivi C & Davies KJA. (1993). Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome. *J Biol Chem* **268**, 8752-8759.
- Gómez-Cabrera MC, Domenech E & Vina J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* **44**, 126-131.
- Gómez-Cabrera MC, Martínez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J & Vina J. (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* **96 Suppl 1**, S31-33.
- Gómez. AV. (2002a). Una breve revisión sobre el estrés oxidativo y sus efectos para la salud. *Medicina naturista* **4**, 9.
- Gómez. ÁV. (2002b). Una breve revisión sobre el stress oxidativo y sus efectos para la salud. *Medicina naturista* **4**, 10.
- Greenwald RA & Moy WW. (1980). Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* **23**, 455-463.
- Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W & Uchida K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* **44**, 1098-1124.
- Guerra JE. (2001). Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *An Med Interna* **18(6)**, 9.

- Haber F. aWJ. (1934). The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London* **147**, 332-351.
- Hageman JJ, Bast A & Vermeulen NP. (1992). Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects. *Chem Biol Interact* **82**, 243-293.
- Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **91**, 14S-22S.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* **52**, 253-265.
- Halliwell B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* **16**, 33-50.
- Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**, 1147-1150.
- Halliwell B & Auroma OI. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* **281**, 9-19.
- Halliwell B & Gutteridge JM. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**, 501-514.
- Halliwell B & Gutteridge JM. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* **18**, 125-126.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Reino Unido., Oxford.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* **186**, 1-85.
- Han SN, Meydani M, Wu D, Bender BS, Smith DE, Vina J, Cao G, Prior RL & Meydani SN. (2000). Effect of long-term dietary antioxidant supplementation on influenza virus infection. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, B496-503.
- Harman D. (1956a). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **2**, 298-300.
- Harman D. (1956b). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Harman D. (1972). Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr* **25**, 839-843.
- Harman D. (1998). Aging and oxidative stress. *J Int Fed Clin Chem* **10**, 24-27.
- Harman D. (2001). Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* **928**, 1-21.
- Hassan HM & Fridovich I. (1977). Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **252**, 7667-7672.
- Hasselwander O & Young I. (1998). Oxidative stress in chronic renal failure. *Free Rad Res* **29**, 11.

- Hercberg S, Galon P & Preziosi P. (2004). A randomized placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* **164**, 8.
- Heunks L, Viña J, Herwaarden Cv, Folgering H, Gimeno A & Dekhuijzen P. (1999). Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol* **277(6 Pt 2)**, 7.
- Hohn A, Konig J & Grune T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics* **92**, 132-159.
- Holloszy JO. (1992). Exercise and food restriction in rats. *J Nutr* **122**, 774-777.
- Holloszy JO. (1998). Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet. *Mech Ageing Dev* **100**, 211-219.
- Hong Y-L, Yeh S-L, Chiang C-Y & Hu M-L. (2000). Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbittiric acid tests and an improved high performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem* **33**, 6.
- Hopkins FG. (1921). On an Autoxidisable Constituent of the Cell. *Biochem J* **15**, 286-305.
- Hopps E, Noto D, Caimi G & Averna MR. (2010). A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **20**, 72-77.
- Hosokawa M. (2002). A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates age-dependent disorders in SAMP strains of mice. *Mech Ageing Dev* **123**, 1553-1561.
- Inal ME, Kanbak G & Sunal E. (2001). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* **305**, 75-80.
- Inoue M. (2011). [Free radical theory of life, evolution and disease]. *Rinsho Byori* **59**, 170-171.
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Hiramoto K, Kashiwagi A & Utsumi K. (2004). Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. *Redox Rep* **9**, 237-247.
- Issa Katime, Katime O & Katime D. (1998). "Cromatografía líquida: teoría y aplicaciones".
- Issekutz B, Jr., Lichtneckert I & Winter M. (1950). Effect of histamine, capsaicine and procaine on heat-regulation. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **83**, 319-326.
- Iyer SS, Torres-Gonzalez E, Neujahr DC, Kwon M, Brigham KL, Jones DP, Mora AL & Rojas M. (2010). Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on endotoxin-induced oxidation of plasma cysteine and glutathione in mice. *Stem Cells Int* **2010**, 868076.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG & Borchelt DR. (2004). APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol Aging* **25**, 885-892.
- Jatsa HB, Kenfack CM, Simo DN, Feussom NG, Nkondo ET, Tchuem Tchuente LA, Tsague CD, Dongo E & Kamtchouing P. (2015). Schistosomicidal, hepatoprotective and antioxidant activities of the methanolic fraction from *Clerodendrum umbellatum*

- Poir leaves aqueous extract in *Schistosoma mansoni* infection in mice. *BMC Complement Altern Med* **15**, 248.
- Ji LL. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* **25**, 225-231.
- Ji LL. (2001). Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci* **928**, 236-247.
- Jimenez-Osorio AS, Picazo A, Gonzalez-Reyes S, Barrera-Oviedo D, Rodriguez-Arellano ME & Pedraza-Chaverri J. (2014). Nrf2 and redox status in prediabetic and diabetic patients. *Int J Mol Sci* **15**, 20290-20305.
- Jin S & Yin Y. (2012a). In vivo antioxidant activity of total flavonoids from indocalamus leaves in aging mice caused by D-galactos. *Food Chem Toxicol* **50(10)**, 4.
- Jin SL & Yin YG. (2012b). In vivo antioxidant activity of total flavonoids from indocalamus leaves in aging mice caused by D-galactose. *Food Chem Toxicol* **50**, 3814-3818.
- Jones A, Montgomery HE & Woods DR. (2002). Human performance: a role for the ACE genotype? *Exerc Sport Sci Rev* **30**, 184-190.
- Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ & Sternberg P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* **28**, 625-635.
- Jones OT. (1994). The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *Bioessays* **16**, 919-923.
- Jordan VC. (1998). Antiestrogenic action of raloxifene and tamoxifen: today and tomorrow. *J Natl Cancer Inst* **90**, 967-971.
- Jové M, Naudí A, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G & Pamplona R. (2013). Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Front Physiol* **17**, 368.
- Kasai H & Nishimura S. (1984). Hydroxylation of deoxy guanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. *Gann* **75**, 565-566.
- Keaney J, Larson M, Vasan R, Wilson P, Lipinska I & Corey D. (2003). Obesity and systemic oxidative stress. *Arterioscler Thrombosis Vasc Biol* **23**, 5.
- Kennedy TA & Liebler DC. (1992). Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J Biol Chem* **267**, 4658-4663.
- Ketterer B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* **16**, 957-973.
- Kirkland JL & Peterson C. (2009). Healthspan, translation, and new outcomes for animal studies of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**, 209-212.
- Kishi T, Watanabe T & Folkers K. (1977). Bioenergetics in clinical medicine XV. Inhibition of coenzyme Q10-enzymes by clinically used adrenergic blockers of beta-receptors. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **17**, 157-164.
- Knez WL, Coombes JS & Jenkins DG. (2006). Ultra-endurance exercise and oxidative damage : implications for cardiovascular health. *Sports Med* **36**, 429-441.

- Knight JA, Smith SE, Kinder VE & Pieper RK. (1988). Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography and determination of reference values for adults. *Clin Chem* **34**, 1107-1110.
- Kong LL, Zhuang XM, Yang HY, Yuan M, Xu L & Li H. (2015). Inhibition of P-glycoprotein Gene Expression and Function Enhances Triptolide-induced Hepatotoxicity in Mice. *Sci Rep* **5**, 11747.
- Kosower NS & Kosower EM. (1978). The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* **54**, 109-160.
- Kostka T. (1999). [Aging, physical activity and free radicals]. *Pol Merkur Lekarski* **7**, 202-204.
- Krinsky N. (1994). In *Natural antioxidants in human health and disease*, ed. Frei B, pp. 239-262. Academic Press, San Diego.
- Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O & Sen CK. (1999). Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise- induced oxidative stress in young men. *Redox Rep* **4**, 53-59.
- Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K & Rockwood K. (2001). Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol* **58**, 498-504.
- Lee Y, Choi J, Kim M, Jung M, Lee Y & Song J. (2006). Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition* **22(9)**, 8.
- Lennon-Edwards S, Schellhardt T & Kuczumarski J. (2014). Antioxidant Defense is Increased in Aged Hearts Following Omega-3 Supplementation in the Absence of Changes in Inflammation. *Physiol Res*.
- Lepage G, Munoz G, Champagne J & Roy CC. (1991). Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **197**, 277-283.
- Li X, Li B & Jia Y. (2015). The Hepatoprotective Effect of Haoqin Qingdan Decoction against Liver Injury Induced by a Chemotherapeutic Drug Cyclophosphamide. *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**, 978219.
- Lin T & Yang M. (2007). Benzo(a)pyrene induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells. *Toxicology* **235**, 10.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T & Tanaka M. (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*, 642-645.
- Lippman RD. (1985). Rapid *in vivo* quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp Gerontol* **20**, 1-5.
- Liu JR, Dong HW, Sun XR, Wang Q, Sun WG, Parry JW, Liu Q, Han XH, Sun CH, Chen BQ & Yang BF. (2010). Effects of beta-ionone on mammary carcinogenesis and antioxidant status in rats treated with DMBA. *Nutr Cancer* **62**, 58-65.

- López FG. (2012a). XIV Curso de determinación de Fármacos por HPLC en muestras biológicas. In *XIV Curso de determinación de Fármacos por HPLC en muestras biológicas*, ed. Salamanca Ud. Salamanca.
- López FG. (2012b). *XIV Curso de determinación de Fármacos por HPLC en muestras biológicas*. Salamanca.
- Lopez S, Aguilar L, Mercado L, Bravo M & Quiroz W. (2015). Sb(V) reactivity with human blood components: redox effects. *PLoS One* **10**, e0114796.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lloret A, Badia MC, Mora NJ, Pallardo FV, Alonso MD & Vina J. (2009). Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental. *J Alzheimers Dis* **17**, 143-149.
- Lloret A, Buj J, Badia MC, Sastre J, Morera J & Vina J. (2007). Obstructive sleep apnea: arterial oxygen desaturation coincides with increases in systemic oxidative stress markers measured with continuous monitoring. *Free Radic Biol Med* **42**, 893-894; author reply 895.
- Machlin JM & Bendich A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* **1**, 441-445.
- Marin RV, Pedrosa MA, Moreira-Pfrimer LD, Matsudo SM & Lazaretti-Castro M. (2010). Association between lean mass and handgrip strength with bone mineral density in physically active postmenopausal women. *J Clin Densitom* **13**, 96-101.
- Maxwell SR. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* **49**, 345-361.
- McCord JM & Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055.
- McCord JM, Keele BB & Fridovich Y. (1974). An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **41**, 35-97.
- Meydani M. (2001). Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Ann N Y Acad Sci* **928**, 226-235.
- Minana JB, Gomez-Cambronero L, Lloret A, Pallardo FV, Del Olmo J, Escudero A, Rodrigo JM, Pellini A, Vina JR, Vina J & Sastre J. (2002). Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology* **35**, 1205-1214.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J & Johnson JEJ. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* **15**, 579-591.
- Mitnitski AB. (2002). Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatr* **2**, 1.
- Moreto F, de Oliveira EP, Manda RM & Burini RC. (2014). The higher plasma malondialdehyde concentrations are determined by metabolic syndrome-related glucolipototoxicity. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 505368.

- Mori A, Utsumi K, Liu J & Hosokawa M. (1998). Oxidative damage in the senescence-accelerated mouse. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 239-250.
- Morris A, Zhao L, Patel R, Jones D, Ahmed Y, Stoyanova N, Gibbons G, Vaccarino V, Din-Dzietham R & Quyyumi A. (2012). Differences in systemic oxidative stress based on race and the metabolic syndrome: the Morehouse and Emory Team up to Eliminate Health Disparities (META-Health). *Metab Syndr Relat Disord* **10(4)**, 7.
- Moselhy H, Reid R, Yousef S & Boyle S. (2013). A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J Lipid Res* **54(3)**, 6.
- Musacco-Sebio R, Ferrarotti N, Saporito-Magriñá C, Semprine J, Fuda J, Torti H, Boveris A & Repetto M. (2014a). Oxidative damage to rat brain in iron and copper overloads. *Metallomics* **6(8)**, 6.
- Musacco-Sebio R, Saporito-Magrina C, Semprine J, Torti H, Ferrarotti N, Castro-Parodi M, Damiano A, Boveris A & Repetto MG. (2014b). Rat liver antioxidant response to iron and copper overloads. *J Inorg Biochem* **137**, 94-100.
- Mutlu-Turkoglu U, Ilhan E, Oztezcán S, Kuru A, Aykac-Toker G & Uysal M. (2003). Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem* **36**, 397-400.
- Navarro A & Boveris A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1244-1249.
- Navarro A & Boveris A. (2010). Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* **2**.
- Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM & Boveris A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R505-511.
- Navarro A, Gomez C, Sanchez-Pino MJ, Gonzalez H, Bandez MJ, Boveris AD & Boveris A. (2005). Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1392-1399.
- Navarro A, Sanchez Del Pino MJ, Gomez C, Peralta JL & Boveris A. (2002). Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R985-992.
- Navarro J, Obrador E, Pellicer JA, Aseni M, Vina J & Estrela JM. (1997). Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med* **22**, 1203-1209.
- Ogunro PS, Olujumbo FA, Ajala MO & Oshodi TT. (2014). The effect of a membrane dialyzer during hemodialysis on the antioxidant status and lipid peroxidation of patients with end-stage renal disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **25**, 1186-1193.
- Ohbuchi M, Miyata M, Nagai D, Shimada M, Yoshinari K & Yamazoe Y. (2009). Role of enzymatic N-hydroxylation and reduction in flutamide metabolite-induced liver toxicity. *Drug Metab Dispos* **37**, 97-105.

- Oldridge N. (2003). Physical activity in primary and secondary prevention - there is a treatment gap. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **10**, 317-318.
- Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A & Saez GT. (2001). Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* **30**, 1286-1292.
- Orellana M & Guajardo V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile* **132**, 9.
- Ortega E, Forner MA, Garcia JJ, Rodriguez AB & Barriga C. (1999). Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol Cell Biochem* **201**, 41-47.
- Pacifi RE & Davies KJ. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised. *Gerontology* **37**, 166-180.
- Pacifici RE & Davies KJ. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* **37**, 166-180.
- Palozza P, Luberto C, Calviello G, Ricci P & Bartoli GM. (1997). Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Rad Biol Med* **22**, 1065-1073.
- Pallardo FV, Asensi M, Garcia de la Asuncion J, Anton V, Lloret A, Sastre J & Vina J. (1998). Late onset administration of oral antioxidants prevents age-related loss of motor co-ordination and brain mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res* **29**, 617-623.
- Panighini A, Duranti E, Santini F, Maffei M, Pizzorusso T, Funel N, Taddei S, Nunzia Bernardini, Ippolito C, Viridis A & Costa M. (2013). Vascular Dysfunction in a Mouse Model of Rett Syndrome and Effects of Curcumin Treatment. In *Published online*.
- Parisotto EB, Giaretta AG, Zamoner A, Moreira EA, Frode TS, Pedrosa RC & Filho DW. (2015). Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome. *Res Dev Disabil* **45-46**, 14-20.
- Pedersen BK & Saltin B. (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* **16 Suppl 1**, 3-63.
- Peterson GL. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356.
- Philpot RM. (1991). Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. *Methods Enzymol* **206**, 623-631.
- Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G & Vassalle C. (2015). Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition* **31**, 916-922.
- Popescu L, Vîrgolici B, Lixandru D, Miricescu D, Condruş E, OTimnea, Ranetti A, Militaru M, Mohora M & Zăgrean L. (2013). Effect of diet and omega-3 fatty acids in NAFLD. *Rom J Morphol Embryol* **54(3 Suppl)**, 5.
- Pryor WA, Squadrito GL & Friedman M. (1995). A new mechanism for the toxicity of ozone. *Toxicol Lett* **82-83**, 287-293.

- Puchades Montesa MJ, Gonzalez Rico MA, Solis Salguero MA, Torregrosa Maicas I, Tormos Munoz MC, Saez Tormo G, Juan Garcia I & Miguel Carrasco A. (2009). [Study of oxidative stress in advanced kidney disease]. *Nefrologia* **29**, 464-473.
- Radak Z, Chung HY & Goto S. (2005). Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology* **6**, 71-75.
- Rangel-Lopez A, Paniagua-Medina ME, Urban-Reyes M, Cortes-Arredondo M, Alvarez-Aguilar C, Lopez-Meza J, Ochoa-Zarzosa A, Lindholm B, Garcia-Lopez E & Paniagua JR. (2013). Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study. *Mutagenesis* **28**, 219-225.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW & Potter DW. (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry* **106**, 55-62.
- Ribeiro A, Shimada A, Hebeda C, Oliveira Td, Loureiro AdM, Wdos RF, Santos A, Lima W & Farsky S. (2011). In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. *Toxicology* **288 (1-3)**, 7.
- Rice-Evans CA & Miller NJ. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* **24**, 790-795.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM & Pridham JB. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* **22**, 375-383.
- Rickwood R, Wilson MT & Darley-Usmar VM. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. In *Mitochondria, a practical approach*, ed. Rickwood R, Wilson MT & Darley-Usmar VM, pp. 1-16. Ed. IRL Press, Ltd. Reino Unido.
- Richter C, Park JW & Ames BN. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6465-6467.
- Ríspoli LDT, Tarragón AV, Prado AV, Tormo GS, Ismail AM & Puchol VG. (2013). Oxidative stress; a comparative study between normal and morbid obesity group population. *Nutr Hosp* **28(3)**, 5.
- Roberts CK & Barnard RJ. (2005). Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol* **98**, 3-30.
- Rock CL, Jacob RA & Bowen PE. (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc* **96**, 693-702; quiz 703-694.
- Rockwood K, Song X, MacKnight C, Bergman H, Hogan DB, McDowell I & Mitnitski A. (2005). A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ* **173**, 489-495.
- Rodriguez AM, Carrico PM, Mazurkiewicz JE & Melendez JA. (2000). Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic Biol Med* **29**, 801-813.

- Rodriguez Manas L. (2008). [RETICEF: an opportunity to stimulate Spanish research on ageing and frailty]. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **43**, 68-70.
- Roede J, Uppal K, Liang Y, Promislow D, Wachtman L & Jones D. (2013). Characterization of plasma thiol redox potential in a common marmoset model of aging. *Redox Biol* **1**, 6.
- Roselaar S, Nazhat N, Winyard P, Jones P, Cunningham J & Blake D. (1995). Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. *Kidney Int* **48**, 7.
- Rouault TA & Klausner RD. (1996). The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism. *EXS* **77**, 183-197.
- Sánchez A, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Vara D, Chiloeches A & Díaz-Laviada I. (2007). Apoptosis induced by capsaicina in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase and JNK activation. *Apoptosis* **12**, 11.
- Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T & Vina J. (1992a). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* **263**, R992-995.
- Sastre J, Asensi N, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T & Viña J. (1992b). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* **32**, R992-R995.
- Sastre J, Martin JA, Gomez-Cabrera MC, Pereda J, Borrás C, Pallardo FV & Vina J. (2005). Age-associated oxidative damage leads to absence of gamma-cystathionase in over 50% of rat lenses: relevance in cataractogenesis. *Free Radic Biol Med* **38**, 575-582.
- Sastre J, Pallardo FV, Llopis J, Furukawa T, Vina JR & Vina J. (1989). Glutathione depletion by hyperphagia-induced obesity. *Life Sci* **45**, 183-187.
- Serviddio G, Romano AD, Greco A, Rollo T, Bellanti F, Altomare E & Vendemiale G. (2009). Frailty syndrome is associated with altered circulating redox balance and increased markers of oxidative stress. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**, 819-827.
- Sevanian A & Kim E. (1985). Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes. *J Free Radic Biol Med* **1**, 263-271.
- Shen CC, Wertelecki W, Driggers WJ, LeDoux SP & Wilson GL. (1995). Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells. *Mutat Res* **337**, 19-23.
- Shibutani S, Takeshita M & Grollman A. (1992). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**, 431-434.
- Shigenaga MK, Hagen TM & Ames BN. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10771-10778.
- Sies H. (1983). Biochemistry of oxidative stress. In *Glutathione: storage, transport and turnover in mammals*, ed. Y. S, Higashi T & Tateishi N, pp. 63-69. Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrech.

- Sies H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks. In (Ed) *Oxidative Stress London: Academic*, pp. 1–7.
- Sies H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* **25**, 1058-1071.
- Sies H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* **69**, 965-968.
- Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* **215**, 213.
- Sies H & De Groot H. (1993). Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicology Letters* **64//65**, 547.
- Sies H & Stahl W. (1995). Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition* **62**, 1315 S- 1321 S.
- Simic MG & Taylor KA. (1988). Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. In *Oxygen radicals in biology and medicine*, ed. Simic MG, Taylor KA, Ward JF & Sonntag C. Ed. Plenum Press, New York.
- Skoog DA & Leary JJ. (1994). *Análisis Instrumental*.
- Slater TF. (1984). Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* **222**, 1-15.
- Smith CV, Jones DP, Guenther TM, Lash LH & Lauterburg BH. (1996). Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol* **140**, 1-12.
- Sohal RS. (1993). The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging (Milano)* **5**, 3-17.
- Sohal RS, Ku HH & Agarwal S. (1993). Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 7-11.
- Sohal RS & Weindruch R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63.
- Sohn OS, Fiala ES, Upadhyaya P, Chae YH & El-Bayoumy K. (1999). Comparative effects of phenylenebis(methylene)selenocyanate isomers on xenobiotic metabolizing enzymes in organs of female CD rats. *Carcinogenesis* **20**, 615-621.
- Soliman AM, Fahmy SR & El-Abied SA. (2015). Anti-neoplastic activities of *Sepia officinalis* ink and *Coelatura aegyptiaca* extracts against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 3543-3555.
- Sonia Clapés, Omaidá Torres, Companioni M, Villariño U, Broche F & Céspedes. E. (2001). Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cubana Invest Bioméd* **20 n° 2**.
- Stadtman ER. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220-1224.
- Su M, Chen H, Wei C, Chen N & Wu W. (2014). Potential protection of vitamin C against liver-lesioned mice. *Int Immunopharmacol* **22**, 492-497.

- Subbiah MT, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W & Rymaszewski Z. (1993). Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* **77**, 1095-1097.
- Sugioka K, Shimosegawa Y & Nakano M. (1987). Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* **210**, 37-39.
- Suter M & Richter C. (1999). Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry* **38**, 459-464.
- Sverko V, Balog T, Sobocanec S, Gavella M & Marotti T. (2002). Age-associated alteration of lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in CBA and AKR mice. *Exp Gerontol* **37**, 1031-1039.
- Terradez P, Asensi M, Lasso de la Vega MC, Puertes IR, Vina J & Estrela JM. (1993). Depletion of tumour glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. *Biochem J* **292** ( Pt 2), 477-483.
- Theou O, Stathokostas L, Roland KP, Jakobi JM, Patterson C, Vandervoort AA & Jones GR. (2011). The effectiveness of exercise interventions for the management of frailty: a systematic review. *J Aging Res* **2011**, 569194.
- Tietze F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**, 502-522.
- Tresguerres. (2010). *Fisiología Humana*.
- Trush MA, Mimnaugh EG & Gram TE. (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* **31**, 3335-3346.
- Tucker PS, Dalbo VJ, Han T & Kingsley MI. (2013). Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease. *Biomarkers* **18**, 103-115.
- Tur JA. (2004). Los antioxidantes en la dieta mediterránea, pp. 198-207. *Rev Esp Nutr Comunitaria*.
- Van Helvoort HA, Heijdra YF, Thijs HM, Vina J, Wanten GJ & Dekhuijzen PN. (2006). Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. *Med Sci Sports Exerc* **38**, 1543-1552.
- Vela C, Cristol J, Ribstein J, Mimran A, Descomps B & Mourad G. (2000). Antioxidant supplementation and chronic renal transplant dysfunction. *Transplant Proc* **32**, 2.
- Vento M, Asensi M, Sastre J, Garcia-Sala F, Pallardo FV & Vina J. (2001). Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* **107**, 642-647.
- Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, Garcia-Sala F, Minana JB & Vina J. (2002). Hyperoxemia caused by resuscitation with pure oxygen may alter intracellular redox status by increasing oxidized glutathione in asphyxiated newly born infants. *Semin Perinatol* **26**, 406-410.
- Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, Garcia-Sala F & Vina J. (2003). Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr* **142**, 240-246.

- Vento M, Sastre J, Asensi MA & Vina J. (2005). Room-air resuscitation causes less damage to heart and kidney than 100% oxygen. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 1393-1398.
- Viguie CA, Frei B, Shigenaga MK, Ames BN, Packer L & Brooks GA. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* **75**, 566-572.
- Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardo FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS & Repine JE. (2000a). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* **49**, 539-544.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV & Sastre J. (2000b). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* **50**, 271-277.
- Vina J, Hems R & Krebs HA. (1978). Reaction of formiminoglutamate with liver glutamate dehydrogenase. *Biochem J* **170**, 711-713.
- Vina J, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello V & Gomez-Cabrera MC. (2012). Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol* **167**, 1-12.
- Vina J, Sastre J, Anton V, Bruseghini L, Esteras A & Asensi M. (1992). Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. *Exs* **62**, 136-144.
- Vina J, Sastre J, Pallardo F & Borras C. (2003). Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxid Redox Signal* **5**, 549-556.
- Vina J, Servera E, Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Ferrero JA, Garcia-De-La-Asuncion J, Anton V & Marin J. (1996). Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention by O<sub>2</sub> therapy. *J Appl Physiol* **81**, 2198-2202.
- Viña J. (1990). Glutathione: Metabolism and physiological functions. *CRC press, Boca Raton, Florida*.
- Viña J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV & Sastre J. (2000a). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* **50**, 271-277.
- Viña J, Servera E, Asensi M, Sastre J, Pallardó F, Gimeno A, Heunks L, Dekhuijzen P & Ferrero J. (2000b). Exercise induces oxidative stress in healthy subjects and in chronic obstructive pulmonary disease patients In: Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise In *Elsevier Science BV*, ed. C.K. Sen LPaOH, pp. 1137 – 1146.
- von Sonntag C. (1994). Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research. *Int J Radiat Biol* **65**, 19-26.
- Vulcano LAD, Soraci AL & . MOT. (2013). Homeostasis del gutati3n. *Acta bioquím clínlatioam* **47**.

- Wang H, Gao J, Han Y, Xu X, Wu R, Gao Y & Cui X. (2015). Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo. *Phytomedicine* **15; 22(5)**, 6.
- Warburton DE, Nicol CW & Bredin SS. (2006). Prescribing exercise as preventive therapy. *Cmaj* **174**, 961-974.
- Watty M. (1982). *Química analítica*. Madrid.
- Wawrzak Z, Duax WL, Strong PD & Weisz J. (1988). Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other catechol estrogens. *J Steroid Biochem* **29**, 387-392.
- Weber GF. (1990). The measurement of oxygen-derived free radicals and related substances in medicine. *J Clin Chem Clin Biochem* **28**, 569-603.
- White MJ & Heckler FR. (1990). Oxygen free radicals and wound healing. *Clin Plast Surg* **17**, 473-484.
- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Jr. & Sunderman FW, Jr. (1987a). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* **33**, 214-220.
- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CNJ & Sunderman WJ. (1987b). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* **33**, 214-220.
- Wood LG, Garg ML, Blake RJ, Simpson JL & Gibson PG. (2008). Oxidized vitamin E and glutathione as markers of clinical status in asthma. *Clin Nutr* **27**, 579-586.
- Wu M, Katta A, Gadde MK, Liu H, Kakarla SK, Fannin J, Paturi S, Arvapalli RK, Rice KM, Wang Y & Blough ER. (2009). Aging-associated dysfunction of Akt/protein kinase B: S-nitrosylation and acetaminophen intervention. *PLoS One* **4**, e6430.
- Yeo P, Xin L, Goh E, New LS, Zeng P, Wu X, Venkatesh P & Kantharaj E. (2007). Development and validation of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for 6-(3-benzoyl-ureido)-hexanoic acid hydroxyamide, a novel HDAC inhibitor, in mouse plasma for pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr* **21**, 184-189.
- Zamora JD. (2007). Antioxidants: Micronutrients fighting for health. *Rev Chil Nutr* **34**.
- Zhou J, Lisa, D.Coles, Reena V, Kartha, Nardina, Nash, Mishra U, Troy C, Lund & James C. (2015). Intravenous Administration of Stable-Labeled N-Acetylcysteine Demonstrates an Indirect Mechanism for Boosting Glutathione and Improving Redox Status. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **104**, 7.
- Zhu S, Dong Y, Tu J, Zhou Y, Zhou X & Xu B. (2014). Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. *Pharmacogn Mag* **10(Suppl 1)**;, 7.



## 7 ABREVIATURAS

**8-oxo-dG (8-OHdG)** . 8- hidroxí-2-deoxiguanosina

**Abs** Absorbancia

**ADP** Adenosín difosfato

**ATP** Adenosín trifosfato

**BOE** Boletín Oficial del Estado

**BPDS** Ácido disulfónico batofenantrolina

**BSA** Seroalbúmina bovina

**CDNB** 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

**CG** Cromatografía de Gases

**CGL** Cromatografía gas-líquido

**CGS** Cromatografía gas-sólido

**CHES** Ácido 2-(Ciclohexil amino) etano sulfónico

**CLL** Cromatografía líquido-líquido

**Cociente GSSG/GSH** cociente glutatión oxidado respecto al glutatión reducido

**CoQ** Coenzima Q

**Cu** Cobre

**CYP** Enzimas del citocromo P<sub>450</sub>

**DM** Diabetes mellitus

**EDTA** Ácido etilenaminotetraacético

**EGTA** Ácido etilen glicol tetraacético

**ERO** Especies Reactivas de Oxígeno

**ETES** Estudio de Toledo de envejecimiento saludable

**FADH<sub>2</sub><sup>-</sup>**...Flavín adenin dinucleótido (reducido)

**FDNB** 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno

**g** gramo

**GSH** Glutatión reducido

**GSSG** Glutatión oxidado

**H...**Altura equivalente de un plato teórico

**HEPES** Tampón del ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico

**HNE** 4-hidroxi-2,3-nonenal

**HPLC** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (siglas en inglés)

**HPLC-FL** Cromatógrafo líquido de alta eficacia con detector de fluorescencia

**HPLC-UV** Cromatógrafo líquido de alta eficacia con detector ultravioleta

**K** Coeficiente de distribución o reparto en un cromatograma

**kcal** kilocaloría

**kg** kilogramo

**Kpi** Tampón fosfato

**LCMS , (LC/MS) o LC-MS** Cromatografía líquida conectada a espectrometría de Masas

**MDA** Malondialdehído

**MOPS** Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico

**MS** Espectrometría de masas

**N** número de platos teóricos de una columna cromatográfica

**NADH...**Nicotinamida Adenina dinucleótido (reducido)

**NADP** Nicotinamida Adenina dinucleótido fosfato

**NEM** N-etilmaleimida

**nm** nanometros

**OH<sup>-</sup>** Radical hidroxilo

**p/v** peso/volumen

**PAH** hidrocarburos policíclicos aromáticos

**PCA** Ácido perclórico

**R<sup>-</sup>** Radical alquílico

**RNS** Especies Reactivas del Nitrógeno

**RO<sup>-</sup>** Radical alcoxilo

**ROO<sup>-</sup>** Radical peróxido

**Rs** Resolución en un cromatograma

**SAMP8** Cepa de ratón de envejecimiento acelerado

**SAMR1** Cepa de ratón, resistente al envejecimiento

**SB(V)** Antimonio

**TBA** Ácido tiobarbitúrico

**TBARS** sustancias inespecíficas reactivas con el TBA

**TCA** Ácido tricloroacético

**t<sub>M</sub>** tiempo muerto de un cromatograma

**t<sub>R</sub>** tiempo de retención de un cromatograma

**UV** Ultravioleta

**Ve** volumen de elución

**Vo** volumen de exclusión

**W<sub>A</sub>** Ancho de un pico cromatográfico (pico A)

**γ-Glu-Glu** γ-Glutamilglutamato

**ΔG** Energía libre de Gibbs