

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA

EFEECTO DE LA CERVEZA FRENTE AL ESTRÉS
OXIDATIVO INDUCIDO POR LA ADRIAMICINA

M^a CARMEN TORRES RODRÍGUEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 29 de Maig de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Juan Viña Ribes
- D. José Vicente Carbonell Talon
- D^a. Carmen Gómez Candela
- D^a. Pilar Muñiz Rodríguez
- D^a. Eulalia Alonso Iglesias

Va ser dirigida per:

D^a. Victoria Valls Bellés

D^a. Pilar Codoñer Franch

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Carmen Torres Rodríguez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6887-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“EFECTO DE LA CERVEZA EN EL ESTRÉS OXIDATIVO
INDUCIDO POR LA ADRIAMICINA.”**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

M^a CARMEN TORRES RODRÍGUEZ

DIRIGIDA POR:

DRA. VICTORIA VALLS BELLÉS

DRA. PILAR CODOÑER FRANCH

VALENCIA 2007

D^a Victoria Valls Bellés, Doctora en Ciencias Biológicas (Especialidad Bioquímica) y Técnico en Investigación del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y D^a Pilar Codoñer Franch Doctora en Medicina y Cirugía, y Profesora Titular de Pediatría del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Cerfitican: Que Doña M^a Carmen Torres Rodríguez, licenciada en Ciencias Biológicas ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia el trabajo titulado “Efecto de la cerveza en el estrés oxidativo inducido por la adriamicina” que presenta para obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente certificación en Valencia, -----

Fdo. Dra D^a Victoria Valls Bellés

Fdo. Dra D^a Pilar Codoñer Franch

D. Guillermo Saéz Tormo, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y como tutor

CERTIFICA: que Dña M^aCarmen Torres Rodríguez ha realizado bajo la dirección de la Dra Victoria Valls Bellés y la Dra Pilar Codoñer Franch en el departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, de la Facultat de Medicina de la Universitat de Valencia, la tesis titulada “Efecto de la cerveza en el estrés oxidativo inducido por la adriamicina” que presenta para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente certificación.

Fdo Dr. D Guillermo Saéz Tormo.

A mis padres:

No quiero dejar de agradecerles todos los sacrificios que han hecho por mi durante toda mi vida. Sin su ayuda no hubiera podido alcanzar nunca esta meta tan importante para mí.

Y a toda mi familia y a todos mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Victoria Valls y Dra Pilar Codoñer por su dedicación constante y apoyo. Su dedicación en el trabajo experimental ha sido para mí un ejemplo de profesionalidad. Sin su inestimable ayuda tanto técnica como teórica no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

A Laura porque ha sabido con trabajo, compañerismo y cariño contribuir a la elaboración de este estudio.

Al Dr Miguel Angel Garcia por sus conocimientos experimentales e informáticos.

A Elvira y a Rosa por sus consejos técnicos en el laboratorio, amistad y apoyo.

A Inma por sus consejos y lecciones en el cuidado y tratamiento de los animales.

A todos los que son y han sido miembros del departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, personal de laboratorio y la Unidad Central de Investigación en especial a: Antonio, Carlos, Cintia, Luisa, Mari Cinta, M^a Carmen A., M^aCarmen, Paco, Pilar, Rocío, Sonia, Vanesa y Anabel.

***“QUE LA COMIDA SEA TU ALIMENTO Y EL ALIMENTO TU
MEDICINA”.***

Hipócrates: médico griego. C460c. 377 a.c.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Pág.
1.- El Oxígeno y su toxicidad.	1
1.1.- El Oxígeno como gas.	1
1.2.- Aparición del oxígeno molecular en la atmósfera.	3
1.3.- Toxicidad del oxígeno molecular.	5
2.- Naturaleza y concepto de radical libre.	9
3.- Fuentes de radicales libres.	12
3.1.- Fuentes endógenas.	12
3.1.1.- Cadena de transporte electrónica.	13
3.1.2.- Transporte electrónico microsomal (reacciones de hidroxilación).	16
3.1.3.- Células fagocitarias.	17
3.1.5.- La autooxidación de compuestos de carbono reducido.	18
3.1.6.- La activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario.	19
3.2.- Fuentes exógenas.	21
4.- Daño oxidativo a biomoléculas.	22
4.1.- Daño a lípidos.	23
4.1.2.- Reacciones de iniciación.	25
4.1.3.- Reacciones de propagación.	27
4.1.4.- Reacciones de terminación.	27
4.2.- Daño a proteínas.	29
4.3.- Daño al ADN.	32
4.4.- Daño al colesterol.	38
5.- Estrés oxidativo y sistema de defensa.	39
5.1.- Sistema enzimático antioxidante.	40
5.1.1.- Superóxido dismutasa o E.C. 1.15.11.	41

5.1.2.- Catalasa o E.C. 1.11.1.6.	42
5.1.3.- Glutación peroxidasa o E.C. 1.11.1.9.	44
5.2.- Defensa enzimática o “scavengers” de radicales libres.	45
5.2.1.- Glutación reducido.	46
5.2.2.- Vitamina E.	48
5.2.3.- Vitamina C.	51
5.2.4.- Carotenoides.	53
5.2.5.- Ácido lipoico.	55
5.2.6.- Compuestos fenólicos.	55
5.2.7.- Melanoidinas.	66
5.3.- Sistemas reparadores.	68
5.3.1.- Sistema reparador directo.	69
5.3.2.- Sistema reparador indirecto.	69
6.- Dieta y estrés oxidativo.	71
7.- Cerveza.	74
7.1.- Composición de la cerveza.	75
7.1.2.- Agua.	75
7.1.3.- Etanol y otros alcoholes.	75
7.1.4.- Carbohidratos.	76
7.1.5.- Compuestos nitrogenados.	76
7.1.6.- Ácidos.	77
7.1.7.- Lípidos.	77
7.1.8.- Sales minerales.	78
7.1.9.- Sustancias aromáticas.	78
7.1.10.- Vitaminas.	79
7.1.11.- Compuestos fenólicos.	80
7.1.12.- Melanoidinas.	81
7.2.- Actividad antioxidante de la cerveza.	83

8.- Agente antioxidante. La Doxorubicina (o Adriamicina).	85
8.1.- Mecanismo de toxicidad.	86
8.2.- Flavonoides y adriamicina.	89
9.- Objetivos.	92

MATERIAL Y MÉTODOS

2.- Material y métodos.	93
2.1.- Material.	93
2.1.1.- Reactivos.	93
2.1.2.- Animales.	93
2.1.3.- Cerveza.	94
2.1.4.- Aparatos.	95
2.2.- Métodos.	97
2.2.1.- Determinaciones analíticas en la cerveza.	97
2.2.1.1.- Fraccionamiento de la cerveza.	97
2.2.1.2.- Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones por el TEAC y el CEAC.	97
2.2.1.3.- Actividad antioxidante de las cervezas según el método químico DMPD.	98
2.2.1.4.- Determinación de polifenoles totales en la cerveza y en plasma a diferentes tiempos tras las ingestas de cerveza.	99
2.2.1.5.- Determinación de las catequinas.	100
2.2.1.6.- Determinación de las proantocianidinas.	101
2.2.1.7.- Determinación y aislamiento de melanoidinas.	101
2.2.1.8.- Cuantificación de las melanoidinas.	102
2.2.1.9.- Determinación del radical superóxido.	103
2.2.2.- Técnica para el aislamiento de células hepáticas.	103

2.2.3.- Pruebas de viabilidad de los hepatocitos aislados.	106
2.2.4.- Diseño experimental para los estudios “in vitro” del efecto antioxidante de la fracción 3 de la cerveza en los hepatocitos aislados de rata.	107
2.2.5.- Diseño experimental para los estudios “in vivo”.	108
2.2.6.- Aislamiento de mitocondrias de hígado y corazón de rata.	109
2.2.7.- Determinaciones analíticas en las muestras biológicas.	110
2.2.7.1.- Determinación de la actividad lactatodeshidrogenasa (LDH). E.C: 1.1.1.27.	110
2.2.7.2.- Determinación de la concentración de adenosín trifosfato (ATP).	111
2.2.7.3.- Determinación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) procedentes de la peroxidación lipídica.	111
2.2.7.4.- Determinación de grupos carbonilo en plasma.	112
2.2.7.5.- Determinación de los niveles de glutatión (GSH).	113
2.2.7.6.- Determinación de antioxidantes totales en plasma, tras la ingesta de cerveza.	113
2.2.7.7.- Determinación de la actividad NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I). E.C. 1.6.5.3.	114
2.2.7.8.- Determinación de la actividad citocromo oxidasa (complejo IV), E.C.1.9.3.1.	114
2.2.7.9.- Determinación del malondialdehído (MDA) más 4-hidroxiálkenales (HAE) en hígado y corazón de rata.	115
2.2.7.10.- Determinaciones de los niveles de la coenzima Q ₁₀ , Q ₉ y vitamina E en mitocondrias de hígado y corazón de rata.	116

2.2.7.11.- Extracción del ADN de tejidos.	117
2.2.7.12.- Hidrólisis enzimática del ADN de tejidos.	117
2.2.1.13.- Detección de la 8-hidroxideoguanosina (8-oxo-dGuo) en el ADN de hígado y de corazón.	118
2.2.7.14.- Determinación de proteínas.	118
2.2.8.- Análisis estadístico.	119

RESULTADOS

3.- Resultados.	121
3.1.- Ensayos “in vitro” con hepatocitos aislados de rata.	121
3.1.1.- Fraccionamiento y actividad antioxidante de la cerveza.	121
3.1.2.- Viabilidad celular: actividad lactatodeshidrogenasa.	125
3.1.3.- Niveles de adenosín trifosfato.	127
3.1.4.- Daño a macromoléculas.	129
3.1.4.1.- Daño a lípidos. Peroxidación lipídica.	129
3.1.4.2.- Daño a proteínas. Contenido en grupos carbonilo.	131
3.1.5.- Reserva de la capacidad antioxidante. Niveles de glutatión reducido.	133
3.2.- Estudios “in vivo” en animales de experimentación.	135
3.2.1.- Niveles de polifenoles totales, proacianidinas, catequinas, melanoidinas y actividad antioxidante en la cerveza concentrada.	135
3.2.2.- Radical superóxido.	137
3.2.3.- Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en rata.	138
3.2.4.- Actividad antioxidante total en plasma tras la suplementación con cerveza.	140
3.2.5.- Daño oxidativo a macromoléculas en la mitocondria.	141

3.2.5.1.- Alteraciones de los componentes de la cadena de transporte electrónico.	143
3.2.5.1.1.- Actividad del complejo I en la cadena de transporte electrónico.	144
3.2.5.1.2.- Actividad del complejo IV en la cadena de transporte electrónico.	146
3.2.5.1.3.- Niveles de la coenzima Q ₉ y Q ₁₀ .	148
3.2.5.1.4.- Contenido de grupos carbonilo en las proteínas plasmáticas de rata.	152
3.2.5.1.5.- Niveles de malondialdehído más 4-hidroxinonenal (MDA + 4HNE) en las mitocondrias.	153
3.2.5.1.6.- Niveles de 8-hidroxideoxiguanosina (8-oxo-dGuo) en el ADN de hígado y de corazón de rata.	155
3.2.5.1.7.- Defensa antioxidante: niveles de α -tocoferol.	157

DISCUSIÓN

4.- Discusión.	163
----------------	-----

CONCLUSIONES

5.- Conclusiones.	187
-------------------	-----

BIBLIOGRAFIA

6.-Bibliografía.	189
------------------	-----

APÉNDICE

Apéndice I, Índice de tablas.	225
Apéndice II, Índice de figuras.	226

NOMENCLATURA (o ABREVIATURA)

*OH: radical hidroxilo.

α -TE: α -tocoferol equivalentes.

2,4-DNPH: 2,4-dinitrofenil hidracina.

4-HNE: 4-hidroxinonenal.

8-oxo-dG: 8-8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina.

8-oxo-dGuo: 8-oxo-deoxiguanosina.

ABTS 2: 2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).

Acetil CoA: coenzima A.

ACV (ARV): accidente cerebrovascular.

ADN: ácido deoxirribonucleico.

ADP: adenosina difosfato.

ADR: adriamicina.

ATP: adenosina trifosfato.

BHT: hidroxil butilato tolueno.

CAT: catalasa.

CoQ: ubiquinona.

CYP₄₅₀: citocromo P₄₅₀.

Cyto-C: citocromo C.

EC: epicatequina.

ECG: galato epicatequina.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EGC: epigalocatequina.

ENOS: óxido nítrico sintasa endotelial.

ERA (ARE): elementos de respuesta a antioxidantes.

EROs: especies reactivas del oxígeno.

ERN: especies reactivas del nitrógeno.

ESCODD: european standards committee on oxidative DNA damage.

ABREVIATURAS

EUROFEDA: european research on the functional effects of dietary antioxidants.

cGPX: glutatión peroxidasa citosólica.

GPX: glutatión peroxidasa.

GR: glutatión reductasa.

GSH: glutatión reducido.

GSHP_x: glutatión peroxidasa.

GSSH: glutatión (oxidada).

GST: glutatión transferasa.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HDL: high-density lipoproteins, lipoproteínas de alta densidad.

HOBr: ácido hipobromoso.

HOCl: ácido hipocloroso.

HOO•: radical hidroperoxilo.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

INOS: NOS Inducible.

LDL: low-density lipoproteins, lipoproteínas de baja densidad.

MDA: malonaldehído.

MnSOD: Mn-superóxido dismutasa.

MONICA: Monitoring of trend and determinants in cardiovascular disease.

MtADN: ADN mitocondrial.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

NO•: óxido nítrico.

NOS: óxido nítrico sintasa.

O₂^{•-}: radical superóxido.

ONOO⁻: peroxinitrito.

PUFA: polyunsaturated fatty acid, ácidos grasos poliinsaturados.

RNS: reactive nitrogen species, especies reactivas del nitrógeno.

REB (BER): reparación por escisión de bases.

ABREVIATURAS

SD: standard deviation, desviación estandar.

SOD: superóxido dismutasa.

TBA: ácido tiobarbitúrico.

TBARS: tiobarbituric acid reactive substances, substancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico.

TNF- α : tumour necrosis factor α , factor de necrosis tumoral α .

1.- INTRODUCCIÓN.

1.- EL OXÍGENO Y SU TOXICIDAD.

La historia del conocimiento de los efectos de los radicales libres o especies reactivas corre paralela a la del descubrimiento del oxígeno y a la del estudio del metabolismo energético en los seres vivos.

1.1.- EI OXÍGENO COMO GAS.

La historia del oxígeno comienza con el descubrimiento del teólogo inglés Joseph Priestley y el sueco farmacólogo Carl Wilhelm Scheele, quienes aportaron importantes demostraciones experimentales sobre la producción de oxígeno por las plantas y la obtención de oxígeno gaseoso mediante calentamiento de dióxido de mercurio. Poco tiempo después aparecieron las primeras reseñas sobre las propiedades tóxicas del oxígeno cuyos primeros contribuyentes fueron el químico francés Lavoisier quién denominó al nuevo elemento “oxígeno” (Hensley y Floyd, 2002).

En 1818 Louis-Jacop Thenard descubrió un método para preparar peróxido de hidrógeno y en 1840 Schonbein descubrió el ozono. Unos años más tarde comienzan a aparecer las primeras observaciones en base científica que apuntan hacia el poder tóxico de este gas para los animales de vida aerobia (Bannister, 1986).

Hoy sabemos que el oxígeno molecular es uno de los elementos gaseosos más abundantes de la naturaleza que se presenta en forma de gas diatómico.

INTRODUCCIÓN

A pesar de contener un número par de electrones, el oxígeno molecular se comporta como una molécula paramagnética, es decir, dos de sus electrones se encuentran localizados en orbitales diferentes y girando en un mismo sentido con espines paralelos. Esto lleva implícito ciertas connotaciones de interés en relación con su mecanismo de acción molecular y más concretamente en su función oxidativa.

Recordemos que un átomo es un núcleo cargado positivamente, rodeado de electrones cargados negativamente, y que estos electrones ocuparán niveles de energía discretos cada uno de ellos, pudiendo contener hasta un máximo de dos electrones. El oxígeno tiene tendencia a completar su estructura electrónica en su última capa con 8 electrones (ley del octeto). El núcleo de un átomo de oxígeno está rodeado de 6 electrones, pero existen diversas configuraciones estables que puede adoptar este átomo (McCord, 2000).

Un átomo de oxígeno individual puede adquirir dos electrones para completar los ocho y convertirse en un ión óxido. También pueden unirse dos átomos de oxígeno para compartir un par de electrones cada uno. Así se forma la molécula de oxígeno diatómico.

Finalmente, si una molécula de oxígeno adquiere un electrón extra en el curso de una reacción, se transforma en otra especie paramagnética y monorradical cargado negativamente que se conoce como anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este es uno de los radicales libres o especies reactivas más importantes responsables de la llamada toxicidad del oxígeno. Su formación en los

INTRODUCCIÓN

sistemas biológicos ha sido demostrada por numerosos científicos y ha supuesto, además, punto de partida de otros muchos trabajos. Su importancia metabólica cobra importancia desde el descubrimiento del enzima superóxido dismutasa (SOD), por McCord y Fridovich en 1969, lo que proporcionó la primera evidencia "in vivo" del anión superóxido y la subsecuente identificación de las defensas antioxidantes. Esta enzima es la encargada de la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno.

1.2.- APARICIÓN DEL OXÍGENO MOLECULAR EN LA ATMÓSFERA.

El oxígeno molecular aparece en la atmósfera aproximadamente hace 2,5 miles de millones de años. En la era precámbrica temprana, la concentración de oxígeno atmosférico no superaba el 0'1%. Los organismos primitivos, todavía no capacitados para la utilización de oxígeno para la obtención de energía, debían hacer uso de los materiales inorgánicos no biológicos existentes.

La aparición del oxígeno molecular y la progresiva oxigenación de la atmósfera terráquea es producto de un proceso conocido como fotosíntesis y llevado a cabo por uno de los organismos más primitivos que poblaron la tierra, las algas cianofíceas (Echelin, 1970).

Ahora bien, la aparición en un principio del oxígeno molecular forma parte de un estadio evolutivo, marcado ya desde un principio, por la presencia de radicales libres o especies reactivas generadas como consecuencia de la

INTRODUCCIÓN

acción de las radiaciones ionizantes generadoras o responsables de la producción de las primeras moléculas químicas (Harman, 1986).

Con su aparición, empieza la oxigenación de la atmósfera ambiental que alcanza el 1% de su concentración actual y esto desencadena una presión evolutiva sobre los microorganismos que en aquel entonces poblaban la tierra.

Mucho más tarde hace 500 millones de años, el oxígeno atmosférico alcanzó el 10% de su presión atmosférica actual coincidiendo este proceso con la aparición de organismos de origen marítimo.

Esta presión evolutiva fue señalada en una de sus revisiones por Irvin Fridovich en 1978, descubridor de la SOD, quién atribuía a la presencia de oxígeno en la tierra la desaparición de especies orgánicas incapaces de metabolizar y defenderse contra las acciones de aquella molécula y más concretamente contra la acción de las especies oxigénicas producidas mediante su oxidación monovalente (Fridovich, 1974; 1978). Y así, solo aquellos organismos capaces de desarrollar mecanismos enzimáticos reactivos derivados fueron adaptándose paulatinamente a la progresiva oxigenación de la atmósfera.

De cualquier forma, independientemente de las teorías evolutivas y sus mecanismos de selección, es evidente que el oxígeno fue seleccionado por la naturaleza para actuar como aceptor terminal de las oxidaciones celulares, desempeñando así, una función clave en su reacción con la citocromo oxidasa,

INTRODUCCIÓN

representando el último eslabón de la cadena de transporte electrónico. Es por este mecanismo por el que se produce más del 90% del oxígeno consumido por las células de los animales superiores, y en el que reside la función y acción más importante desde un punto de vista evolutivo.

El metabolismo celular es de esta forma, el resultado de una serie de reacciones de óxido-reducción cuya finalidad última es la obtención de energía biológica o química para conseguir la realización de las distintas modalidades de trabajo biológico como síntesis de macromoléculas, transporte activo, movimientos musculares, mecanismos de secreción, etc.

El mecanismo por el cual se degradan moléculas orgánicas para la obtención de energía química en forma de ATP es el proceso de la respiración celular, que reconoce tres fases metabólicas importantes, y donde el oxígeno, como aceptor principal de electrones con un potencial de óxido-reducción muy negativo, desempeña la función principal de lanzadera y directriz del mismo. La última fase de esta respiración celular tiene lugar en la mitocondria que presenta, de acuerdo con esta función, un metabolismo energético muy activo cuyas consecuencias son tanto ventajosas como coadyudantes de otros procesos y mecanismos.

1.3.- TOXICIDAD DEL OXÍGENO MOLECULAR.

Una de las primeras reseñas bibliográficas conocida sobre la toxicidad del oxígeno se la debemos a Lavoisier quién en 1785 ya sugirió que el exceso de

INTRODUCCIÓN

la administración de oxígeno podría ser tan peligroso como su defecto. Más tarde, en el siglo XVIII, se descubrieron otros productos derivados del oxígeno como el H_2O_2 y el ozono cuyos efectos son claramente nocivos desde el principio de su síntesis (Bannister, 1986).

El estudio de los mecanismos de acción y efectos citotóxicos de los radicales libres o especies reactivas representa, en la actualidad, uno de los campos de la investigación científica de mayor interés dentro de las especialidades biomédicas. Las investigaciones realizadas sobre el papel de los radicales libres o especies reactivas oxigénicas ha contribuido en gran medida al esclarecimiento de los mecanismos fisiopatológicos de diversas enfermedades, hasta entonces desconocidos o escasamente resueltos, así como el tratamiento de diversas patologías.

A lo largo de la historia, el concepto de radical libre y su existencia se ha visto envuelto en una nube de controversias conceptuales. Los “radicales”, en términos generales, eran considerados como grupos químicos de moléculas o formando parte de la estructura de éstas, sin considerar al radical en estado libre. Por otra parte, los métodos y técnicas experimentales existentes en un principio no estaban todavía suficientemente desarrolladas para este tipo de determinación (Pryor, 1976).

Los estudios sobre la fase de solución del radical trifeníl-metilo llevados a cabo por Moses Gomberg en 1900 junto al trabajo de Paneth en 1926 sobre la fase gaseosa del radical alquilo convencieron incluso a los más escépticos de

INTRODUCCIÓN

la existencia real de los radicales libres (Hensley y Floyd, 2002). El interés científico por los radicales libres comenzó en los años 30 con los estudios por parte de Kharasch y Mayo, quienes demostraron que la adición de bromhídrico (HBr) anti-markovnikow al propeno implica la participación de radicales. Asimismo, en los trabajos de Waters Hey, quienes elucidaron el mecanismo de acción de la sustitución aromática homolítica, demostraron que las reacciones con radicales ocurrían en un variado número de sistemas orgánicos (Waters, 1948; Walling, 1957; Pryor, 1966; Pryor, 1976). Por otra parte, entre 1935 y 1945 se desarrollaron técnicas para la obtención de caucho sintético, así como la invención de la producción de plásticos a partir de la polimerización de radicales, utilizando varios monómeros de vinilo. Estos avances convirtieron la química de los radicales libres en un campo fascinante donde alternaban problemas tanto de investigación teórica como práctica y, a partir del cual, se divisaban consecuencias y aplicaciones industriales prometedoras.

Con Michaelis se empieza a barajar la hipótesis del radical libre como responsable de la toxicidad del oxígeno. Fue Michaelis quién publicó en 1939 la participación de los radicales libres como intermediarios de las oxidaciones orgánicas. Tanto Michaelis en 1946 como Gilbert y Gerschamn en 1954 aportaron las primeras bases teóricas y científicas para explicar la toxicidad del oxígeno mediada por especies altamente reactivas (Michaelis, 1939; Michaelis, 1946; Chance, 1961; Gilbert, 1981).

INTRODUCCIÓN

Desde los años 50 en adelante se ha ido aceptando la participación de especies reactivas en la mayoría de los procesos bioquímicos de los sistemas biológicos.

Posteriormente y gracias a los experimentos de Fridovich y Handler, el radical superóxido cobra un enorme interés en el campo de la bioquímica (Fridovich et al., 1961). Porque se demuestra su formación por enzimas celulares tales como la xantina oxidasa y por otro lado porque se descubre la existencia de una enzima, la superóxido dismutasa, capaz de transformar el ión superóxido en un producto de menor reactividad como el H_2O_2 que a su vez es reducido en agua y oxígeno por la acción de la catalasa.

A partir de entonces, estas especies y la propuesta de otras que se irían descubriendo posteriormente, adquieren un papel protagonista en los mecanismos de acción citotóxica del oxígeno. Las implicaciones de esta toxicidad pueden ser consideradas en procesos bioquímicos, tóxicos-metabólicos y fisiopatológicos, cuya base molecular obedece o es consecuencia de un mecanismo general conocido como estrés oxidativo. A pesar de las enzimas metabolizadoras y defensivas contra el oxígeno y sus radicales libres, este sigue siendo un peligro amenazador y continuo para las células vivas.

2.- NATURALEZA Y CONCEPTO DEL RADICAL LIBRE.

Los radicales libres (RL) son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior, y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas, lo que les confiere una alta e indiscriminada reactividad.

Actualmente los radicales libres también son conocidos como especies reactivas oxigénicas o del oxígeno, EROs o ROS, y especies reactivas del nitrógeno ERN o RNS. La combinación de estos radicales libres da lugar a otras especies reactivas no radicales también llamados ROM (reactives oxygen metabolites) o metabolitos reactivos del oxígeno o AO (active oxygen). Entre las especies oxigénicas reactivas cabe destacar las que aparecen en la Tabla1.

Según Halliwell en 1996, tanto ROS como RNS son términos globales que en inglés incluyen tanto radicales como algunos no radicales que son agentes oxidantes del oxígeno y del nitrógeno, y/o son fácilmente convertidos en radicales, es decir, son especies reactivas sean o no radicales libres. Ciertos radicales aparecen a veces clasificados en ambas categorías, y las especies derivadas del cloro podrían ser llamadas especies reactivas del cloro. El término reactivo no es un término apropiado globalmente ya que hay radicales y no radicales como H_2O_2 , NO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ que son muy pocos reactivos, mientras que el OH^\bullet reacciona rápidamente con casi todas las moléculas.

Tabla 1.- Especies Oxigénicas Reactivas.

	Radicales	No Radicales
ROS	Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peroxido de Hidrógeno (H_2O_2)
	Hidroxilo ($\bullet OH$)	Ácido Hipocloroso ($HOCl$)
O	Peroxilo (RO_2)	Ozono (O_3)
EROs	Alcoxilo (RO^{\bullet})	Oxígeno Singlete (1O_3)
	Hidroperoxilo (HO_2)	
RNS		Ácido Nitroso (HNO_2)
		Tetróxido de Dinitrógeno (N_2O_4)
O	Óxido Nítrico (NO)	Trióxido de Dinitrógeno (N_2O_3)
	Dióxido Nítrico (NO_2)	Peróxinitrito ($ONOO^-$)
ERN		Ácido Peroxinitroso ($ONOOH$)
		Catión Nitronio (NO_2^+)
		Peroxinitritos Alkilos ($ROONO$)

Son muchas las especies oxigénicas que actúan como oxidantes biológicos. La capacidad de cada radical o especie oxigénica reactiva viene determinada, desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas, como son: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. El $O_2^{\bullet-}$ es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} convirtiéndose en un agente oxidante muy activo, selectivo y específico. El $O_2^{\bullet-}$ no es particularmente reactivo con lípidos, glúcidos o ácidos nucleicos y exhibe reactividad limitada con determinadas proteínas. Esta evidencia constata que el $O_2^{\bullet-}$ reacciona con proteínas que contienen metales en su grupo prostético. El OH^{\bullet} , sin embargo, reacciona con cualquier molécula que tenga cerca, sin especificidad alguna y el peligro radica en la importancia funcional del compartimento celular en el que se origina o la molécula a la que ataque. Así pues, si ataca al ADN puede producir o generar graves alteraciones. Por el contrario, si la producción del radical tiene lugar en un entorno como el plasma

INTRODUCCIÓN

y la molécula dañada es un enzima que se encuentra presente en gran cantidad, el daño biológico real será prácticamente imperceptible. Los tres componentes con mayor capacidad de difusión son $O_2^{\bullet-} < H_2O_2 < OH^{\bullet}$, capaces de reaccionar con moléculas que se encuentran alejadas del lugar de origen incluso con capacidad de atravesar membranas celulares (Figura 1).

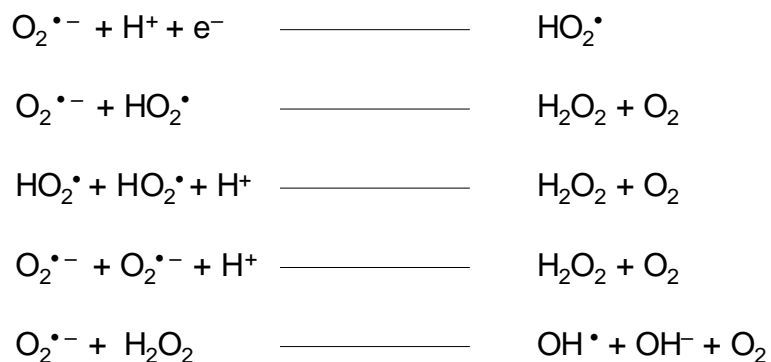


Figura 1.- Reactividad de especies oxigénicas.

La producción de los radicales libres tiene que ser controlada continuamente y mantenida a muy bajas concentraciones por parte de los distintos mecanismos disponibles por las células obligadas a desarrollarse en ambientes aeróbicos. Por esta razón las especies oxigénicas se producen en ambientes suficientemente circunscritos para impedir su difusión o, en su defecto, controlados por la acción de las enzimas defensivas sintetizadas por las células aeróbicas encargadas de su rápida metabolización a especies más estables o inofensivas.

3.- FUENTES DE RADICALES LIBRES.

Se sabe que los radicales libres se producen de forma natural como intermediarios o productos de numerosas reacciones oxidativas de las células, así como a través de diversos procesos físico-químicos o de biotransformación (Pryor, 1976). También existen fuentes externas. Es decir, se ha de considerar el origen tanto endógeno como exógeno de las especies reactivas oxigénicas y especies reactivas del nitrógeno. Las EROs pueden producirse a través de la exposición a oxidantes medioambientales, tóxicos y metales pesados, que pueden perturbar el equilibrio entre las reacciones de reducción celular y las de oxidación, alterando la normalidad de las funciones biológicas.

3.1.- FUENTES ENDÓGENAS.

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

- La cadena de transporte electrónico.
- El transporte electrónico microsomal. (Reacciones de hidroxilación).
- Las células fagocitarias.
- La autooxidación de compuestos de carbono reducido.
- La activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermedio como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamina oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa (Beckman et al., 1998; Lindsay et al., 2002).

3.1.1.- Cadena de transporte electrónico.

En general, se asume que la mitocondria proporciona la mayor fuente de EROs en la mayoría de las células (Halliwell y Gutteridge, 1989; Lindsay et al., 2002; Fang et al., 2002). La principal función de la mitocondria es generar energía, siendo la cadena de transporte electrónico el último eslabón de la combustión de los nutrientes para la obtención de energía en forma de ATP.

En la membrana interna se encuentran las proteínas que forman la cadena de transporte electrónico (Figura 2). Se ensamblan cinco complejos multiproteicos, denominados I, II, III, IV, y V. Los complejos I, II, III y IV, aceptan y pasan electrones desde un transportador electrónico a otro. Estos transportadores móviles son: el NADH, el succinato, la coenzima Q, el citocromo c y el oxígeno. La energía liberada por las acciones de los complejos I, III y IV impulsa la síntesis de ATP por el complejo V o ATP sintasa. El complejo I y el complejo II reciben electrones de la oxidación del NADH y del succinato, respectivamente y lo pasan a un transportador electrónico lipídico, la coenzima Q, que se desplaza libremente a través de la membrana. El complejo III oxida la forma reducida de la coenzima Q y reduce a su vez el citocromo c, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por el interior de la membrana interna. La energía liberada por estas reacciones exergónicas crea un gradiente de protones a través de la membrana interna, al bombardearse los protones hacia el espacio intermembrana. Los protones vuelven a entrar luego en la membrana a través de un canal específico en el

INTRODUCCIÓN

complejo V. La energía liberada por este proceso exergónico impulsa la síntesis de ATP (Mathews y van Holde, 1998).

Mediante este mecanismo de reducción secuencial, se generan tres especies altamente reactivas conocidas como radicales libres o especies oxigénicas reactivas y a las que se les considera responsables de la toxicidad del oxígeno. Estas especies son el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical libre hidroxilo (OH^{\bullet}). Su toxicidad es consecuencia de su extremada reactividad que a su vez se desprende de su condición físico-química, característica de la mayoría de las especies paramagnéticas, es decir, dotadas de un electrón desapareado en su última capa energética. La excepción en este caso la manifiesta el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que si bien no adopta dicha estructura altamente inestable, entra a formar parte de importantes reacciones rédox para reducirse u oxidarse a especies de mayor reactividad (Figura 2), (Fridovich, 1978; Ames et al., 1993).

En la cadena respiratoria, la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos. Sin embargo, el 95% del oxígeno que respiramos es reducido a H_2O por la acción de la citocromo oxidasa-a-3, último eslabón de la cadena de transporte electrónico, mediante un mecanismo en el que participan cuatro centros redox proporcionando, además, la principal fuente de energía (ATP) al organismo. También a nivel del complejo I y del complejo quinona-semiquinona-ubiquinol (Q_{10}) actuando como aceptores de electrones se puede formar el $O_2^{\bullet-}$ (Figura 2).

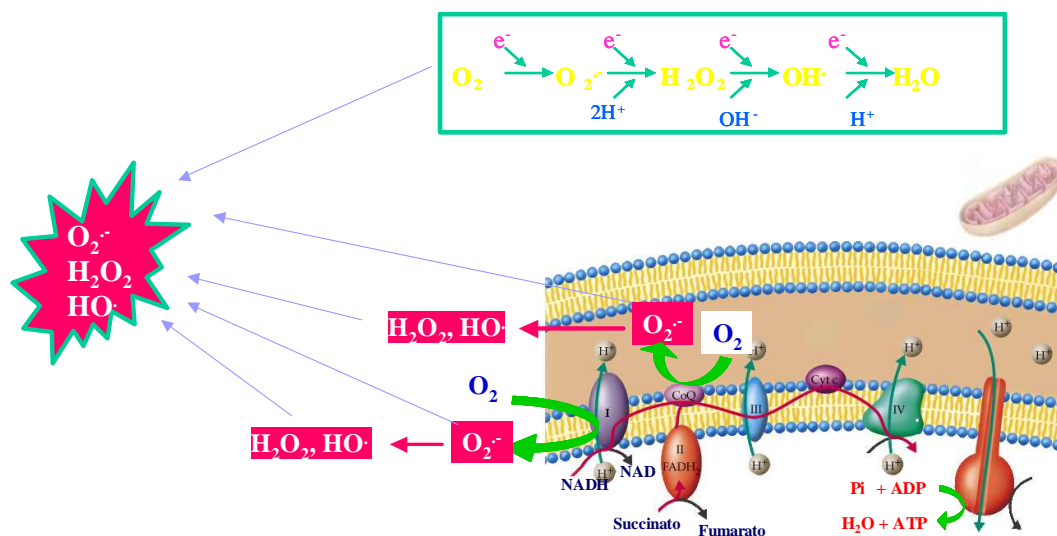


Figura 2.- Generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) en la reducción monovalente del oxígeno y en la cadena de transporte electrónico.

Esta situación ocurre de forma habitual en mitocondrias sanas, sin embargo, esta producción puede ser mucho mayor en determinados procesos fisiológicos como el envejecimiento. Cualquier situación fisiológica que implique un aumento de la respiración mitocondrial supondrá un incremento en la formación de radicales libres. Esto es lo que ocurre por ejemplo durante la práctica de ejercicio físico.

La mitocondria puede generar más del 85% de los EROs en el tejido muscular esquelético (Chance et al., 1979; Lindsay et al., 2002). Se ha estimado que la generación del $\text{O}_2^{\bullet -}$ y del H_2O_2 está alrededor del 2% del total del flujo de electrones en mitocondrias de células de rata (Ames et al., 1993; Beckman et al., 1998), y que entre el 1-2% del O_2 consumido por el organismo es convertido en $\text{O}_2^{\bullet -}$ y que por dismutación dará lugar a la formación de otros

EROs, se ha estimado que el ser humano puede producir alrededor de 2 Kg de superóxido en el cuerpo cada año y que individuos con procesos inflamatorios crónicos pueden generar mucho más (Halliwell, 1994; Halliwell, 1996; McCord 2000; Fang et al. 2002).

3.1.2.-Transporte electrónico microsomal (reacciones de hidroxilación).

Los peroxisomas, orgánulos responsables de la degradación de ácidos grasos, también pueden originar la formación de radicales libres, produciendo como subproducto H_2O_2 que es degradado por la enzima catalasa.

El retículo endoplásmico, es decir, la fracción microsomal de la célula, contiene el sistema de transporte electrónico no fosforilante (diferente del transporte electrónico mitocondrial que es fosforilante). Dichos sistemas participan en diversas reacciones de hidroxilación y desaturación que producen radicales libres y EROs. Un sistema de hidroxilación, lo constituyen los enzimas microsomales del citocromo P-450, que se encargan de la metabolización de xenobióticos.

Destaca el sistema microsomal hepático (Figura 3). Constituido por una flavoproteína denominada NADPH-citocromo P_{450} reductasa, y un citocromo microsómico, el P_{450} . Un equivalente electrónico es transferido desde NADPH a la flavoproteína que contiene un grupo prostético FAD, al que reduce por completo. Posteriormente, los electrones son transferidos desde la flavoproteína reducida a la forma oxidada del citocromo P_{450} (Fe^{3+}) para dar la

forma reducida $P_{450} (Fe^{2+})$. Ésta es la que reacciona con (O_2) formando el ión superóxido (Figura 3).

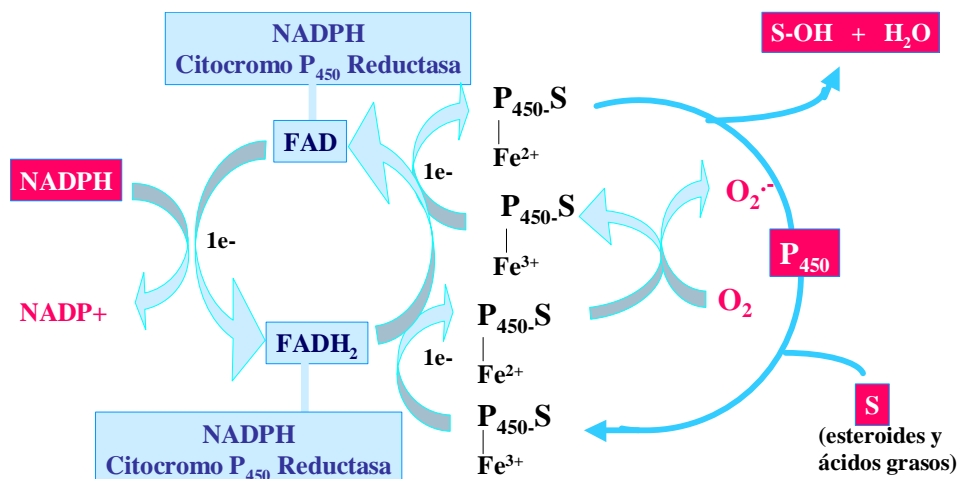


Figura 3.- Sistema hidroxilante microsomal hepático.

La hidroxilación que se realiza puede darse en diversos compuestos de gran importancia biológica como esteroides y ácidos grasos.

3.1.3.- Células fagocitarias.

Un hecho común a todo tipo de inflamación es la infiltración en el tejido afectado de células capaces de moverse libremente. Se trata fundamentalmente de leucocitos, neutrófilos, monocitos o macrófagos. Estas células se activan y llevan a cabo la fagocitosis a través de un mecanismo de consumo de oxígeno. Dicho consumo puede llegar a ser de hasta veinte a treinta veces superior al que existe previo a la activación. Utilizan el sistema de

INTRODUCCIÓN

la NADPH oxidasa generando directamente $O_2^{\bullet-}$. Por otra parte, dichas células también generan óxido nítrico (NO), por acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular, como mecanismo de defensa. La combinación del $O_2^{\bullet-}$ con el NO da lugar a la formación del $ONOO^-$ capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas y destruir así las membranas celulares (Nathan y Xie, 1994),(Figura 4).

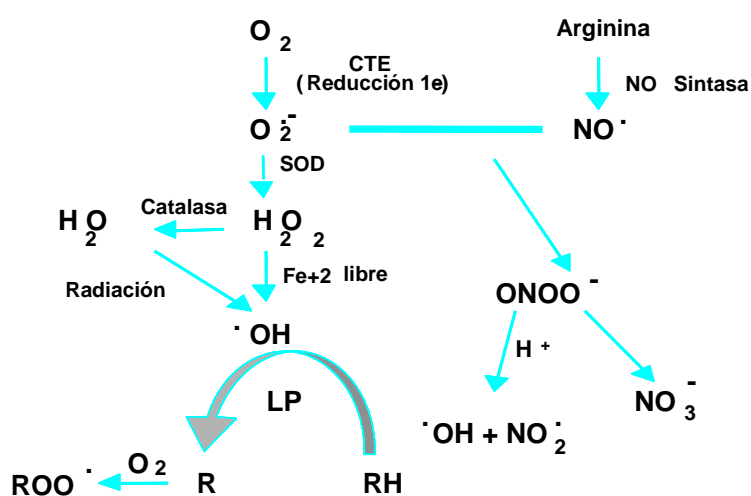


Figura 4.- Sistema oxidante en las células fagocitarias.

3.1.4.- Autooxidación de compuestos de carbono reducido.

La autooxidación de compuestos de carbono reducido como son aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de $O_2^{\bullet-}$.

3.1.5.- Activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario.

La activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, óxido nítrico sintasa, son fuentes representativas de esta producción.

Un ejemplo es la desaminación de la dopamina por la monoamina oxidasa que genera H_2O_2 en algunas neuronas y que ha sido implicada con la etiología de la enfermedad de Parkinson (Fahn et al., 1992).

Otro ejemplo lo constituye la enzima óxido nítrico sintasa (NOS tipo I, II, III), que en las células produce uno de los radicales más relevantes en la regulación biológica, el óxido nítrico. Otro de los radicales más relevantes es el superóxido producido por la NAD(P)H oxidasa (Beckman et al.,1998; Dröge, 2002).

La xantina oxidasa es otro enzima que participa en la producción de EROs, genera superóxido por la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico (Figura 5). En condiciones fisiológicas, ésta oxidación está catalizada por la xantina deshidrogenasa, enzima que utiliza como aceptor de electrones el NAD^+ . Sin embargo, cuando hay alteración de los mecanismos homeostáticos celulares, como puede suceder en situaciones de isquemia y reperfusión, tiene lugar una conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, debido a un

INTRODUCCIÓN

aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que produce una activación de determinadas proteasas como la calpasa. La xantina oxidasa cataliza la misma reacción que la xantina deshidrogenasa pero utiliza el oxígeno como aceptor de electrones con la consiguiente reducción del oxígeno molecular y, formación de anión superóxido.

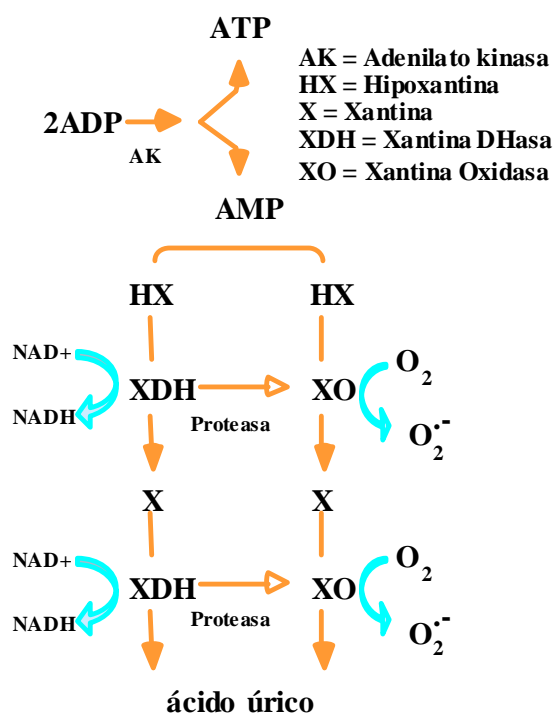


Figura 5.- Esquema de la conversión de xantina deshidrogenasa

en xantina oxidasa.

3.2.- FUENTES EXÓGENAS.

Como se ha comentado anteriormente, también existe un origen exógeno de EROs. Las fuentes exógenas pueden ser:

- Ambientales: radiaciones electromagnéticas, luz solar, ozono y tabaco. Los radicales libres se pueden producir en respuesta a las radiaciones electromagnéticas, como los rayos gamma, que pueden escindir el agua y producir radicales hidroxilo (Hallywell, 1996; Betteridge, 2000). Los óxidos de nitrógeno en el humo de cigarrillos causan la oxidación de macromoléculas y la reducción de los niveles de antioxidantes, lo que contribuye a la aparición de patologías en el fumador como procesos cardiovasculares y una variedad de cánceres, especialmente cáncer de pulmón (Ames et al., 1993; Halliwell, 1994; Betteridge, 2000; Valls-Bellés y Muñiz 2001).

- Farmacológicas: Xenobióticos, drogas, etc. (Valls-Bellés, 2001). Como es el caso de las antraciclinas, que interactúan con el complejo I de la cadena de transporte electrónico e inducen la formación de radicales libres.

- Nutricionales: Contaminantes, aditivos, etc. Las sales de hierro y cobre promueven la formación de radicales libres generando H_2O_2 . Cuando un individuo absorbe una cantidad significativa de hierro dietético debido a un defecto genético, particularmente hierro hemo, se convierte en un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y cáncer (Ames et al., 1990; Valls-Bellés, 2001).

4.- DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS.

Aunque tradicionalmente las EROs se han observado desde un punto de vista negativo para la función y viabilidad celular, estas pueden jugar un papel importante en el origen de la vida y la evolución biológica con efectos beneficiosos en los organismos. En los últimos años se han reconocido y reevaluado la función de las EROs y su papel en funciones de la señalización y de la modulación de la expresión génica. De hecho no es fácil catalogar a las EROs o radicales libres como moléculas beneficiosas o dañinas. Según Jackson y colaboradores 2002, todo depende del proceso celular que se analice, para ello estos autores toman dos ejemplos:

Así por ejemplo, en la muerte celular por necrosis a consecuencia de los mecanismos de isquemia-reperfusión, las EROs no son beneficiosas, mientras que en la muerte celular por apoptosis pueden ser vistas como dañinas o beneficiosas.

El papel de las EROs en los procesos de inflamación también puede ser ambivalente. Se ha visto claramente como beneficiosos en el papel proinflamatorio ya que proporciona un perfeccionamiento en la respuesta inmune siguiendo a la infección, pero en trastornos como la artritis reumatoide, la respuesta inflamatoria inapropiada generada por ellos debe ser suprimida.

Dañinas o beneficiosas, los investigadores han llegado a la conclusión de que las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante en los

cambios de la modulación en la expresión génica y función celular y que estos cambios pueden ser utilizados como biomarcadores de estrés oxidativo.

Las EROs causan oxidación a biomoléculas tales como lípidos poliinsaturados, moléculas de colesterol, glúcidos, proteínas y ácidos nucleicos las cuales son susceptibles de ser atacadas in vivo por radicales libres (Figura 6).

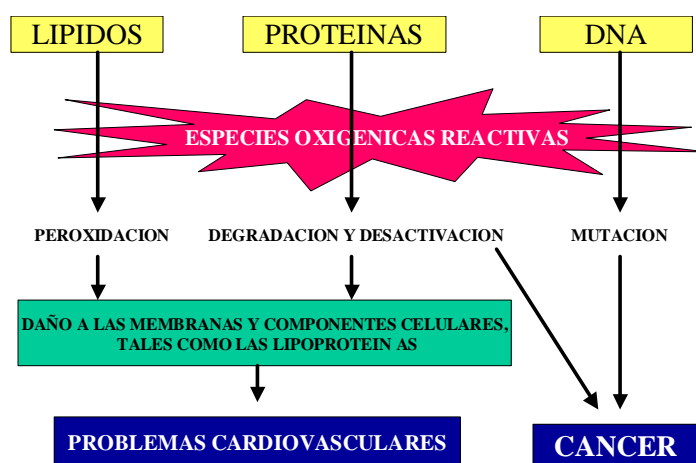


Figura 6.- Daño producido en las biomoléculas.

4.1.- DAÑO A LÍPIDOS.

Los ácidos grasos poliinsaturados son altamente susceptibles de ser alterados por radicales libres, produciendo peroxidación lipídica. Ya que poseen dobles enlaces C=C de tipo cis, repitiéndose en ellos la estructura divinil-metano, cada doble enlace está separado del sucesivo por un CH₂ alílico, lo que lo hace particularmente susceptible al ataque de los radicales libres.

INTRODUCCIÓN

La cadena de reacciones que los radicales libres producen en los ácidos grasos consiste en tres etapas esenciales: iniciación, propagación y terminación (Figura 7).

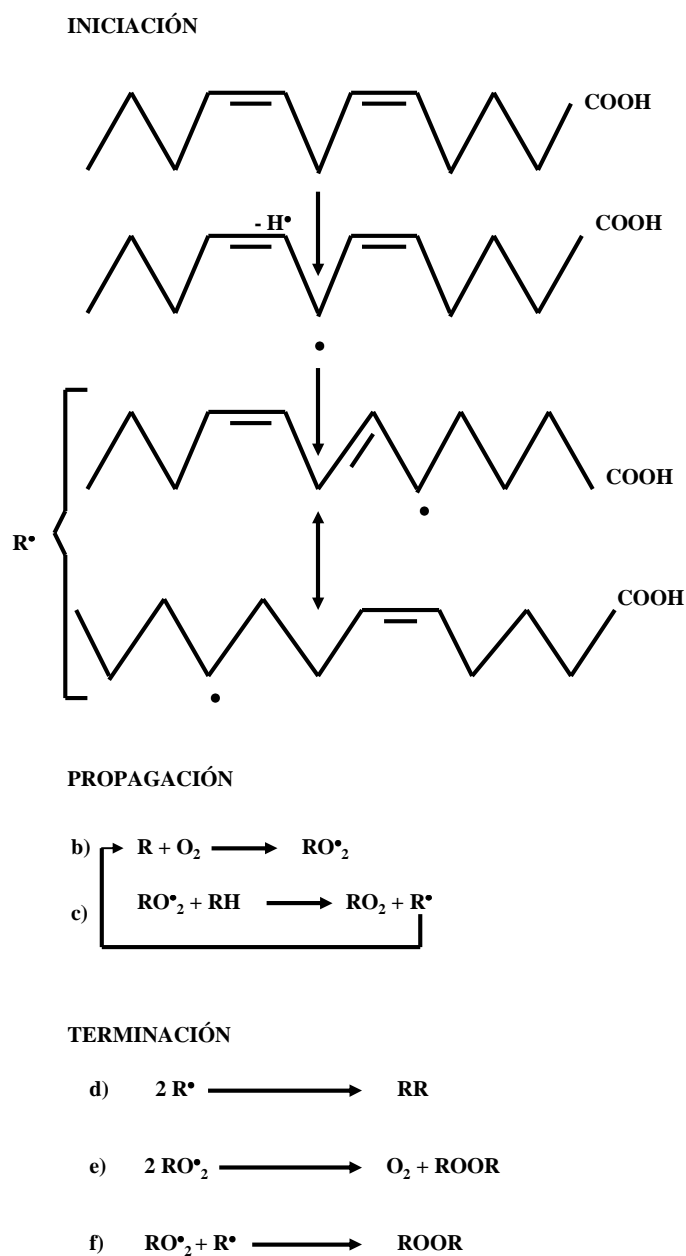


Figura 7.- Esquema de la peroxidación lipídica.

4.1.1.- Reacciones de Iniciación

Cualquier especie capaz de secuestrar un átomo de hidrógeno de una cadena carbonada en un ácido graso (LH) dará lugar a un radical localizado en el átomo de carbono correspondiente (C^\bullet ó L^\bullet) de esta estructura (Figura 7). En la molécula del ácido graso se produce una reestructuración para formar un dieno conjugado, un cambio en la disposición de los dobles enlaces, junto con el corrimiento del radical carbonilo (C^\bullet) para situarse sobre el siguiente átomo adyacente.

En la peroxidación lipídica existen otros mecanismos iniciadores, como pueden ser los desencadenados por los propios productos de la peroxidación lipídica, ya que se trata de especies activadas, si bien, pueden también considerarse como agentes propagadores en el sentido de generar y atacar a estructuras lipídicas vecinas. Es importante el papel de la transferencia electrónica a partir de iones metálicos, puesto que las reacciones redox entre iones metálicos de transición y compuestos peróxidos juegan un papel importante en la formación de radicales libres “in vivo”. Este es el caso del cobre y el hierro principalmente, aunque la reacción de iniciación de la peroxidación lipídica se ha observado también con otros metales de transición. El mecanismo de acción más importante desde el punto de vista de la producción “in vivo” es la reacción de Fenton (Pryor, 1976; Gutteridge et al., 1986; Wink et al., 1994; Lloyd et al., 1997).

INTRODUCCIÓN

Sin duda, la especie responsable de esta iniciación en presencia de iones metálicos es el radical hidroxilo. Tanto esta especie como otras derivadas de la peroxidación lípida son capaces de abstraer un átomo de hidrógeno por sí solos (Gutteridge et al., 1985; Halliwell et al., 1992).

Existe otro mecanismo de iniciación de las reacciones de peroxidación, como es la ruptura de enlaces químicos por acción fotolítica (Pryor, 1976; Elgendy et al., 1998).

No se debe olvidar el papel de las radiaciones ionizantes como mecanismo iniciador del daño tisular. Es un hecho suficientemente conocido no sólo en la patología clínica, sino también en la industria de síntesis de polímeros, el papel de las radiaciones ionizantes y las especies intermediarias reactivas en dichos procesos (Bertsche, 1984).

Finalmente, hay que mencionar el papel de las reacciones tóxicas desencadenadas por diversos xenobióticos como el tetracloruro de carbono, o fármacos antitumorales como la adriamicina, en cuyo mecanismo de acción farmacológica está implicada la formación de especies moleculares activadas, y cuya selectividad celular o no actuación sobre células normales está por resolver (Valls-Bellés et al., 1994).

4.1.2.- Reacciones de propagación.

Son reacciones en las cuales, a diferencia de lo que ocurre en los procesos de iniciación y terminación, se mantiene constante el número de radicales libres que en ellas participan.

Después de la abstracción de un hidrógeno y el reajuste molecular, el radical creado presenta una alta reactividad con las moléculas de O₂, dando lugar al radical peróxido (RO[•]₂).

Por otra parte, el radical peróxido puede inducir a la abstracción de otra molécula de ácido graso vecina, iniciando de esta forma otro ciclo de peroxidación. La reacción terminará cuando se produzca un consumo de sustratos o por la extinción de especies paramagnéticas a radicales o moléculas de mayor estabilidad y menor reactividad.

4.1.3.- Reacciones de terminación.

Las reacciones de terminación suponen un proceso en el que participan más de un tipo distinto de radicales libres y en el que varios mecanismos de terminación son posibles.

Son esencialmente tres reacciones de terminación, que conducen a la desaparición de las especies más reactivas, para ir sustituyéndolas progresivamente por moléculas de mayor estabilidad química.

INTRODUCCIÓN

De entre estas tres reacciones, se diferencian dos tipos: d) Homoterminación y e) y f) Terminación cruzada (Figura 7).

Los radicales $2RO^\bullet$ y O_2^\bullet se combinarán entre sí para formar el compuesto ROOR, o bien para sufrir oxidaciones posteriores. La elección entre uno u otro camino reaccional dependerá, entre otras cosas, de la viscosidad, así como de la concentración del oxígeno en el medio. El factor determinante para que se produzca una u otra reacción será la estructura del sustrato.

Las connotaciones de las reacciones de terminación pueden resultar importantes desde el punto de vista fisiopatológico celular. De ninguna manera debe asumirse que la evolución de los mecanismos de terminación acaba con el peligro distorsionante de los radicales libres, sino todo lo contrario. Efectivamente, en la reacción (d) aparecen enlaces neoformados con diversas biomoléculas que pueden resultar altamente destructivos para aquellos sistemas biológicos en los que éstos se establezcan de forma sistemática, permanentemente y definitiva.

Como consecuencia de la peroxidación lipídica, se produce una alteración en la conductibilidad, fluidez, permeabilidad y transporte de las membranas. Si consideramos la localización crítica de los ácidos grasos poliinsaturados como componentes principales y mayoritarios de las membranas celulares, pueden ser alteraciones muy importantes. Efectivamente, una de las primeras consecuencias es la destrucción de la membrana. Los fosfolípidos, en los que al menos una de sus moléculas esterificadas es un ácido graso poliinsaturado,

constituyen los elementos moleculares básicos de las membranas celulares, al mismo tiempo que representan objetivos potenciales y especialmente selectivos para el ataque de las especies oxigénicas. El grado de lesión de la membrana celular puede ser escaso y no llegar a suponer importantes cambios en la composición de sus componentes lipídicos. Sin embargo, esto puede ser suficiente como para potenciar la susceptibilidad de la membrana a posteriores daños oxidativos (Gutteridge et al., 1985).

4.2.- DAÑO A PROTEÍNAS.

También las proteínas y los aminoácidos se ven atacados por los radicales libres. Este ataque causa cambios en la función celular, la fragmentación química y un aumento en la susceptibilidad al ataque proteolítico. Un ejemplo, lo constituye la oxidación reversible de los grupos -SH, que está íntimamente ligada al estrés oxidativo en muchos aspectos. Existen otros tipos de oxidaciones de grupos reaccionantes de tipo reversible; por ejemplo la oxidación de metionina a metionina sulfóxido y su reducción enzimática de nuevo a metionina. Sin embargo, la oxidación irreversible por daño de algunos grupos aminoacídicos, también es posible y encontramos un ejemplo en la ruptura del anillo imidazólico de histidina o del triptófano.

La posibilidad de que una proteína sea atacada por un radical libre o una especie oxigénica depende de su composición en aminoácidos y de la accesibilidad de la especie oxidante a los aminoácidos. Determinados aminoácidos son altamente reactivos con los radicales libres, como la

INTRODUCCIÓN

metionina y la cisteína, ambas presentes en algunas enzimas (lisozima, pepsina, etc.), lo que está asociado con la pérdida de actividad biológica de estas enzimas (Buxton et al., 1988). Un ejemplo lo constituye la α -1-antitripsina: la oxidación de la metionina produce un efecto inhibitorio de su actividad sobre la elastasa, que por otra parte ha sido relacionada con el desarrollo del enfisema pulmonar. También se ha estudiado el mecanismo de inactivación de la α -1-antitripsina por el humo del tabaco, otro de los factores generadores de radicales libres (Pryor, 1976).

Uno de los primeros trabajos que destacó el efecto y la importancia biológica de la oxidación de las proteínas fue el de los radicales generados por radiolisis en el enzima lisozima. Se encontró que el radical tiocianato y el radical hidroxilo inactivaban a la enzima y que los residuos de triptófano eran esenciales para la actividad biológica. Este ejemplo constituyó una de las primeras evidencias de la conexión entre la oxidación de aminoácidos para desnaturalizar la proteína y pérdida de su funcionalidad.

También la prolina es otro de los aminoácidos diana del estrés oxidativo, especialmente como mecanismo de ruptura de enlaces peptídicos. Una de las proteínas susceptibles de este tipo de destrucción es la molécula de colágeno.

Además de la oxidación de aminoácidos, el estrés oxidativo de las proteínas también está íntimamente relacionado con la óxido-reducción reversible de los grupos tiol; así, la alteración del estatus tiol/disulfuro se ha visto que tenía consecuencias biológicas como son los cambios de la constante y velocidad

INTRODUCCIÓN

máximas de diversas enzimas. Gran parte de las funciones del glutatión se deben a su grupo tiol o -SH suministrado por el residuo de cisteína; no cabe duda de que los efectos y funciones de la cisteína difieren mucho en función de su estado en forma libre o formando parte del glutatión, así, mientras el glutatión se presenta en muchas funciones como agente reductor antioxidante, la cisteína y sus derivados pueden inducir el estrés oxidativo en el organismo. Se ha sugerido que estas diferencias estriban, principalmente en las condiciones y propiedades de autooxidación de ambos compuestos (Sáez et al., 1987; Sáez et al., 2001; Nauser et al., 2005).

Un ejemplo de la importancia de la oxidación de proteínas lo representan las LDL o lipoproteínas de baja densidad dónde histidinas y lisinas son modificadas por oxidación, lo que causa una alteración en el reconocimiento del receptor. (Griffiths et al., 2002).

Entre las proteínas existe una gran diferencia en la susceptibilidad frente al daño oxidativo. Por ejemplo, en una minuciosa comparación se demostró que la albúmina bovina (BSA) se oxidaba dos veces más rápido que la glutamina sintasa, y que proteínas intactas son menos sensibles a la oxidación que proteínas parcialmente desnaturalizadas (Beckman et al., 1998).

La oxidación proteica causa un aumento de la degradación proteolítica, incrementando la actividad de atrapadores de EROs. Además los procesos de oxidación proteica introducen frecuentemente nuevos grupos funcionales como grupos hidroxilos y grupos carbonilos, que contribuyen a alterar la movilidad y

la función proteica. Una mejora en la caracterización de los efectos ha permitido identificar varios procesos secundarios que incluyen la fragmentación, el entrecruzamiento y el desdoblamiento, que puede acelerar o impedir la proteólisis mediada por proteosomas de acuerdo con la gravedad del daño oxidativo (Griffiths et al., 2002).

4.3.- DAÑO AL ADN.

El ataque de radicales libres sobre el ADN genera un índice de lesiones, que incluye la rotura de cadenas y la modificación de bases, produciendo mutagénesis y carcinogénesis (Griffith et al., 1988). Las alteraciones oxidativas interrumpen la transcripción y replicación, aumentando el número de mutaciones. El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) ataca al ADN lo que conlleva un gran número de cambios en bases púricas y pirimidínicas. Algunas de estas bases modificadas se consideran lesivas en potencia para la integridad del genoma (Floyd, 1990; Dizdaroglu, 1991).

La lesión del ADN se acompaña de la activación de la poli (ADP-ribosa) sintetasa, encargada de la polimerización de residuos de ADP-ribosa a partir de NAD^+ (Figura 10). Estos efectos están relacionados con la caída de nucleótidos adenínicos y el aumento del Ca^{2+} intracelular (Sies, 1986; Starke, et al., 1986; Halliwell et al., 1988).

Junto a la activación de la poli(ADP)-ribosa sintetasa se produce un aumento en la demanda de NADPH^+ , debido a la oxidación del glutati6n reducido (GSH)

INTRODUCCIÓN

utilizado como cofactor en la metabolización del H_2O_2 catalizada por la GPx. La disminución de las concentraciones intracelulares de NAD(H), NADP(H), GSH y ATP conllevan la inhabilidad de la célula para mantener niveles bajos de calcio, que a su vez induce la liberación citosólica de metales pesados, contribuyendo así a la propagación de especies reactivas y destrucción celular (Halliwell, 1988). Las bases oxidadas y las rupturas de cadena pueden ser reparadas enzimáticamente. El daño oxidativo del ADN es, de hecho, un mecanismo más en la alteración de esta molécula genética (Figura 8).

En la actualidad, son muchas las bases modificadas que se pueden detectar mediante técnicas de HPLC con detección electroquímica (Demple y Harrison, 1994). Se han detectado actualmente más de 20 modificaciones en las bases. Siendo la 8-oxo-2'-deoxyguanosina (8-oxo-dGuo) una de las lesiones más graves. La presencia de residuos de 8-oxo-dGuo en el ADN puede llevar a transversión (sustitución) GC por TA, a no ser que sea reparada previamente a la replicación. Además, hay indicios que indican una correlación entre esta base modificada y la carcinogénesis "in vivo" (Floyd et al., 1986; Cheng et al., 1992; Feig et al., 1994; Kamiya y Kasai, 1995; de la Asunción, 2004; Mizutani et al., 2005; Servais, 2005).

Para que un radical hidroxilo medie este proceso, se producen dos pasos: primero, la adición del radical hidroxilo al C-8 de la guanina, y en un segundo paso, la subsecuente pérdida del átomo de hidrógeno (o un electrón más un protón) del intermediario para formar 8-oxo-dGuo. La 8-oxo-dGuo una vez formada, permanece en el ADN durante algún tiempo (Fiotakis et al., 2005).

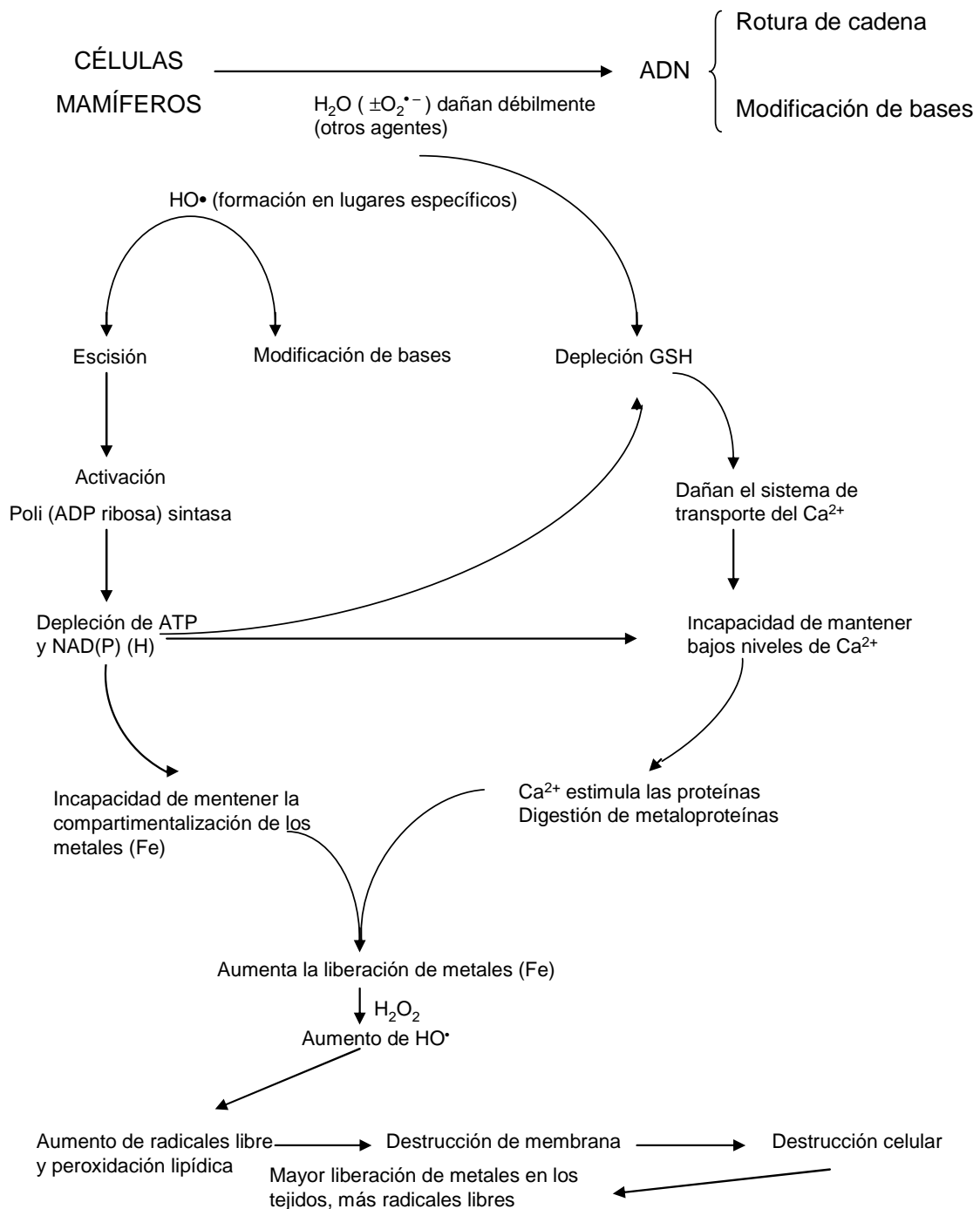


Figura 8.- Daño oxidativo al ADN y mecanismos de destrucción celular.

Hay estudios que demuestran que las bases modificadas pueden ser liberadas por vías reparadoras, mediante la escisión de bases y la escisión de

INTRODUCCIÓN

nucleótidos. Algunas de las enzimas descritas incluyen la endonucleasa E. Coli que libera 8-hidroxiguanina de ADN de doble cadena y otras como 5-(hidroximetil) uracil glicosilasa en células de mamífero, 5-(hidroximetil) citosina glicosilasa, timina glicol glicosilasa y redoxiendonucleasa (Chung et al., 1991; Tchou et al., 1991; Yamamoto et al., 2004; Salmon et al., 2004).

Pero se ha demostrado que hay además de ésta, más bases modificadas, como la 2-Hidroxiadenina (2-OH-Ade) que puede inducir también a transversiones A a C, A a T y A a G. La 2-Hidroxi-deoxiadenosina-trifosfato (2-OH-dATP) que es un substrato de la ADN polimerasa y puede ser incorrectamente incorporada por esta enzima. La 8-hidroxi-adenina (8-oxo-Ade) también puede ser erróneamente codificada e inducir a mutaciones en células de mamíferos (Kamiya y Kasai, 1995; Kasai et al., 1998).

La 5-Hidroxicitosina (5-Oh-Cyt) que se muestra como una potente lesión premutagénica llevando a una transición (purina o pirimidina sustituida por otra base diferente) de GC a AT y una transversión de GC a CG. Esta base modificada es uno de los productos más mutagénicos derivados del daño al ADN (Feig et al., 1994).

Existen más bases modificadas, como la 4,6-diamino-5-formanido-pirimidina (FapyAde), 5,6-dihidroxiuracilo (5,6-diOH-Ura) y la 5-hidroxi-5-metilhidantoina (5-OH-5-MeHyd), pero sus consecuencias biológicas todavía no han sido investigadas, aunque es concebible que sus lesiones sean también premutagénicas (Betteridge, 2000; Griffiths et al., 2002).

INTRODUCCIÓN

La razón por la que la presencia de estas bases modificadas en el ADN causa mutaciones, es debido a las perturbaciones inducidas en la estructura macromolecular. Roberts en 1991, sugiere un mecanismo que explique como tiene lugar dicha óxido-reducción, basándose en estudios con cristalografía y resultados bioquímicos. El Cu(II) acepta un electrón de un radical superóxido para producir oxígeno molecular y Cu(I), y cede un electrón a un segundo radical superóxido para producir, peróxido de hidrogeno.

Esto se produce de manera que un átomo de oxígeno del superóxido se une a la carga positiva del Cu(II), mientras que el otro átomo de oxígeno forma un puente de hidrógeno con la carga positiva de un nitrógeno de la arginina. La unión del radical superóxido reduce el Cu(II) a Cu(I) produciéndose a su vez la rotura del puente entre la His y el ión Cu, liberándose oxígeno. La His sale fuera del plano de los dos metales adquiriendo una geometría tetraédrica alrededor del Zn(II) protonándolo. Una vez el Zn(II) ha relajado su geometría, el hidrógeno de la His está en posición perfecta para cederlo al segundo anión superóxido.

La unión del segundo radical superóxido directamente al Cu(I) se produce de forma que un átomo de oxígeno del radical superóxido va a formar un pequeño puente con el átomo de hidrógeno de la His, mientras que el segundo átomo de oxígeno del superóxido se dispone para formar un puente de hidrógeno con la arginina cargada positivamente, como en el primer paso de la catálisis. La proximidad del átomo radical superóxido a la histidina implica la transferencia del protón a éste. La transferencia de estos protones tendrá lugar

INTRODUCCIÓN

con la oxidación espontánea de Cu y el restablecimiento del puente entre la His y el Cu, produciendo como resultado la formación de peróxido de hidrógeno.

Este mecanismo sugiere un papel catalítico para el Zn. Así, en el primer paso de la reacción de dismutación, la relajación de las distorsiones del ligando estabiliza el estado de transición. En el segundo paso de la reacción, el papel del Zn es asegurar la protonación de la His y la posición correcta del protón para formar el puente de hidrógeno y la subsecuente transferencia de la entrada del segundo radical superóxido, completando el ciclo catalítico.

Podemos decir que un exceso de estrés oxidativo podría llevar a un daño en el ADN y puede afectar a largas ramas de la cadena. Ames et al., en 1993 estimaron que el número de oxidaciones por célula y por día está sobre 100.000 en rata y sobre 10.000 en humanos. Los enzimas reparadores de ADN (endonucleasas y glicosilasas) eliminan una gran mayoría de estas lesiones eficientemente, pero no todas, lo cual implica que se acumulan con la edad. Según los mismos autores en ratas adultas de dos años, estiman que hay unos dos millones de lesiones por célula en el ADN que es dos veces más que en ratas jóvenes.

El ADN mitocondrial de hígado de rata tiene 10 veces más daño oxidativo que el ADN nuclear del mismo tejido. Este aumento puede ser debido a la escasez de enzimas reparadores del ADNmt, a la escasez de histonas que lo protegen y a la proximidad del ADNmt a la generación de oxidantes durante la fosforilación oxidativa. A pesar de que la célula se defiende a sí misma y

consigue presumiblemente eliminar mitocondrias dañadas que provocan un aumento de EROs, las lesiones del ADNmt se acumulan con la edad en una tasa más elevada que el ADN nuclear, así que los autores anteriores creen que el daño oxidativo al ADN podría informar sobre las mutaciones que el ADNmt acumula con la edad (Ames et al., 1993, Halliwell, 1994).

4.4.- DAÑO AL COLESTEROL.

Algunos radicales libres y especies oxigénicas pueden interactuar rápidamente y modificar también pequeñas biomoléculas libres como el colesterol.

La oxidación del colesterol es de particular interés biológico, puesto que se producen hidroperóxidos de colesterol y una familia de oxisteroles oxidados sobre el anillo β del esteroide, y derivados del colesterol oxidado que están implicados en la aterosclerosis y en la enfermedad cardiovascular. Existen en la actualidad muchas evidencias que indican que en el proceso de iniciación de la aterosclerosis están implicados los radicales libres, la peroxidación lipídica y la modificación oxidativa de la LDL (Spiteller et al., 2003; Zmijewski et al., 2005). La LDL oxidada es captada con mayor facilidad por macrófagos, lo que produce la formación de células espumosas e inducen la proliferación de células musculares lisas (Stoker et al., 2004). Ha sido también postulado, que la presencia de oxisteroles en la sangre puede ser el resultado de un eficaz mecanismo antioxidante *"in vivo"*. Dicho sistema se basa en la posible interacción a nivel de la sangre y diversos tejidos de diferentes elementos

oxidantes con colesterol, y derivados oxidados del mismo serían excretados vía biliar-fecal.

5.- ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA DE DEFENSA

A bajas concentraciones los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células. Sin embargo, un exceso de los mismos puede acumularse hasta niveles tóxicos dando como resultado que se produzcan diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser origen del daño celular. Frente a la acción tóxica de los radicales libres los organismos han desarrollado numerosos mecanismos de defensa antioxidantes que permiten su eliminación o la transformación en moléculas estables (Davies, 1995).

Según H. Sies (Sies, 1985) los sistemas biológicos están en un estado de equilibrio aproximado entre fuerzas prooxidantes y su capacidad antioxidante. El desequilibrio a favor de la acción prooxidante es lo que se conoce como estrés oxidativo. De hecho, el daño oxidativo solamente se produce cuando los mecanismos oxidantes superan la capacidad de los sistemas de defensa. Por lo tanto, la supervivencia de las células aeróbicas precisa de mecanismos que contrarresten los efectos negativos de los radicales libres.

INTRODUCCIÓN

Según Halliwell y Gutteridge, antioxidante es cualquier sustancia que en presencia o a bajas concentraciones, en relación con el sustrato oxidable, retrasa considerablemente o inhibe la oxidación de dicho sustrato. Un buen antioxidante se caracteriza por su alta efectividad, su variabilidad operativa y versatilidad para poder combinarse con una importante variedad de especies oxigenas reactivas.

Entre los sistemas antioxidantes cabe destacar:

1. A nivel fisiológico: El sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles tisulares de O_2 , siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas.
2. A nivel bioquímico: La defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como sistemas reparadores de moléculas.

5.1.- SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE.

El principal sistema de defensa contra los radicales libres lo constituyen proteínas antioxidantes enzimáticas que incluyen la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutathion peroxidasa (GPx), (Betteridge 2000; Fang et al., 2002). La eficacia de esta tríada enzimática reside en una triple acción defensiva al disminuir la producción de estas especies oxigénicas e impedir la interacción de estas entre sí, para dar lugar a especies más estables de menor reactividad y evitar la peroxidación de las macromoléculas.

Hay otros enzimas importantes que también participan en el sistema de defensa, incluidos en las reacciones de la regeneración del Glutacion (GSH), como la GSH reductasa, o la NADPH-quinona oxidoreductasa (DT diaforasa).

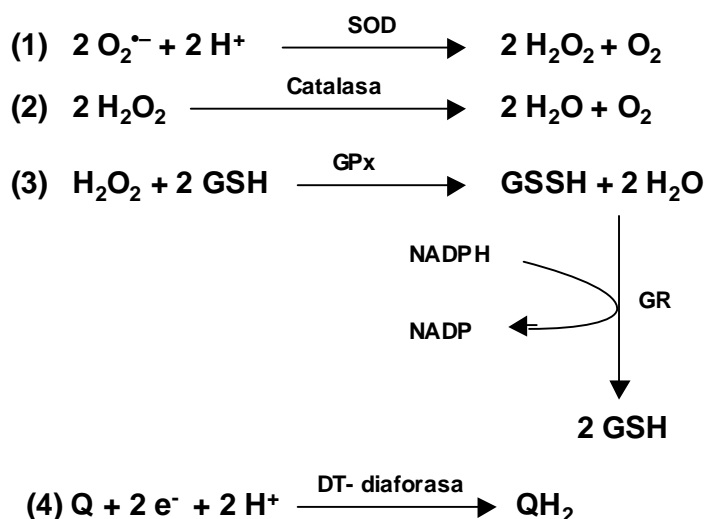


Figura 9.- Esquema de la generación de EROs y defensa antioxidante.

5.1.1.- Superóxido dismutasa o (SOD). (EC.1.15.1.).

La Superoxido dismutasa (SOD) cataliza la reacción de dismutación del ión superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual puede ser reducido, de nuevo, por la catalasa o por la glutacion peroxidasa (Figura 10).



Figura 10.- Reacción de la SOD con el radical superóxido.

Otra función de la superóxido dismutasa es proteger a las desidratasas (ácido dihidróxido desidratasa, aconitasa, 6-fosfogluconato desidratasa y

INTRODUCCIÓN

fumarasa) contra la inactivación por el radical libre superóxido. Se han identificado cuatro clases de SOD que contienen: cobre, zinc, hierro, manganeso o níquel, como cofactores. En humanos hay tres formas de SOD: Cu/Zn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial, y SOD extracelular (EC-SOD). Sus genes derivan de dos genes ancestrales. Un gen proporcionó un aumento en el contenido de cobre y zinc al enzima. Otro gen proporcionó un aumento en el contenido de manganeso o hierro. Podemos encontrar indicios de estos genes en organismos muy primitivos con un elevado grado de homología alrededor de sus centros activos, lo que indica que estos genes se desarrollaron fácilmente en formas de vida, lo que explica como sobrevivieron en presencia de oxígeno (McCord, 2000). La SOD cataliza la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ por sucesivas oxidaciones y reducciones del ión metálico de transición en su sitio activo con un mecanismo tipo ping-pong con alto índice de reacción (Benov y Fridovich, 1998; Hsieh et al., 1998; Majima et al., 1998; Matés et al., 1999).

Existe una cuarta enzima Ni-SOD que ha sido purificada de la fracción citosólica de la micobacteria *Streptomyces sp.* y *Streptomyces coelicolor*. Está compuesta por cuatro subunidades idénticas. Su composición en aminoácidos es diferente de las tres SOD anteriores

5.1.2.- Catalasa (EC 1.11.1.6).

La catalasa actúa de forma similar a la SOD (McCord, 2000). Reacciona a cualquier concentración con H_2O_2 para formar oxígeno molecular y con

INTRODUCCIÓN

donadores de hidrógeno (metanol, etanol, ácido fórmico o fenol...) con actividad peroxidasa y protege a las células del peróxido de hidrógeno interno. (Figura 11).

La catalasa es una enzima tetramérica con cuatro subunidades idénticas de 60 KD que contienen un grupo de ferriprotoporfirina por subunidad, estando su masa molecular sobre los 240 KD. Es una de las enzimas más eficientes que se conocen. Tal es su eficiencia que puede ser saturada por H_2O_2 a cualquier concentración (Lleídas et al., 1998; Matés et al., 1999). Está localizada en los peroxisomas y es abundante en células de mamíferos. Destruye el H_2O_2 generado por oxidasas localizadas dentro de estos orgánulos (Halliwell, 1996).

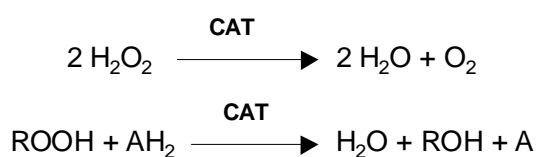


Figura 11.- Reacción de la catalasa con el peróxido de hidrógeno.

Aunque la catalasa no es esencial bajo condiciones normales, para algunos tipos de células, juega un papel importante en la adquisición y la tolerancia al estrés oxidativo y la respuesta celular (Matés et al., 1999). El aumento de la sensibilidad de las células enriquecidas con catalasa a la adriamicina, la bleomicina y el paraquat se atribuye a la capacidad de la catalasa para prevenir el consumo inducible por drogas del O_2 de esta manera antes de la captura del H_2O_2 , este puede escapar de la célula y convertirse en O_2 . (Matés et al., 1999).

5.1.3.- Glutation peroxidasa o (GPx). (EC 1.11.1.9).

El enzima glutacion peroxidasa (GPx) es probablemente el mayor eliminador de H_2O_2 en células de mamíferos. En organismos superiores, la glutacion peroxidasa aparece en gran parte para suplantar la necesidad de la catalasa. Contiene centros activos de selenio, implicados, no sólo en la eliminación del H_2O_2 , sino también en el metabolismo de peróxidos lipídicos ($ROOH$ y H_2O_2). Esta enzima utiliza como cosustrato al GSH, para catalizar la reducción de peróxidos lipídicos, que a su vez actúa como antioxidante no enzimático. (Figura 12) (Chance et al., 1979; Ursini et al., 1987; Halliwell, 1996; McCord, 2000;).

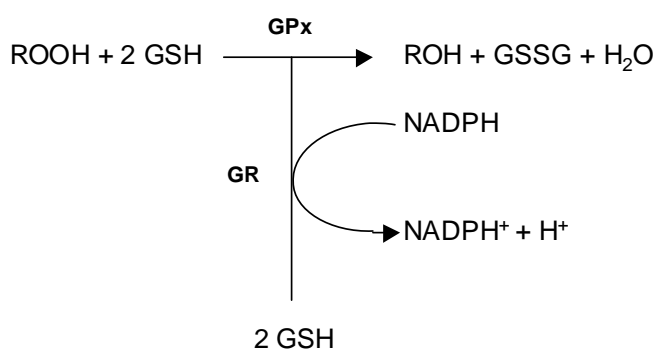


Figura. 12.- Reducción del $ROOH$ por la GPx.

Se han encontrado al menos 5 isoenzimas de la GPx en mamíferos. Sus niveles de expresión varían dependiendo del tipo de tejido. La glutacion peroxidasa citosólica y mitocondrial reduce peróxidos lipídicos y H_2O_2 a expensas del glutati6n ($cGPX$ o $GPX1$). La glutacion fosfolípido hidroperoxidasa ($GPX4$ o $PHGPX$), al igual que la anterior se encuentra en la mayoría de tejidos. Se localiza tanto en el citosol como en la membrana, y puede reducir

INTRODUCCIÓN

directamente a hidroperóxidos lipídicos, ácidos grasos e hidroperóxidos de colesterol que se producen en la peroxidación de membranas y lipoproteínas oxidadas (Imai et al., 1998). Se expresa mayormente en células del epitelio renal. La GPX2 citosólica y la GPX3 extracelular se detectan poco en la mayoría de los tejidos excepto en el tracto gastrointestinal y el riñón. Hay que añadir otra isoenzima, la GPX5, que se expresa específicamente en ratón (Yan et al., 1997, Ding et al., 1998).

Se ha considerado y se considera que la GPX en células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, es el principal enzima antioxidante para detoxificar el H_2O_2 , ya que la catalasa tiene menor afinidad por el H_2O_2 que la GPX. También se sabe que células con disminución de GPX son más sensibles a la toxicidad del paraquat y la adriamicina (Taylor et al., 1993). El mantenimiento de la defensa contra las oxidaciones mediadas por el peroxinitrito es también una función de la GPX y de otras selenoproteínas que contienen selenocisteína o selenometioninas. (Sies et al., 1997; Matés et al., 1999). Este enzima puede reducir peróxidos lipídicos, así como el peróxido de hidrógeno. Es un enzima muy importante para el mantenimiento de la estructura y función de las membranas biológicas (McCord, 2000).

5.2.- DEFENSA NO ENZIMÁTICA O “SCAVENGERS” DE RADICALES LIBRES.

En el sistema antioxidante de defensa no debemos olvidar a las moléculas antioxidantes hidrofílicas o lipofílicas. Como el beta-caroteno, la ferritina, la

ceruloplasmina, el selenio, el manganeso, la ubiquinona, el zinc, el ácido úrico. De entre las moléculas hidrofílicas cabe destacar la vitamina C, la vitamina E, el GSH, los flavonoides y las melanoidinas, entre otras.

5.2.1.-. Glutation reducido (GSH).

El Glutation (γ -Glu-CysH-Gly) es el mayor componente antioxidante intracelular, es un tripeptido compuesto de cisteína, ácido glutámico y glicina. Su distribución es universal al estar presente tanto en plantas como en animales y juega un papel importante en la protección celular contra los efectos tóxicos de los radicales libres. Está presente en las células, principalmente en su forma reducida, y gran parte de sus funciones se deben a la presencia del grupo tiólico reducido que le confiere la cisteína.

En la defensa celular contra los radicales libres tiene un papel importante como antioxidante al ser capaz de interaccionar y estabilizar radicales hidroxilo, superóxido, y peróxidos, además de participar en la reducción de otros antioxidantes tales como el α -tocoferol y donar hidrógenos para reparar el ADN dañado. Por otro lado puede actuar como cosustrato de enzimas antioxidantes como la glutation peroxidasa, como hemos mencionado anteriormente.

INTRODUCCIÓN

Del GSH cabe destacar las siguientes características:

- 1.- El GSH es un antioxidante exógeno y endógeno. El GSH de la dieta puede ser absorbido en el intestino delgado y puede ser sintetizado de nuevo.
- 2.- Aunque el radical glutatión formado por la oxidación del GSH es un radical prooxidante, este puede reaccionar con otro radical GSH (GS·) y dar como resultado GS-SG que es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH.
- 3.- El GSH puede reaccionar con componentes electrofílicos de xenobióticos en la reacción catalizada por glutatión-S-transferasa.
- 4.- El GSH puede conjugarse con NO, que como consecuencia produce la formación del GSH nitrosilado, que a través de un sistema de tiol proteínas liberará GSH y NO.
- 5.- El GSH interacciona con proteínas tiólicas (glutaredoxina y tioredoxina) que pueden jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis del sistema de reducción-oxidación de la célula.

La síntesis del GSH está regulada a partir de glutamato, cisteína y glicina en dos etapas. En la primera etapa se une ácido glutámico y cisteína, para formar γ -glutamilcisteína. Esta reacción está catalizada por la γ -glutamil cisteína sintetasa. Dicho paso está limitado a la disponibilidad de la cisteína. En la

segunda etapa el γ -glutamilcisteína reacciona con la glicina para formar el tripeptido, reacción catalizada por la glutatión sintetasa. (Figura 13).

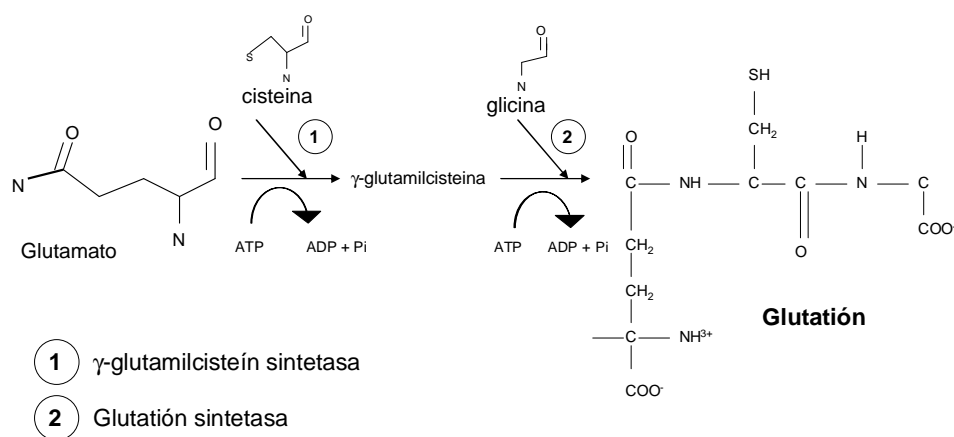


Figura 13.- Síntesis de GSH.

El GSH total es regulado por una reacción de retroalimentación por la γ -glutamil cisteína sintetasa. La disponibilidad dietética de los aminoácidos de azufre puede tener influencia en las concentraciones del GSH celular.

5.2.2.- Vitamina E.

El término vitamina E es la descripción genérica para todos los tocoferoles y tocotrienoles que exhiben actividad biológica de alfa-tocoferol, siendo éste el antioxidante natural más efectivo en fase lipídica y en la parte externa de las lipoproteínas.

La vitamina E se compone mayoritariamente de α - γ -tocoferol, estando las formas ingeridas en estado libre o formando ésteres. La absorción de la

INTRODUCCIÓN

vitamina E está ligada a la simultánea digestión y absorción de la grasa alimentaria. Una vez en el enterocito, la vitamina se incorpora a los quilomicrones, los cuales vía linfática pasan a la sangre y finalmente al hígado. Los QM pueden ceder la vitamina a los tejidos y células sanguíneas incorporándose a las membranas junto con el colesterol y los fosfolípidos.

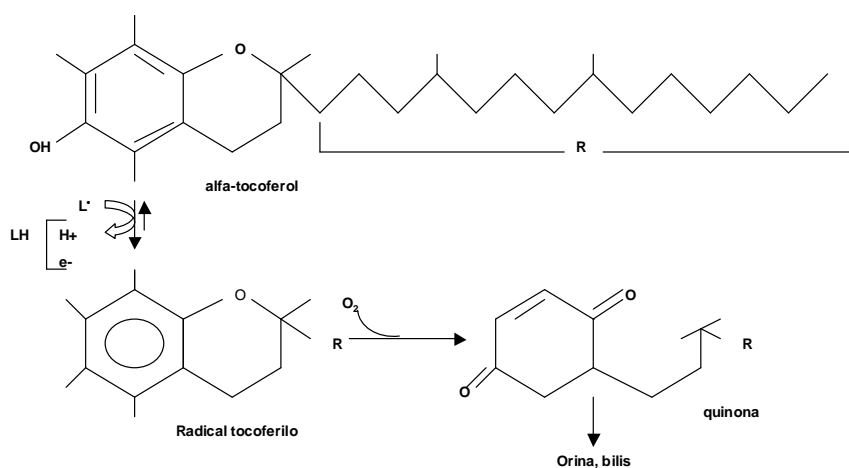


Figura 14.- Reacción del α -tocoferol con los peróxidos.

La vitamina E puede reaccionar con $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^\cdot , y ROO^\cdot . Una de sus funciones más importantes es la inhibición de la peroxidación lipídica, actuando de scavenger del radical peróxido y dando como producto hidroperóxidos y radical tocoferoxilo, el cual puede transformarse en quinona en presencia de O_2 y ser eliminado por orina o bilis (Figura 14), pero la cantidad de quinona que se forma es mínima. Lo que suele ocurrir es que la forma oxidada se reduce nuevamente en presencia de ácido ascórbico, QH_2 o de GSH, pudiendo actuar nuevamente de antioxidante (Figura 15) (Brigelius-Flohé y Traber, 1999; Abudu et al., 2004).

INTRODUCCIÓN

Por tanto, la generación de la vitamina E va a depender de las condiciones existentes, se consume en primer lugar el ácido ascórbico cuando los radicales se forman en fase acuosa, mientras que se consume primero la CoQ cuando los radicales se forman en la membrana.

La vitamina E también puede actuar de prooxidante, produce una peroxidación en las LDL, facilitando la transferencia de la reacción de los radicales de la fase acuosa al interior del ambiente lipídico. Para inactivar esa peroxidación mediada por el tocoferol, son necesarios los adecuados agentes reductores, llamados coantioxidantes, siendo los más eficaces el ácido ascórbico, en ambientes hidrofílicos y la CoQ en el hidrofóbico (Figura 15).

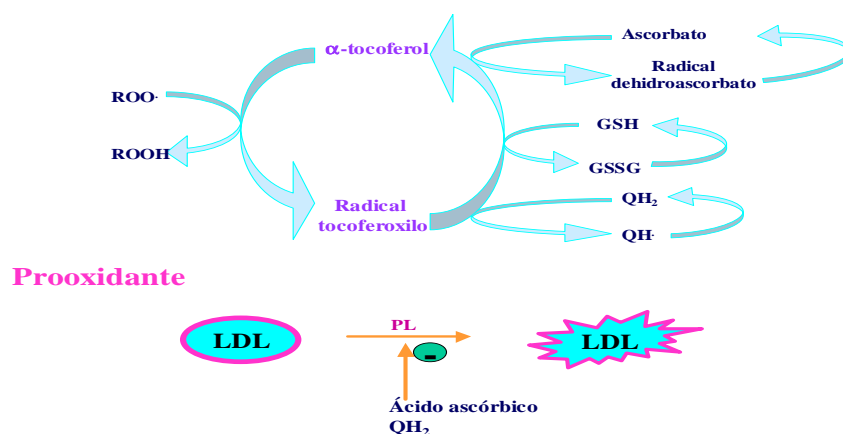


Figura 15.- Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina E.

La mayor fuente de vitamina E son los aceites vegetales y sus derivados (margarinas, mayonesas, repostería). Los alimentos de origen animal contienen principalmente α -tocoferol. Los alimentos derivados de plantas como aceites

vegetales, frutos secos y cereales contienen tocoferoles y tocotrienoles. Los tocoferoles más comunes en la dieta son α y γ -tocoferoles. Otros alimentos como legumbres, lácteos y cereales pueden contribuir significativamente a la ingesta total de la vitamina E dependiendo de la dieta. Consecuentemente, una dieta deficiente en vitamina E reduce la actividad de enzimas, induce peroxidación lipídica y causa enfermedades neurológicas y cardiovasculares, pudiendo ser todo revertido por la suplementación de vitamina E en la dieta (Muller, 1990; Halliwell, 1996; Betteridge, 2000; Carr et al., 2000; Fang et al., 2002).

5.2.3.- Vitamina C.

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en una concentración muy elevada en numerosos tejidos y plasma. La vitamina C muestra una amplia distribución en los tejidos, siendo máxima su concentración en aquellos con un intenso metabolismo como son glándulas suprarrenales, hipófisis, hígado, páncreas, encéfalo y ojos. Es uno de los antioxidantes más potentes en fase acuosa, que actúa a nivel extracelular y citosólico. La vitamina C reacciona con el O_2^- , H_2O_2 , ROO^\bullet , $^\bullet OH$ y 1O_2 oxidándose a dehidroascorbato y siendo nuevamente reducido a ácido ascórbico por acción de la dehidroascorbato reductasa (Auroma, 1998; Dhremer et al., 2001) (Figura 16). Esta reducción puede ocurrir vía no enzimática por la glutatión o vía enzimática por la actuación de proteínas que muestran actividad DHA reductasa incluyendo la tioltransferasa. El glutatión es necesario para la reducción del DHA, y se obtiene probablemente de la

INTRODUCCIÓN

reacción catalizada por la glutatión reductasa requiriendo NADPH como cofactor (Figura 16). Su absorción está en función de la ingesta, a mayor ingesta menor absorción y viceversa. No se sintetiza en humanos, dependiendo por tanto del aporte dietético.

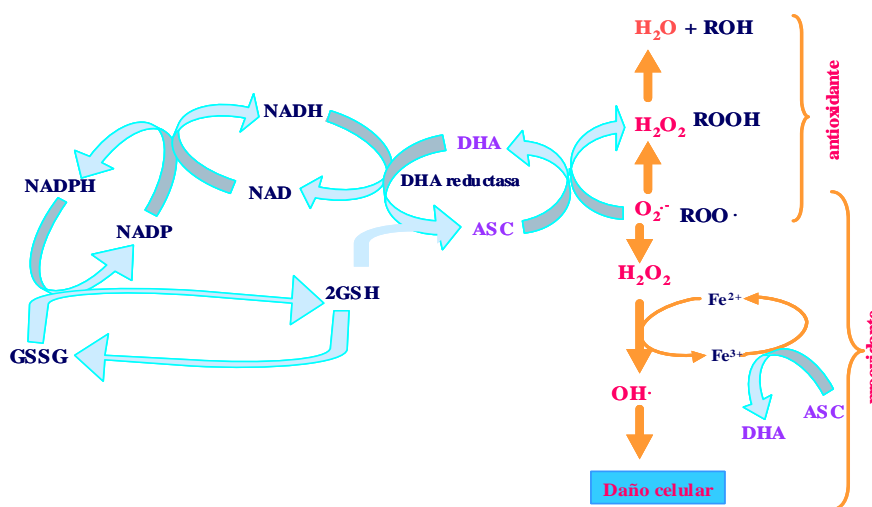


Figura 16.- Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina C.

La vitamina C se absorbe mayoritariamente en el duodeno y yeyuno proximal mediante un mecanismo de transporte activo dependiente del sodio. En cuanto al ácido dehidroascórbico, su absorción es facilitada aunque, según algunos autores, pueden existir otras vías.

Sus principales fuentes son las frutas, verduras y hortalizas (cítricos, fresas, kiwi, melón, tomate, pimiento, coles coliflor, etc.), y entre los de origen animal cabe destacar el hígado.

5.2.4.- Carotenoides.

Existen más de seiscientos carotenoides, de los cuales cerca de 50 son precursores de la vitamina A o retinol. Los carotenoides se dividen en dos grupos, los compuestos hidrocarbonados y las xantofilas. Los carotenos como el α o β -carotenos o el licopeno contienen solo átomos de carbono e hidrogeno, mientras que las xantofilas como la criptoxantina, cantaxantina y la luteína tienen al menos un átomo de oxígeno en su estructura. Debido a la presencia de múltiples enlaces conjugados, los carotenoides y en particular los 4-oxo derivados tales como astaxantina y cantaxantina actúan como captadores de radicales libres. Son eficientes antioxidantes contra el oxígeno singlete y los radicales peróxido, contribuyendo de este modo al sistema de defensa antioxidante lipofílico del organismo.

En presencia de radicales peroxilos, el β -caroteno, es un eficaz finalizador de la cadena oxidativa, siempre y cuando se mantengan las presiones parciales de O_2 bajas. Si la presión parcial no es baja prosigue el proceso oxidativo, actuando en este caso de prooxidante. Por tanto, según cuales sean las características fisiológicas actuará de antioxidante o prooxidante (Young y Lowe, 2001) (Figura.17).

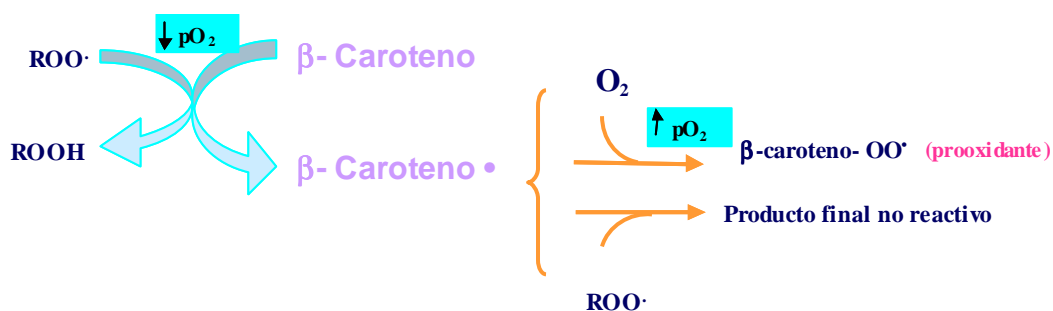


Figura 17.- Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante del β -caroteno.

La vitamina A en la dieta puede ser ingerida a través de alimentos de origen animal, mayoritariamente en forma de ésteres de retinilo o a través de alimentos de origen vegetal, en forma de carotenoides, principalmente β -caroteno. Estos carotenoides y ésteres de retinilo tienden a agruparse en el estómago en glóbulos de grasa. Los ésteres de retinilo se hidrolizan a retinol libre absorbiéndose por transporte activo o difusión facilitada. El β -caroteno es absorbido por difusión facilitada. En el enterocito gran parte del β -caroteno es transformado en retinal y posteriormente en retinol, mezclándose junto con el procedente de la dieta. Posteriormente es esterificado e incorporado a los quilomicrones, junto con una pequeña cantidad de carotenoides procedentes de la dieta. Los quilomicrones son liberados, vía linfática, al torrente sanguíneo y posteriormente al hígado donde se metabolizan. Son liposolubles, pero su molécula tiene una parte hidrofílica y otra lipofílica, lo que les permite estar situados bien en membrana celular o en la parte externa de las lipoproteínas.

La vitamina A (retinol) se encuentra mayoritariamente en la materia grasa de ciertos alimentos de origen animal como carnes, hígado, yema de huevo, leche, mantequilla, queso y nata.

Los carotenoides son colorantes del reino vegetal y animal. La mayor fuente de carotenoides son alimentos vegetales y carnes, en concreto α y β -carotenos, luteína y licopenos.

5.2.5.- Ácido lipoico.

El ácido lipoico, es considerado como un antioxidante ideal o universal, se obtiene a partir de la dieta y actúa frente a una elevada cantidad de radicales libres (hidroxilo, ácido hipocloroso, oxígeno singlete) en medios lipídicos y acuosos, además actúa como quelante de metales y actúa sinérgicamente con otros antioxidantes.

5.2.6.- Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos o polifenoles se encuentran en el reino vegetal especialmente en las frutas y verduras, así como en el té, el café, el cacao, la cerveza, el vino y los zumos, constituyentes habituales de la dieta humana. Una de las razones por las cuales han adquirido gran interés dichos compuestos en los últimos años es debida a su actividad antioxidante, que depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo la acción catalizadora de los radicales libres. Así pues,

INTRODUCCIÓN

actúan en todos aquellos procesos fisiopatológicos en los cuales están implicados los radicales libres o especies oxigenas reactivas (EROs o ROS), tales como procesos cardiovasculares, cáncer, envejecimiento, enfermedades degenerativas, procesos inflamatorios, etc.

Los polifenoles en los alimentos se clasifican según su estructura química, especialmente en función de los anillos fenólicos y los sustituyentes de dichos anillos en, ácidos clorogénicos, hidroxibenzóico (ácido gálico) e hidroxicinámico (ácido cinámico, cafeínico y felúrico), estilbenos (resveratrol), lignanos y flavonoides (Manach et al., 2004) (Figura 18).

Los ácidos fenólicos se encuentran en cantidades muy pequeñas en el reino vegetal a excepción de ciertas frutas rojas y cebollas. Así el té es una fuente importante de ácido gálico (4,5 g/Kg de té fresco); el ácido hidroxibenzoico forma parte de estructuras complejas en las frutas rojas; el ácido hidrocínámico se encuentra de forma libre en los alimentos, pero si éstos sufren procesos como: congelación, esterilización o fermentación, pasa a forma glicosilada; Los lignanos, que están formados por dos unidades de fenilpropano, se encuentran mayoritariamente en el aceite de linaza, y en menor cantidad en los cereales y las frutas; los estilbenos, se encuentran mayoritariamente en el vino, siendo uno de los más importantes el resveratrol. El vino tinto contiene 0'3 a 7 mg/L de resveratrol en forma libre y 15 mg/L en forma glicosilada (Vitrac et al., 2002).

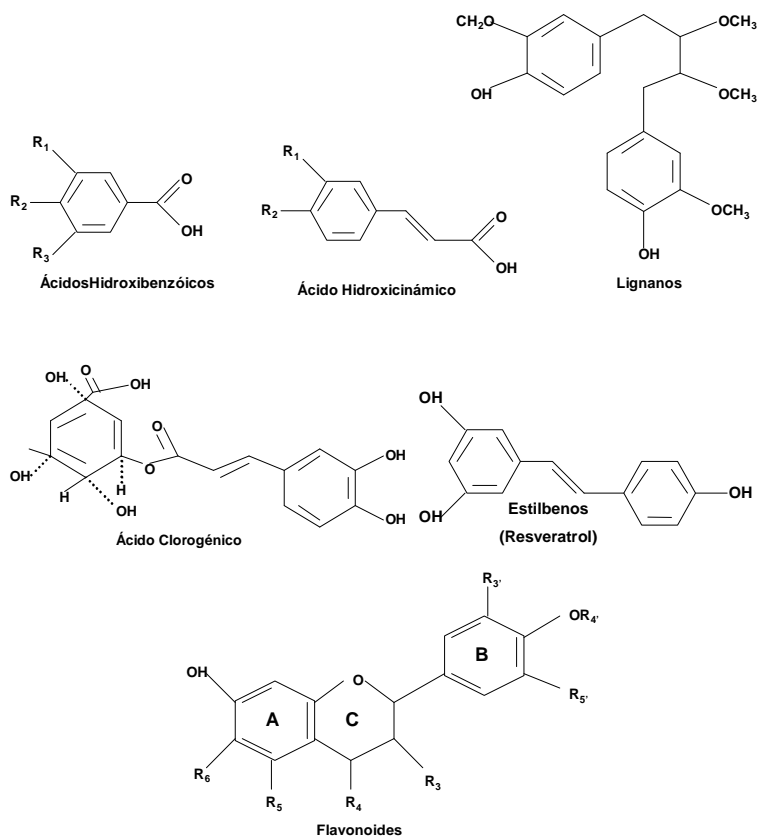


Figura 18.- Estructuras químicas de los diferentes ácidos fenólicos y flavonoides.

Dentro de los compuestos fenólicos cabe destacar los flavonoides, son un grupo de sustancias naturales que se encuentran en el reino vegetal. Se han descubierto más de 4000 especies diferentes de flavonoides, encontrándose en frutas, verduras, semillas, tallos, flores, siendo por tanto, constituyentes importantes de la dieta humana.

Estructuralmente los flavonoides son derivados benzo- γ -pirenos. Su estructura básica es: 2 anillos benzenos unidos a través de un anillo pirona o

INTRODUCCIÓN

pirano heterocíclico (Bravo, 1998) (Figura 19). La estructura química de los compuestos fenólicos, es la que les confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres (Heim et al., 2002). El tipo de compuesto, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante. Así, según Rice-Evans y colaboradores (1996) los compuestos con mayor actividad son aquellos que presentan dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B, lo que confiere una alta estabilidad al radical que se forma después de la reacción de captura del radical libre. Contienen un doble enlace 2,3 en conjugación con el 4-oxo (C=O) en el anillo C y aquellos compuestos que tienen grupos OH- en 3 y 5 y el grupo oxo (C=O) en 4 en los anillos A y C. Se combinan con azúcares para formar glicósidos, siendo ésta la forma más habitual en la que se encuentran en la naturaleza, sin embargo se ha visto que los agliconas muestran una actividad antioxidante más elevada que sus correspondientes glicósidos.

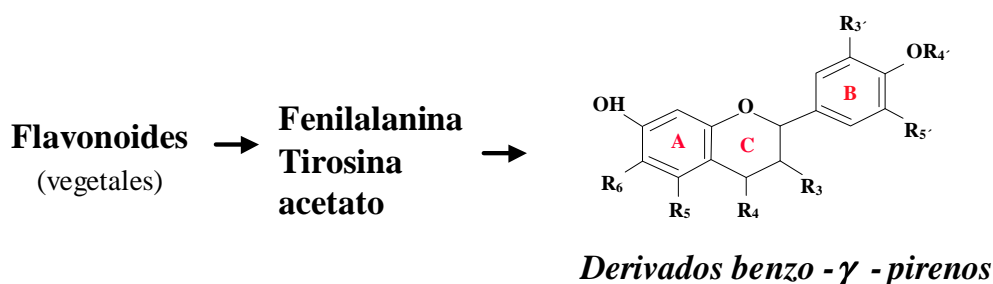


Figura 19.- Estructura química del flavonoide.

Los flavonoides se dividen en subclases según la unión del anillo B al C y de los sustituyentes (R) de sus anillos (Figura 19) y las variaciones en el número y distribución de grupos OH. Así pues se dividen en: antocianinos, flavanonas, flavonas, flavanoles (epicatequina, procinidina), flavonoles

INTRODUCCIÓN

(glucosidos de quercetina) e las isoflavonas, (genisteina y daizeina) que son conocidas por sus propiedades estrogénicas (Figura 20), (Beecher, 2003; Rice-Evans, 2003).

Los Flavonoles son los más comunes en los alimentos, como más representativos cabe destacar la quercetina y kaempferol. Las cebollas contienen aproximadamente 1200 mg/kg de flavonoles y el vino tinto y el té contienen 45 mg/L estando presentes en forma glicosilada. Las frutas contienen entre 5 y 10 flavonoles glicosilados diferentes y su concentración está en función de factores ambientales, como la luz solar (Macheix et al., 1990).

Las Flavonas se encuentran en cantidades menores que los flavonoles en las frutas y verduras, siendo las principales la luteolina y la apigenina en forma glicosilada que mayoritariamente se encuentran en el perejil. Los cítricos contienen grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas tales como: Tengeritina, nobiletina y sinensetina (la mandarina contiene hasta 6500 mg/L), siendo estas las más hidrofóbicas (Manach et al., 2004).

INTRODUCCIÓN

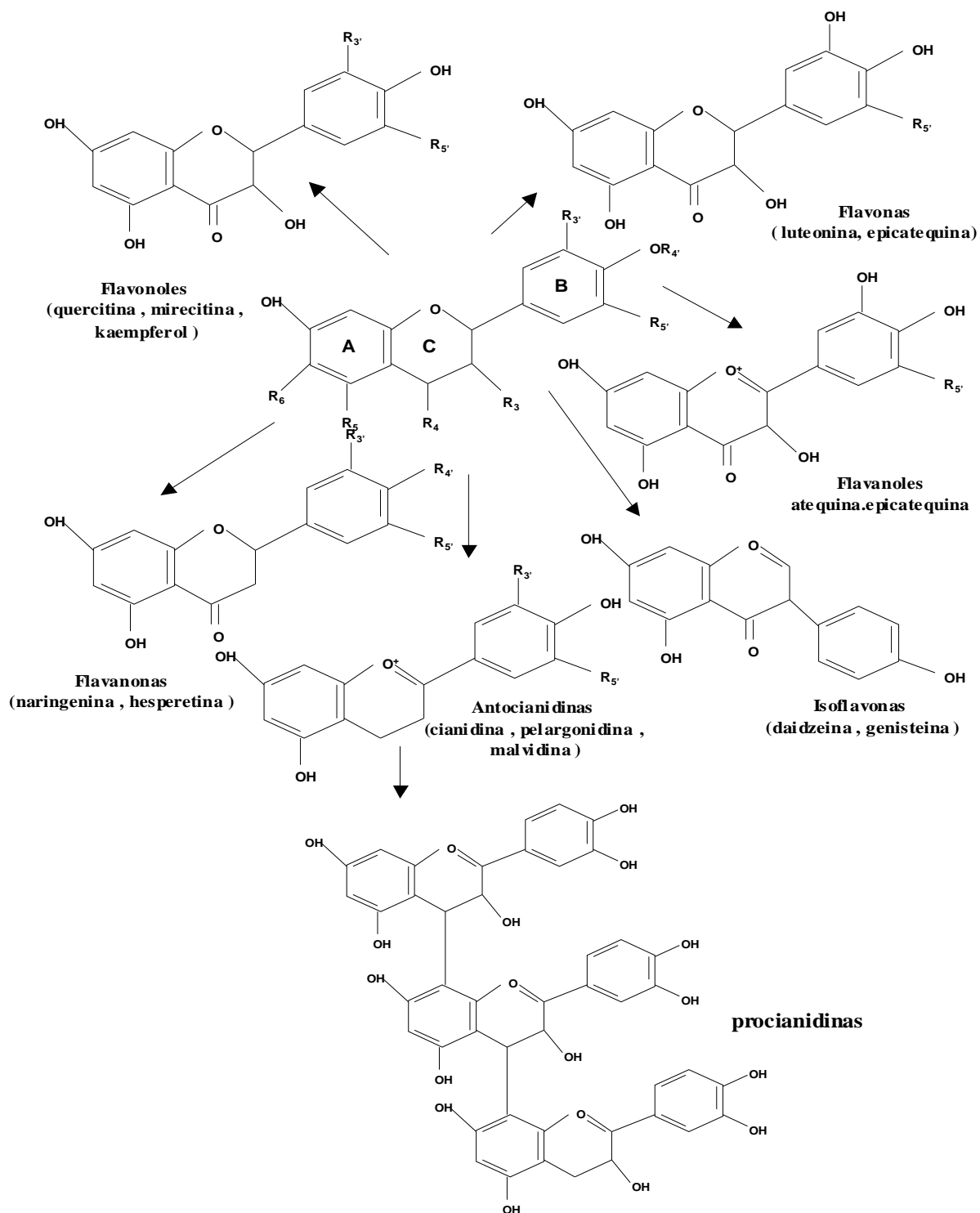


Figura 20.- Estructuras químicas de las diferentes familias de flavonoides.

INTRODUCCIÓN

Las Flavanonas se encuentran generalmente en forma glicosilada con un disacárido en posición 7. Se pueden encontrar en cantidades considerables en el tomate, en los cítricos y en ciertas plantas aromáticas, tales como la menta. El zumo de naranja contiene entre 200 y 600 mg de hesperidina/L y de 15 a 85mg de narirutina/L, (un vaso de zumo de naranja puede contener entre 40 y 140 mg de flavanonas glicosiladas). Donde mayor es el contenido de flavanonas es en la parte del albedo y las membranas internas de la naranja y mandarina (Clifford, 2000; Tomas-Barberan et al., 2000).

Los Flavanoles se encuentran en forma de monómeros (catequina y hepicatequina) y en forma de polímeros (proantocianidina). Las catequinas en forma de agliconas están mayoritariamente presentes en las frutas, en el vino tinto (hasta 300 mg/L), en el té, (un vaso de té verde contiene hasta 200 mg de catequinas (Lakenbrink et al., 2000)) y en la cerveza con / sin alcohol 401 y 343 mg/L respectivamente (Valls et al., 2006). Estos en los alimentos no se encuentran en forma glicosilada. Las proantocianidinas forman complejos con proteínas de la saliva los cuales son responsables del carácter astringente de las frutas. Es difícil su cuantificación en los alimentos ya que según el estado de maduración podemos encontrar diferentes estados de polimerización.

Las isoflavonas se encuentran fundamentalmente en las plantas leguminosas, la soja es la de mayor contenido, se encuentra genisteína, daidzeina y gliciteina en una proporción 1:1:0:2 en cuatro formas diferentes: aglicona, 7-O-glicosido, 6''-O-acetil-7-O-glicosido y 6''-O-malonil-7-O-glicosido. Son sensibles al calor y se hidrolizan a glicosidos en los procesos industriales,

INTRODUCCIÓN

como ocurre en la producción de la leche de soja. La semilla de soja contiene entre 580 y 3800 mg de isoflavonas/Kg y la leche de soja contiene de 30 a 175 mg/L (Cassidy et al., 2000).

Las Antocianidinas son pigmentos que podemos encontrar en el vino tinto, en los cereales y mayoritariamente en las frutas, especialmente en la piel de estas últimas. Además pueden existir bajo diferentes formas químicas, siendo la cianidina la más común. El contenido en los alimentos está en función de la intensidad del color. Puede llegar hasta 2000-4000 mg/Kg en la grosella y fresas, aumentando estos valores con el proceso de la maduración. El vino tinto contiene entre 200-350 mg de antocianinas/L, las cuales se transforman en complejas estructuras a medida que aumenta la edad del vino (Clifford, 2000).

La cantidad de flavonoides ingeridos por el hombre difiere bastante según la zona geográfica. Esta ingesta está en función de los componentes dietéticos, es decir, de la ingesta de frutas, verduras y sus derivados como zumos, té, vino y cerveza. Por ejemplo: en Finlandia la ingesta es de 2,6 mg/día, en Holanda es de 23 mg/día, en Japón 68 mg/día, en Dinamarca 23-46 mg/d, en Finlandia 24 mg/d, y en Estados Unidos 20-34 mg/d (Nijvedt et al., 2001, Beecher, 2003). No hay un ingesta diaria recomendada de un único componente fenólico o flavonoide, ya que esta cantidad depende del alimento vegetal consumido, por ello no es posible proporcionar valores definitivos sobre la ingesta en la población humana. Sin embargo se ha hecho un cálculo aproximado entre 150 mg y 1000 mg por día en la dieta mixta occidental (Stahl et al., 2002).

INTRODUCCIÓN

Estos compuestos poseen actividad antioxidante tanto en sistemas hidrofílicos como lipofílicos tienen capacidad para actuar de dadores de hidrógenos o quelar iones metálicos como el hierro y el cobre, impiden la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias (Hertog et al., 1997), inhibiendo la agregación plaquetaria (Hubbard et al., 2003) y protegen al ADN del daño oxidativo.

En experimentación animal se ha estudiado el efecto de la epicatequina en hepatocitos aislados de rata y se ha observado que inhiben la peroxidación lipídica y aumentan la viabilidad celular (Valls-Bellés et al., 2002; Valls-Bellés et al., 2004). Asimismo, la catequina previene de los efectos tóxicos de la adriamicina y la fracción de flavonoides de la cerveza, tanto rubia como negra, inhibe la oxidación de lípidos y proteínas al mismo tiempo que aumenta la viabilidad celular en estudios realizados en células hepáticas tras la inducción de un estrés oxidativo inducido por este antineoplásico. Así mismo, la cerveza protege al ADN contra el daño oxidativo, tanto “in vitro” como “in vivo” (Gonzalez-SanJose et al., 2001).

Por otra parte, los flavonoides presentes en la dieta pueden inducir la defensa endógena, a través de los elementos de respuesta a antioxidantes (ERA o ARE) encontrados en los promotores de algunos genes que son inducibles por el estrés oxidativo. Algunos quimiopreventivos cancerígenos se piensa que actúan, a través de los ERA o ARE al incrementar los antioxidantes y la detoxificación (Favreau y Pickett, 1991; Sen, 2000; Kim et al., 2001).

INTRODUCCIÓN

También se ha comprobado que los flavonoides de forma combinada presentan mayor poder antioxidante que de forma aislada, y recientemente, se ha observado que los flavonoides son sustrato de la P-glicoproteína, la cual participa en la resistencia a los xenobióticos en células cancerosas (Zeng et al., 2005; Langguth et al., 2005; Dives et al., 2006).

Actualmente se propone a los flavonoides como moléculas que ejercen efectos beneficiosos en multitud de enfermedades. Muchas de las acciones biológicas de los flavonoides se atribuyen a sus propiedades antioxidantes a través de cualquiera de sus capacidades reductoras per se o bien influyendo en el estado intracelular redox.

El mecanismo a través del cual los flavonoides ejercen sus acciones beneficiosas o tóxicas aun está sin esclarecer. Sin embargo, estudios recientes han especulado que la actividad antioxidante (donadores de hidrógenos) no explica todos los efectos celulares. Actualmente se está valorando la posibilidad de un nuevo mecanismo protector no antioxidante, como la unión a receptores, funcionando como moléculas señal, y de modulación de expresión de genes (Rice-Evans et al., 2003).

Los mecanismos de absorción gastrointestinal de los polifenoles no estan totalmente esclarecidos, por su naturaleza hidrofílica se piensa que tienen que estar implicados transportadores de membrana que faciliten su transporte, aunque en la actualidad solamente ha sido identificado un transporte activo dependiente de Na⁺ en el transporte de ácidos fenólicos (Ader et al., 1996).

INTRODUCCIÓN

En el caso de los flavonoides, con excepción de los flavanoles, se encuentran en la forma glicosilada y la glicosilación influye en su absorción. Las agliconas pueden ser absorbidas desde el intestino delgado (Hollman y Katan, 1999) y los glicósidos, que resisten la hidrólisis del estómago, no pueden ser absorbidos en su forma nativa y deben de ser hidrolizados por las enzimas intestinales, o por la microflora del colon para ser absorbidos (Day et al., 2000). En muchos casos, cuando la flora está implicada, la eficiencia de absorción puede verse reducida porque tiene lugar una degradación de las agliconas que son liberadas en forma de ácidos aromáticos. Una excepción en cuanto a su absorción son aquellos flavonoides conjugados con glucosa que pueden utilizar el sistema de transporte activo de la glucosa dependiente de Na^+ (SGLT1) a nivel del enterocito para ser absorbidos, y posteriormente hidrolizados en el interior de las células por una β -glucosidasa (Hollman et al., 1996; Day et al., 1998). Otra vía implicada en la hidrólisis de algunos glucósidos es a través de una enzima glucosidasa que se encuentra en la membrana de las microvellosidades de las células intestinales, y cataliza la hidrólisis extracelular facilitando la difusión de las agliconas al interior de las células (Day et al., 2000).

Las proantocianidinas difieren de la mayoría de los otros polifenoles por su naturaleza polimérica y alto peso molecular, lo cual limita su absorción ya que los oligómeros de más de tres unidades es improbable que sean absorbidos a nivel del intestino delgado en su forma nativa, (solo dímeros y trímeros son capaces de atravesar el epitelio intestinal). Así, las proantocianidinas las cuales son los polifenoles más abundantes de la dieta, se absorben muy poco, pero

pueden ejercer sus efectos localmente en el tracto gastrointestinal, o mediar su actividad a través de los ácidos fenólicos producidos resultado de la degradación por la flora microbiana. Su acción local es muy importante al estar el intestino particularmente expuesto a agentes oxidantes.

Los efectos de los otros componentes del alimento sobre la biodisponibilidad de los polifenoles no está estudiada. Pueden ocurrir interacciones entre polifenoles y componentes como proteínas y polisacáridos que afectan a su absorción. Otros efectos más indirectos de la dieta son parámetros como el pH, la fermentación intestinal, excreción biliar, etc., que pueden tener consecuencias sobre la absorción de los polifenoles.

El transporte de los polifenoles en plasma está asociado a proteínas, no encontrándose libres en sangre, siendo la principal transportadora la albúmina. La concentración plasmática de los polifenoles después de un consumo elevado varía de acuerdo a la naturaleza y fuente de los polifenoles. Con respecto a la eliminación de los metabolitos de los polifenoles puede seguir dos vías diferentes: la excreción por la vía biliar y la urinaria. Los metabolitos conjugados se eliminan principalmente por la bilis, mientras que los monosulfatos lo hacen por orina.

5.2.7.- Melanoidinas.

Las melanoidinas son unos pigmentos marrones, polímeros formados principalmente partir de las interacciones entre carbohidratos y compuestos

INTRODUCCIÓN

que poseen un grupo amino libre (aminoácidos, péptidos y proteínas) a través de la reacción de Maillard. Son un grupo de sustancias con actividad antioxidante que están presentes de forma importante en determinados alimentos (café, malta, bollería, cerveza, etc) siendo ingeridos en cantidades considerables en la dieta habitual, del orden de varios gramos por día. Ésta es una de las reacciones más importantes en cambios químicos de los componentes de los alimentos durante el procesado y almacenaje de los mismos, donde como producto final se forman las melanoidinas (Friedman, 1996). Entre los distintos efectos fisiológicos se han descrito que poseen actividad antimicrobiana, anti/mutagénica, anti/tumoral, antioxidantes y prooxidantes, producen supresión de crecimiento celular tumoral e inhibición de enzimas digestivos. Su papel como antioxidante “in vivo” no es conocido aunque distintos estudios “in vitro” apoyan su papel beneficioso como antioxidante del radical hidroxilo, superóxido y peroxilo, actúan además como quelantes de metales como el zinc y el cobre. Chuyen et al., (1988) observaron que los niveles de peroxidación lipídica en hígado de ratas wistar alimentadas durante 6 semanas con alimentos ricos en melanoidinas (miso) eran inferiores a los del grupo control. En una línea similar, nuestro grupo de investigación (Valls et al., 2004), utilizando melanoidinas procedentes de síntesis, a partir de glucosa-glicina, encontró efecto antioxidante frente a la toxicidad inducida en hepatocitos aislados de rata por el agente antitumoral adriamicina. Se observó una disminución en los TBARS y en los niveles de LDH liberados al medio extracelular, a la vez que se producía un incremento en los niveles de ATP. Otros estudios mostraron el papel protector de los productos de Maillard, contra

el daño oxidativo, al ser capaz de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) humanas “in vitro” (Dittrich et al., 2003).

Poco es conocido sobre la biodisponibilidad de las melanoidinas, pero estudios en ratas han permitido saber que se absorben, bien por difusión a través del tracto gastrointestinal y son captados en el hígado, riñón, músculo y eliminados en la orina (Erbersdobler y Faist, 2001). Con respecto a su biotransformación, se cree que las enzimas de la fase II facilitan el tránsito metabólico de las melanoidinas formadas en los alimentos (Erbersdobler y Faist, 2001). El mecanismo a través del cual estos compuestos pueden ejercer sus efectos a nivel celular no es conocido. Distintos trabajos apuntan a que el efecto de las melanoidinas en las células puede estar mediado por los RAGE (receptor for advanced glycation end products), receptores que fueron originalmente identificados y caracterizados basándose en la capacidad de unir los productos de glicosilación avanzada (AGEs).

5.3.- SISTEMAS REPARADORES.

La función de estos sistemas reside en eliminar los productos nocivos formados, impidiendo una acumulación indeseable, a través de enzimas de reparación de ADN, enzimas proteolíticas y enzimas lipolíticas. En éstos sistemas se incluyen:

5.3.1.- Sistema reparador directo:

Reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicos como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.

Este grupo de enzimas reparadoras son las que catalizan la reducción de grupos (S-S) oxidados en proteínas por la acción de reductasas disulfuro en el interior de las células. Otro grupo de enzimas reparadoras son las proteasas y las fosfolipasas que actúan sobre proteínas y fosfolípidos respectivamente una vez se produce el daño en la molécula, y éstas deben ser reemplazadas vía síntesis de novo (Davies, 1995; Sartori et al., 2003).

5.3.2.- Sistema reparador indirecto:

En primer lugar se reconoce el daño molecular siendo éste eliminado o degradado, y en segundo lugar se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre en las proteínas oxidadas y peróxidos lipídicos de las cadenas carbonadas y en las oxidaciones del ADN y ARN. (Valls-Bellés et al., 2001; Mataix et al., 2002).

Los ácidos nucleicos que han sido modificados por estrés oxidativo son reparados principalmente por el sistema REB o BER (reparación por escisión de base) donde intervienen un grupo de enzimas como glicosilasas, endonucleasas AP y el nucleótido dañado es repuesto por polimerasas (Dempsey y Harrison, 1994).

INTRODUCCIÓN

Resumiendo, el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades en humanos tales como: el daño por isquemia/reperfusion, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, alergia, etc. Las EROs han sido también implicadas en algunas enfermedades de pulmón incluyendo síndrome agudo respiratorio con exposición a oxidantes, como asbestos, ozono, dióxido de nitrógeno y la toxicidad por drogas anticancerosas bleomicina y adriamicina (Valls-Bellés et al., 1994). El estrés oxidativo, la producción de superóxido y un desequilibrio en las enzimas antioxidantes han sido relacionados con otras patologías específicas como la enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Down, complicaciones diabéticas, hepatitis, etc... Un 70% de las enfermedades crónicas y asociadas se podría prevenir, a través del control de EROs y radicales libres. Por lo tanto los antioxidantes pueden tener capacidad para limitar los efectos adversos que causa el daño oxidativo en la iniciación y progresión de algunas enfermedades. Esto puede realizarse asegurando los niveles óptimos en los tejidos de antioxidantes y de "scavenger" de radicales libres vía dietética, y evitando la exposición a agentes generadores de estrés oxidativo.

6.- DIETA Y ESTRÉS OXIDATIVO.

La composición de la dieta juega un papel importante en el estrés oxidativo, ya que puede contribuir tanto en el daño oxidativo como en los mecanismos de defensa antioxidante (figura 21), lo que explica al menos en parte la relación entre dieta y algunas enfermedades crónicas como son la aterosclerosis y el cáncer.

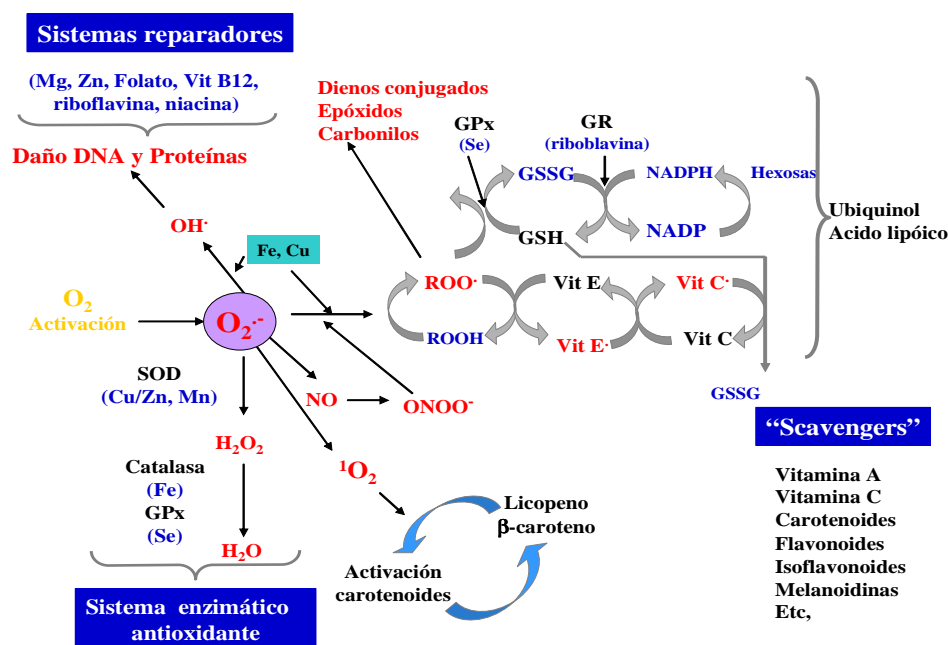


Figura 21.- Esquema de la generación de EROs y defensa antioxidante.

Más de 2000 estudios epidemiológicos muestran que la mayoría de los efectos protectores contra una variedad de enfermedades, particularmente cardiovasculares y cáncer, están correlacionados con una alta ingesta de frutas y verduras. Tradicionalmente, la nutrición se ha reconocido como un factor importante en la modulación de distintas enfermedades y de la longevidad. La dieta, particularmente la fruta, vegetales, frutos secos y bebidas procedentes

INTRODUCCIÓN

de vegetales, aportan una fuente de antioxidantes como vitaminas y otros fitoquímicos, los cuales son una importante fuente exógena capaz de aumentar la respuesta celular al estrés oxidativo.

En los estudios epidemiológicos realizados sobre la población europea por Gey y colaboradores (WHO/Proyecto Mónica 1991), donde determinaron los antioxidantes plasmáticos (alfa-tocoferol, ascorbato, vitamina A, carotenoides y selenio) en 16 poblaciones, la incidencia de mortalidad por cardiopatía isquémica muestra una relación inversa con el nivel de tocoferol ($P=0,002$). En las encuestas realizadas en Europa, sobre ingesta de frutas y vegetales se pone de manifiesto la alta diversidad de consumo entre el norte y sur. Estos estudios han mostrado una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras patologías, en los países del sur de Europa, donde se consume una dieta mediterránea, con relación a los países nórdicos, efecto atribuido en la hipótesis de partida a las vitaminas. Hoy se sabe que las frutas y verduras contienen otros compuestos, incluso, con mayor actividad antioxidante que las vitaminas, los flavonoides (Van't Veer et al., 2000; Lian et al., 2001). En el estudio Róterdam se investigó la relación entre el consumo alimentario de flavonoides y vitaminas antioxidantes y el riesgo de accidente cerebrovascular (ACV) isquémico durante un promedio de 6,4 años y se observó que un alto consumo alimentario de antioxidantes esta asociado con un menor riesgo de ACV. La relación entre el consumo incrementado de frutas y vegetales se ha demostrado epidemiológicamente que experimenta una reducción del 50% en el riesgo de canceres digestivos y de las vías respiratorias (Lindsay y Astley, 2002). Ello avala la hipótesis de que los

INTRODUCCIÓN

antioxidantes naturales procedentes de los alimentos pueden proteger a las células del estrés oxidativo. Asimismo, tenemos que tener en cuenta la complejidad de un alimento, que combina otros nutrientes que, de forma directa o indirecta, participan en esta defensa antioxidante.

Sin embargo, los estudios realizados con suplementos farmacológicos como antioxidantes en el ser humano, no muestran una evidencia consistente sobre los efectos beneficiosos de esta suplementación. En el proyecto: "Investigación Europea sobre los efectos funcionales de los antioxidantes de la dieta" de la Comunidad Europea (European research on the functional effects of dietary antioxidants) EUROFEDA (Lindsay y Astley, 2002), en el cual se han llevado a termino o/y recopilado muchos estudios epidemiológicos, en las cuales se habían introducido suplementos de vitaminas en la dieta, concretamente sobre vitaminas antioxidantes tales como la vitamina E, C y beta-caroteno no se ha observado efecto beneficioso, esto podría ser debido a la relación causa efecto, ya que la mayoría de estudios son a largo plazo y están interferidos por patologías crónicas o agudas. Por tanto, la falta de datos no permite la recomendación de forma "sistemática" de suplementos de antioxidantes. Además, hay que tener en cuenta que el abuso de suplementos es peligroso debido a su posible papel como elementos prooxidantes.

En el presente trabajo hemos estudiado el efecto antioxidante de una bebida alimentaria procedente de vegetales, ampliamente consumida como es la cerveza. Para ello hemos utilizado un concentrado de cerveza con/sin alcohol

como suplemento dietético ante la cardiotoxicidad y hepatotoxicidad inducida por la adriamicina.

7.- CERVEZA.

La cerveza es una bebida de baja graduación alcohólica, resultante de fermentar mediante levadura seleccionada, el mosto procedente de malta, de cebada, sólo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, y cocción, y aromatizado con flores de lúpulo. Los constituyentes de la cerveza provienen de sus cuatro principales materias primas malta, lúpulo, agua, levadura.

En la mayoría de los países, las bebidas alcohólicas como cerveza o vino son una parte integral de la dieta y consisten de aproximadamente de un 4 a un 65% de la ingesta energética media. La cerveza es una bebida muy popular en España con una ingesta de aproximadamente 150,4 ml de cerveza por día/por persona (Pulido et al., 2003). Los efectos positivos de la cerveza sobre la salud están asociados a la presencia de compuestos como antioxidantes (polifenoles y melonidinas), minerales, vitaminas, fibra y bajos niveles de etanol. En la tabla 2 se presentan la composición nutricional de la cerveza publicada por Bamforth y colaboradores (2002).

7.1.- COMPOSICIÓN DE LA CERVEZA.

7.1.2.- Agua.

Es el componente más abundante en la cerveza representando aproximadamente el 90 %. El agua es utilizada para preparar los mostos, y su composición resulta de gran importancia para la calidad y características de la cerveza. Las sales del agua modifican el pH de la malta y del mosto, y por ello son necesarios tratamientos previos para adecuarla a las condiciones de elaboración.

7.1.3.- Etanol y otros alcoholes.

El etanol se produce durante la fermentación del mosto por acción de las levaduras, ejerciendo una gran influencia sobre el aroma y el sabor de la cerveza. Su concentración depende del extracto de mosto inicial, oscilando entre 3 y 6 % (v/v), en las cervezas “comunes” (Bulinsky et al., 1986).

Durante la fermentación, además de etanol se producen cantidades variables de alcoholes superiores como el 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, 2-metilpropanol y 2-feniletanol. Los alcoholes superiores se forman por desaminación o descarboxilación de los aminoácidos del mosto, o bien por síntesis a partir de carbohidratos. La producción de estos alcoholes varía notablemente con las diferentes cepas de levaduras y a altas temperaturas se forman mayores cantidades.

7.1.4.- Carbohidratos.

La proporción de carbohidratos es de 3-5 %, aunque en muchas cervezas fuertes la cantidad es mayor. El 75-80 % del total son dextrinas, que provienen de la degradación enzimática del almidón por acción de las enzimas de la malta. El resto de los carbohidratos son azúcares sencillos como ribosa, arabinosa, xilosa, glucosa, fructosa y galactosa; disacáridos como maltosa e isomaltosa; trisacáridos como panosa, isopanosa y maltotriosa. Además existen pequeñas cantidades de glicerol y mioinositol. También aparecen β -glucanos que ejercen una acción estabilizadora de la espuma. Estos compuestos proceden de la pared celular del endospermo del grano de cebada y su concentración varía entre 50 y 700 mg/L (Sendra et al., 1989).

7.1.5.- Compuestos nitrogenados.

Los compuestos nitrogenados representan entre 0,15-0,7 %, y proceden fundamentalmente de las proteínas del material de partida y de las levaduras (Hough et al., 1982). Gran parte de las proteínas se degradan durante el malteado, originando aminoácidos y péptidos solubles. Las proteínas de alto peso molecular son las responsables del enturbiamiento en frío, mientras que los aminoácidos presentes en el mosto sirven de nutrientes a las levaduras, siendo el más importante el ácido glutámico por su influencia en el sabor de la cerveza.

7.1.6.- Ácidos.

El ácido acético es el mayoritario en la cerveza y comprende del 40 al 80 % de los ácidos totales. Su nivel varía considerablemente y tiene una gran influencia sobre el pH final de la cerveza (4,7 en una cerveza oscura fuerte y 4,1 en una cerveza rubia). Es un producto de excreción de las levaduras durante el proceso fermentativo o puede venir de la oxidación del etanol, aunque este hecho es poco probable debido a las condiciones del medio. También aparecen pequeñas cantidades de ácido carbónico, ácido láctico, fórmico, succínico y 9, 10,13 y 9, 12, 13-trihidroxiocetadecanoico, procedentes de la malta o de la actividad metabólica de la levadura.

7.1.7.- Lípidos.

La cerveza contiene una pequeña proporción de lípidos, procedentes de la malta y lúpulo, así como resultantes del metabolismo de la levadura en el proceso de fermentación. Fundamentalmente son ácidos grasos (0,33-0,76 mg/L), mono, di y triglicéridos (en conjunto hasta 0,4 mg/L), junto a trazas de esteroides y fosfolípidos. El contenido de lípidos en las materias primas es bastante superior, pero se eliminan durante el proceso de elaboración, de tal forma que el producto final sólo contiene las cantidades reseñadas.

7.1.8.- Sales minerales.

El contenido de sales minerales representa el 0,3-0,4 %, siendo los principales el potasio y los fosfatos. Además pueden encontrarse calcio, magnesio, hierro, cloruros, sulfatos, carbonatos y silicatos. También se ha descrito la presencia de hierro, plomo, cobre, cinc y estaño que producen turbidez en la cerveza.

La mayoría de estos componentes proceden exclusivamente de las materias primas de partida, especialmente de la cebada malteada y de los cereales usados como adjuntos. Sin embargo, la actividad de la levadura y el proceso de elaboración modifican la relación entre estos compuestos en la cerveza (Casares et al. 1979).

7.1.9.- Sustancias aromáticas.

Un gran número de compuestos, procedentes de distintos orígenes, contribuyen al sabor y aroma de la cerveza.

Estos compuestos aromáticos pueden proceder de la malta, originados durante el horneado, como los productos de Maillard. Los compuestos volátiles originados en esta etapa son fundamentalmente compuestos heterocíclicos con carbonilos, furanos y piranos, como el maltol y derivados que proporcionan el aroma a malteado. Los compuestos N-heterocíclicos, entre los que están las pirazinas y pirroles, también están presentes y confieren las notas a asado o a

INTRODUCCIÓN

pan tostado con umbrales muy bajos. Los derivados de la prolina como las pirrolidinas, azepinas y “oxacina de malta” son importantes por su amargor. También es probable encontrar intermediarios de la reacción de Maillard, tales como el 5-hidroximetil-2-furaldehído, la metilreductona y los α -dicarbonilos. Durante el malteado también se origina la S-metilmetionina (SMM), un importante compuesto del aroma en la cerveza “lager”. La SMM es el precursor del dimetilsulfuro (DMS), el cual se forma durante la cocción del mosto encontrándose en una concentración de 30-100 μg /L. Otros compuestos responsables del aroma y del sabor provienen del lúpulo, como las isohumulonas que proceden de la isomerización de las humulonas durante la cocción del mosto. Estos compuestos proporcionan un sabor amargo. Los aceites esenciales del lúpulo confieren diferentes aromas como el humulenol II, los diepóxidos de humuleno y, en menor grado, los monoepóxidos de humuleno y el α -terpineol son los que confieren aroma a hierbas y a especias.

Un tercer grupo de compuestos son los originados durante la fermentación como son los ésteres que poseen fuertes aromas afrutados. Los ésteres de mayor relevancia son el acetato de etilo, acetato de isobutilo, caproato de etilo y acetato de 2-feniletilo, que son productos secundarios del metabolismo anaerobio de los azúcares.

7.1.10.- Vitaminas.

La cerveza contiene pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B, tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, cianocobalamina y

niacina. También contiene ácido fólico y sus derivados (folatos). Estas vitaminas proceden de la malta, su contenido aumenta en la germinación de la cebada y no se destruyen en el tostado (Piendl, 1990).

7.1.11.- Compuestos fenólicos.

Proviene mayoritariamente de la malta y en menor medida del lúpulo e inciden en las características sensoriales y funcionales de la cerveza (Sendra y Carbonell, 1999). Son principalmente ácidos fenólicos como el gálico, sinápico y ferúlico y flavonoides de varios tipos, como los flavanoles o familia de las catequinas; las leucoantocianidinas, las chalconas y los antocianos entre los que están la pelargonidina y la malvidina (estos últimos sólo presentes en cervezas elaboradas con frutas rojas), y los flavonoles como el kaempferol y la quercetina y las isoflavonas como la daidzeína y la genisteína. También aparecen compuestos más complejos como los taninos siendo los más importantes las proantocianidinas de diverso grado de polimerización, los galotaninos y los lignanos. Sin embargo, el contenido final no depende sólo de las materias primas, sino que también influye el desarrollo de las distintas etapas de elaboración. Así, los contenidos finales de fenoles descritos en la bibliografía varían entre 150 y 350 mg/L (Narziss et al., 1972), destacando por su abundancia las proantocianidinas (hasta 100 mg/L), seguido de las catequinas (hasta 20 mg/L) y de los otros grupos de flavonoides y de los lignanos y elagitaninos (hasta 10 mg/L).

7.1.12.- Melanoidinas.

Las melanoidinas son compuestos que se forman en el proceso de elaboración de la cerveza, durante su tratamiento térmico. Se originan mediante las reacciones de Maillard entre los grupos amino de los péptidos y proteínas y los grupos aldehído del azúcar (Vernin y Parkanyi, 1982).

Esta reacción consta de tres etapas, una etapa inicial, en la que se produce la condensación entre un compuesto carbonílico y un grupo amino en medio ácido (Namiki, 1988). A partir de esta condensación se origina una glicosilamina N-sustituída y posteriormente una serie de compuestos denominados de Amadori (ARPs). Los productos de Amadori juegan un papel importante en el desarrollo del sabor y color de muchos productos tratados térmicamente (Van den Ouweland et al., 1978).

La segunda etapa sería una intermedia de descomposición de los reactivos de Amadori para dar lugar a una serie de moléculas volátiles y otras no volátiles de bajo peso molecular.

La última etapa es aquella en la que muchos de los compuestos formados durante la etapa intermedia, tales como los derivados enaminoles, los análogos de azúcar de bajo peso molecular y productos carbonílicos insaturados, sufren reacciones de polimerización para dar lugar a polímeros pardos o melanoidinas como producto final de la reacción (Hodge, 1953; Namiki, 1988).

Tabla 2.- Composición nutricional de la cerveza. Tomado de Bamforth, 2002.

Composición Cerveza	Rango por L de cerveza
Energía (Kcal)	150-450
Proteína (g)	3-5
Carbohidratos (g)	0-61
Vitamina C (mg)	30
Tiamina (mg)	0,003-0,08
Riboflavina (mg)	0,02-0,8
Niacina (mg)	3-8
Vitamina B6(mg)	0,07-1,7
Folato (µg)	40-600
Vitamina B12(µg)	3-30
Biotina (µg)	2-15
Calcio (mg)	40-140
Fósforo (mg)	90-400
Magnesio (mg)	60-200
Potasio (mg)	330-1.100
Sodio	40-230
Hierro (mg)	0,1-0,5
Zinc (mg)	0,01-1,48
Selenio (µg)	<0,4-7,2

En resumen, de la reacción de Maillard se obtienen al menos dos grandes grupos de compuestos, unos de peso molecular inferior a 1.000 Da y las

melanoidinas con un peso molecular superior variable desde 5000 a 100.000 Da (Hoffmann, 1998).

7.2.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA CERVEZA.

La actividad antioxidante de la cerveza juega un papel crucial en la estabilidad de su sabor, a la vez que retarda o previene los procesos de oxidación. Contribuye positivamente sobre la salud al actuar como “scavenger” de radicales hidroxilo y peroxilo, además puede actuar de quelante de metales como hierro y cobre, los cuales son importantes fuentes de radicales oxigénicos activos. Diversos trabajos apuntan a la elevada capacidad antioxidante de la cerveza como donador de hidrógeno. (Gonzalez San-José et al., 2001, Lugasi et al., 2003).

El contenido de antioxidantes en la cerveza está influenciado por factores genéticos y medio ambientales de su materia prima, y también es el resultado de los procesos tecnológicos durante la elaboración de la misma, los cuales determinan las características de las distintas variedades de cerveza (negra, rubia o sin alcohol). Entre los componentes de la cerveza que están implicados en la actividad antioxidante están: Compuestos fenólicos, (ácidos fenólicos (ferúlico, agálico o siríngico), flavonoles, catequina, procianidinas, taninas y calconas) (Lugasi, 2003), carotenoides y vitaminas. Aunque muy abundantes en la materia prima, sus niveles se ven disminuídos en la cerveza como resultado del tratamiento al que se ven sometidos, estando presentes en cantidades variables, como por ejemplo las melanoidinas, que se forman a

INTRODUCCIÓN

partir de azúcares y aminoácidos por la reacción de Maillard, resultado del tratamiento térmico.

Una vez absorbidos, estos compuestos presentes en la cerveza son capaces de contribuir a la capacidad total antioxidante del plasma, y posiblemente de otros compartimentos del cuerpo reforzando las defensas contra el estrés oxidativo. Así, Ghiselli y colaboradores (2000) observaron que la cerveza induce un incremento significativo de la capacidad antioxidante del plasma. Otros estudios han mostrado que la cerveza presenta efectos antitumorales y antimutagénicos con capacidad de inhibir carcinogénesis de colon inducida (Nozawa et al., 2004; Gerhauser, 2005). Algunos estudios demuestran un efecto preventivo de la cerveza sobre la carcinogénesis experimental, mostrando que la ingesta de cerveza disminuye los tumores gastrointestinales inducidos por diietil-hidrazina y de los tumores inducidos con azoximetano (Hamilton et al., 1987). La ingesta de cerveza también reduce la presencia de aductos del ADN en hígado de ratón inducidos con Trp-p2 (Arimoto et al., 1999).

Tenemos que tener presente que no todos los efectos son debidos a los antioxidantes, sino que en la cerveza se encuentran otros compuestos que contribuyen de forma directa o indirecta a la prevención de distintas patologías, como son por ejemplo el ácido fólico. El ácido fólico aunque no actúe como antioxidante, juega un papel en la reparación del ADN, y es sabido que reduce los niveles de homocisteína en plasma. La hiperhomocisteinemia es un

significante factor de riesgo para las enfermedades vasculares. (Mayer y colaboradores, 2001; Bamforth, 2002).

8.- AGENTE OXIDANTE. LA DOXORUBICINA O ADRIAMICINA.

La doxorubicina más conocida como adriamicina (ADR) es un antibiótico quinónico que pertenece al grupo de las antraciclinas (Figura 22).

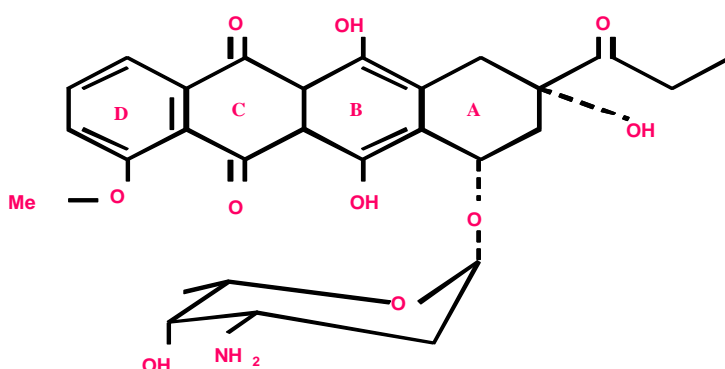


Figura 22- Estructura de la adriamicina.

Clínicamente se usa desde 1960 como un potente agente neoplásico. Tiene actividad terapéutica ante una gran variedad de cánceres humanos incluyendo linfomas, leucemias y tumores sólidos, etc. Los tumores que mejor responden son los de mama, carcinomas de esófago, sarcoma de kaposi, y linfomas de Hodgkings y de no-Hodgkings además de carcinomas de vejiga y tiroides. Aunque este tipo de antibióticos es ampliamente usado, su uso clínico se ha limitado por sus efectos secundarios, tanto agudos como crónicos (Lefrak et al., 1973). Los efectos agudos, tales como mielosupresión, náuseas, vómitos y arritmias, son reversibles o clínicamente manejables. Sin embargo, los efectos secundarios crónicos, especialmente cardiomiopatías y posterior insuficiencia

cardíaca, son irreversibles y tienen mal pronóstico. Se suelen dar con una incidencia del 20% en pacientes que han recibido dosis acumulativas superiores a 500 mg/m^2 , es decir, dichos efectos son dosis-dependientes de la droga administrada. Además, la disfunción miocárdica puede manifestarse durante fases tardías a la terapia, o puede estar latente y no desarrollarse durante varios meses o incluso hasta 20 años después del tratamiento (Wienik et al., 1992; Murphy et al., 1995; Wallace, 2003, Lipshultz et al., 2006).

8.1.- MECANISMO DE TOXICIDAD.

Los mecanismos responsables de la toxicidad han sido extremadamente controvertidos. Entre los diferentes mecanismos propuestos para explicar la acción citostática y citotóxica de este antibiótico se incluye la intercalación en el ADN, con la consecuente inhibición de la biosíntesis macromolecular, daño en el ADN vía inhibición de topoisomerasa II (enzima que modifican el número de ligazón del ADN, aliviando la tensión por encima de la horquilla y rompiendo transitoriamente las hebras de ADN, lo que permite la relajación de la estructura y la formación de nuevos enlaces fosfodiéster en las rupturas de las hebras), interferencia con la separación de las hebras de ADN y con la actividad helicasa (Singal et al., 1987; Gerwitz, 1999), (Figura 23).

Uno de los efectos secundarios más graves que causa la doxorubicina es la cardiotoxicidad. Se piensa que resulta primordialmente de la generación de radicales libres del oxígeno, pero parte puede ser por la inhibición de las topoisomerasas II. Las especies reactivas del oxígeno causan la peroxidación

INTRODUCCIÓN

de membranas lipídicas e inhiben la respiración celular. El tejido miocárdico también carece de una enzima que destruye los radicales libres y es más susceptible que otros tejidos del cuerpo (Hortobagyi, 1997; Barogi et al., 2000).

Un mecanismo a través del cual este antibiótico induce la formación de radicales libres es el resultado de la reducción de la adriamicina a semiquinona por NADPH-P450 reductasa microsomal, y la NADH deshidrogenasa del complejo I mitocondrial (Goodman y Hochstein, 1977). En presencia de oxígeno, el radical semiquinona da lugar al radical superóxido que por dismutación dará lugar a la formación de otros radicales (Figura 23).

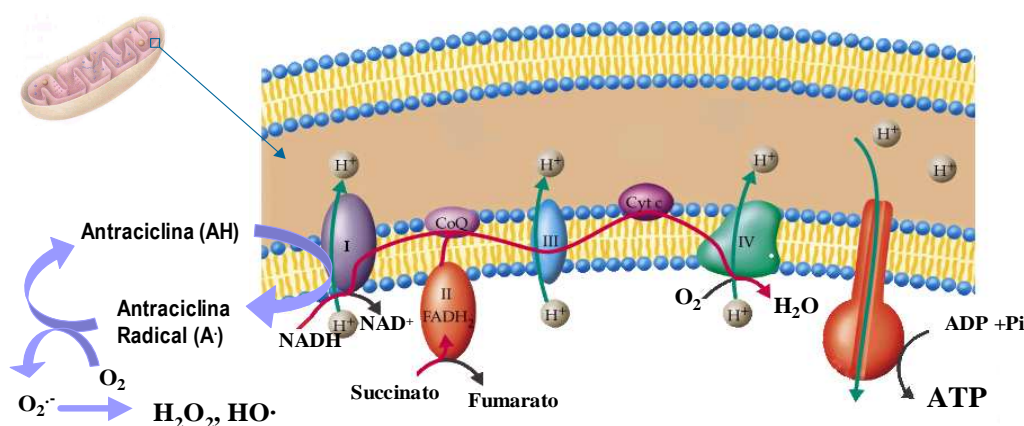


Figura 23.- Inhibición de la función mitocondrial por la ADR.

Estas EROs inducen el daño oxidativo resultado de la peroxidación de los lípidos de membrana, inactivación de enzimas críticos, inhibición del ADN y ARN, lo que implica una inhibición en la función mitocondrial y por tanto daño celular (Gutteridge y Quinlan, 1985; Bagchi et al., 1995), (Figura 24).

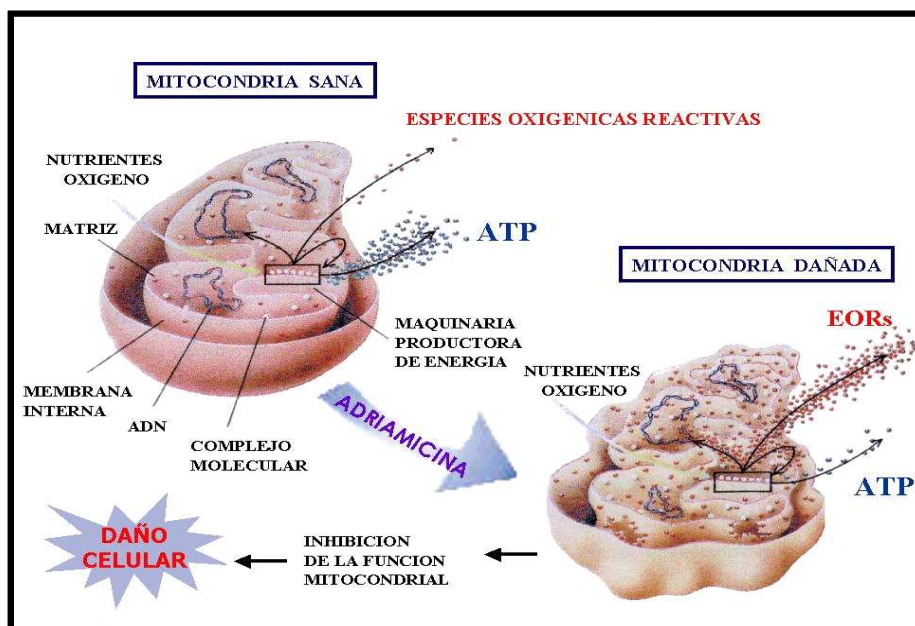


Figura 24.- Daño a la mitocondria por la ADR.

Es precisamente este daño oxidativo a los distintos componentes celulares y el estado redox lo que se cree que constituye el suceso clave en el desarrollo de la toxicidad irreversible de la adriamicina, lo cual limita su utilidad clínica en la terapia de enfermedades neoplásicas (Bagchi et al., 1995).

A pesar de los efectos tóxicos de la adriamicina, su uso está muy extendido por su gran eficacia como anticancerígeno. Se han ensayado distintos antioxidantes para contrarrestar sus efectos, obteniéndose diferentes resultados; entre ellos, moléculas como las transferrinas, las metaloproteínas, la deferrioxamina o la bilirrubina, y el ácido úrico. Otro grupo de antioxidantes que se han estudiado son aquellos que derivan de la dieta como vitamina E, vitamina C, vitamina A, coenzima Q, y flavonoides siendo los resultados bastante controvertidos (Quiles et al., 2002).

8.2.- FLAVONOIDES Y ADRIAMICINA.

En la actualidad se le presta un gran interés al grupo de los flavonoides debido a sus propiedades como quelantes y “scavengers” de radicales libres, que los hacen ser considerados como protectores potenciales de la cardiotoxicidad causada por la doxorubicina. Además de sus efectos beneficiosos sobre la salud, es sabido que pueden inhibir los efectos negativos de la doxorubicina sin afectar a la actividad antitumoral. Entre los estudios realizados en este campo se encuentran los llevados a cabo por el grupo de van Acker y colaboradores (1997, 2000, 2001), que demostraron que flavonoides sintéticos de la subclase de los flavonoles, como el mono-HER (7-monohidroxietilrutósido), ejercen una protección dosis dependiente contra la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina en ratones. Estos autores observaron que la administración del flavonoide sintético monoHer intraperitonealmente, 1 hora antes que la doxorubicina, disminuía significativamente la cardiotoxicidad del antibiótico, sin verse afectado los efectos antitumorales del antibiótico. Sadzuka y colaboradores (1997) observaron que el incremento en el nivel de peróxidos lípidos y la disminución de la enzima antioxidante, glutatión peroxidasa inducida por la doxorubicina se ve normalizada por la acción combinada de flavonoides como la rutina y luteolina. Además, hay que tener en cuenta que los flavonoides poseen actividad antiproliferativa, y capacidad de incrementar la actividad antitumoral de la doxorubicina, potenciando los efectos quimioterapéuticos de la droga (Bagchi et al., 2003). Por lo tanto, además de la capacidad quelante o antioxidante de estos compuestos, es necesario que presente otras

INTRODUCCIÓN

características como baja citotoxicidad, transporte a través de membrana para tener efecto etc...

El estado beneficioso frente a la toxicidad de la adriamicina también se ha observado con extractos de compuestos de origen vegetal. En estudios con un extracto de proantocianidinas de semillas de uva (Ray et al., 2002, Bagchi et al., 2003) se observó que un pretratamiento a ratones con dicho extracto inhibe significativamente la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina observándose una disminución en la actividad de la creatina quinasa de suero, en el daño al ADN y en los cambios histopatológicos en el tejido cardíaco de ratón. Otro estudio reciente, observó la protección del extracto fenólico de semilla de uva frente a la toxicidad de la doxorubicina en hepatocitos de rata, mostrando que protege a la membrana celular del daño oxidativo y consecuentemente previene la peroxidación lipídica y proteica. Además los cambios en los niveles de adenosín trifosfato y glutatión reducido producidos por la doxorubicina se restauran hasta alcanzar los valores control en presencia del extracto de semilla de uva (Valls-Bellés et al., 2006).

Todo ello permite postular que la ingesta de alimentos ricos en flavonoides puede llevar a cabo una disminución de los efectos secundarios del agente antitumoral, evitando la necesidad de tomar otros medicamentos y aportando, al mismo tiempo, efectos beneficiosos para la salud

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta este momento, se plantea evaluar el efecto protector de la cerveza, (rubia, negra y sin alcohol). En primer

INTRODUCCIÓN

lugar hemos realizado estudios en hepatocitos aislados de rata, a los cuales se le indujo un estrés oxidativo con el antibiótico antitumoral adriamicina en ausencia y presencia del extracto flavonoideo de la cerveza tanto rubia como negra.

En segundo lugar, hemos suplementado la dieta de las ratas con un concentrado de cerveza, tanto con alcohol como sin alcohol, al mismo tiempo que se les administraba el antibiótico antitumoral adriamicina.

9.- OBJETIVOS.

Los principales objetivos de este trabajo han sido:

1. Determinar la capacidad antioxidante de la cerveza rubia y negra mediante ensayos “in vitro” en hepatocitos aislados de rata incubados en presencia del antibiótico antitumoral adriamicina.
2. Determinar la actividad antioxidante de las fracciones de la cerveza y su contenido en compuestos polifenólicos.
3. Determinar la actividad antioxidante de la fracción rica en flavonoides de los distintos tipos de cerveza.
4. Valorar el efecto protector de la fracción rica en flavonoides en los hepatocitos aislados de rata sometidos a estrés oxidativo
5. Determinar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante total en plasma del animal de experimentación de un concentrado de cerveza con y sin alcohol.
6. Determinar el efecto de la cerveza tanto con/sin alcohol como suplemento dietético evaluando su papel frente a la cardiotoxicidad y hepatotoxicidad inducida por la adriamicina en ratas.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.- MATERIAL.

2.1.1.- Reactivos.

Los reactivos para soluciones tamponadas, enzimas, coenzimas, 8-Hidroxideoxiguanosina (8-oxo-dGuo), ácido ascórbico, ácido galico, catequina 6-hidroxil-2,5,7,8, ácido tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) fueron proporcionados por Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA) y Boehringer Mannheim (Alemania). La adriamicina fue suministrada por Pharmacia-Upjohn (Milan, Italia), el N, N-dimetil-p-fenilenediamina dihidrocloride (DMPD) de Fluka (Seelze, Alemania), disolventes y otros reactivos de ScharLau (Barcelona, España) y Merck (Darmstadt, Alemania). Los Kits de antioxidantes totales son de Randox (Reino Unido, BT29 4QY), los de la 8-oxo-dGuo y MDA + HAE son de OXIS, (OXIS Health Products, Inc. 6064 N Cutter Circle, Suite 317 Portland, OR 97217-3935 USA). El agua utilizada en todas las determinaciones fue de grado Milli-Q (Millipore).

2.1.2.- Animales.

Se utilizaron ratas Wistar machos y hembras de 3-4 meses de edad y peso comprendido entre 250-300 g, a las que se les alimentó con dieta estándar IPM R-20 comercializada por Panlab (Barcelona, España) y agua ad libitum. Los animales fueron instalados en jaulas individuales y condiciones apropiadas de

laboratorio. Estuvieron sometidos a periodos alternantes de luz y oscuridad de 12 horas en una atmósfera controlada del 60% de humedad y 22-24°C de temperatura en el estabulario de la Facultad de Medicina de Valencia.

2.1.3.- Cerveza.

Se ha realizado el análisis de 74 cervezas comerciales representativas del mercado actual. La mayoría fueron cervezas de producción nacional, pero se incluyen también algunas cervezas extranjeras, bien por sus características peculiares o porque se consideraron con una presencia significativa entre las consumidas en los últimos años. 46 cervezas se clasificaron como “rubias”, 14 formaron el grupo de las cervezas “sin alcohol”, 14 se englobaron en el grupo de cervezas “negras”.

De cada una de ellas se analizaron 3 botellas, intentando que fueran de lotes (cocidas) distintos, con el fin de que los datos encerraran la máxima variación posible. Todos los análisis químicos se realizaron por duplicado.

Las cervezas empleadas, en la parte “in vivo”, tanto rubias, como sin alcohol están comercializadas en España. Se mantuvieron refrigeradas hasta su posible utilización e inmediatamente, antes de ella, se procedió a su análisis para prevenir una posible oxidación de los fenoles. Las muestras que se usaron como suplemento dietético se obtuvieron a partir de una concentración en vacío a una temperatura inferior a 35°C (10 veces más concentradas de la cerveza original).

2.1.4.- Aparatos.

Todos ellos ubicados en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia.

- **Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC):**
 - Equipo Kontron: Sistema de bombas modelo 422, autoinyector modelo 360 y detector modelo 430.
 - Equipo Beckman con 2 bombas SYSTEM GOLD 168 con el detector System Gold 168 de fotodiodos alineados.
 - Detector de masas HP 1100 LC-MSD.

- **Espectrofotómetros:**
 - Kontron modelo 922.

- **Centrífugas:**
 - Centrífuga refrigerada Sorval, modelo SS-34.
 - Centrífuga refrigerada Heraus, Megafuge 1.0.
 - Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5415 R.
 - Centrífuga refrigerada Heraus, modelo Sepatech 200
 - Centrífuga de mesa Heraus Sepatech, modelo Labofuge Ae.

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

- **Otros aparatos:**
 - Sistema de perfusión para el aislamiento de células hepáticas
 - pHmetro Crison, modelo Microph 2001. Hamilton Liq-Glass
 - Homogeneizador: Junke and Kunkel, IKA-Werk, modelo RW 20 DZM
 - Sistemas de tratamientos de agua: Milli Q gradiente A 10.
 - Baños Termostáticos de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 y Pselecta Unitronic 320 OR.
 - Agitadores magnéticos Minishaker IKA, modelo MS2, SBS modelo A-163, Lab-Line Instruments Inc. USA
 - Ultracongeladores, congeladores y neveras

2.2.- MÉTODOS.

2.2.1.- Determinaciones analíticas de la cerveza.

2.2.1.1.- Fraccionamiento de la cerveza.

La separación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en función del peso molecular, estructura química y polaridad siguiendo el método descrito por Distefano y Cravero (1990). Este método consiste en un fraccionamiento en columna, sobre una resina de adsorción (Amberlita XDA-2 de 150-250 μm de tamaño de partícula). El fraccionamiento se consigue eluyendo con disolventes de polaridad diversa, obteniéndose las siguientes fracciones: F1 (agua); F2 (éter etílico) y F3 (metanol). El fraccionamiento se llevó a cabo por duplicado para cada cerveza analizada. Tras el fraccionamiento, cada fracción se llevó a sequedad evaporando el disolvente a $T^a \leq 35^\circ\text{C}$ en rotavapor. Dependiendo del análisis que se realiza sobre la fracción, el residuo se trata de un modo u otro. Así, para medir la actividad antioxidante global, se redisuelve en una mezcla hidroalcohólica de igual graduación a la cerveza. Cuando lo que se evalúa son los fenoles presentes, se redisuelve en 2 mL de metanol (calidad HPLC).

2.2.1.2.- Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones por el TEAC y el CEAC.

Se determinó la actividad antioxidante de la cerveza y de las fracciones aisladas cromatográficamente, utilizando el método propuesto por Fogliano et

al. (1999). La elección de este método frente a otros similares se realizó teniendo en cuenta las siguientes ventajas: mayor estabilidad del punto fijado para la medida, alta reproducibilidad interensayo, y poca sensibilidad ante los antioxidantes hidrofóbicos, reduciendo así las posibles interferencias.

Éste método había sido aplicado a vinos, por ello fue necesario adecuar las condiciones de análisis a la cerveza y sus fracciones. Optimizadas éstas, se calcularon las curvas de calibrado con soluciones estándar de Trolox (un análogo de alfa-tocoferol) y vitamina C. Los resultados de la actividad antioxidante se pudieron expresar entonces como TEAC (Capacidad Antioxidante de Trolox) o como CEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de vitamina C).

2.2.1.3- Actividad antioxidante de las cervezas según el método químico DMPD.

Se utiliza el método de Fogliano et al. (1999). Este método se basa en la capacidad que tienen los polifenoles de reaccionar con los radicales libres. Se usa el N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) como reactivo, compuesto que en presencia de un agente oxidante da lugar al radical DMPD[•] con una coloración púrpura (medible a 505 nm). La adición de un agente antioxidante capaz de transferir hidrógeno provoca una decoloración de la solución. De este modo, la decoloración del medio es proporcional a la cantidad de agente antioxidante presente en él.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se toma 1 mL de cromóforo y se añade 50 μ L de muestra o de patrón (vitamina C o Trolox). La reacción tiene lugar a 25°C, manteniéndose en agitación continua durante 10 minutos. Tras este tiempo se procede a la medida del valor de la absorbancia a 505 nm (A_f). Además, se determina el valor de absorbancia del cromóforo inicial (A_0). Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro BECKMAN DU- 650 con diodo-array, usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. A partir de estos valores de absorbancia se define un parámetro que es el porcentaje de inhibición:

$$\% \text{Inhibición}_{505 \text{ nm}} = (1 - A_f/A_0) * 100$$

Las curvas de calibrado se clacularon con soluciones estándar de Trolox (un análogo del α -tocoferol), en un rango de concentraciones de 0,2 a 6 μ g y de vitamina C desde 0,05 a 2 μ g. Por tanto, los resultados de la actividad antioxidante se pudieron expresar entonces como TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox) o como CEAC (capacidad antioxidante equivalente de vitamina C).

2.2.1.4.- Determinación de polifenoles totales en la cerveza y en plasma a diferentes tiempos tras las ingesta de cerveza.

Se aplicó el método Folin-Ciocalteu. Esta reacción se basa en la oxidación en medio básico (Na_2CO_3) de los grupos hidroxilos de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin (una mezcla de ácido fosfowolfrámico y fosfomolibdico), que se reducen dando una mezcla de óxido de wolframio y óxido de molibdeno,

de color azul. El complejo azul que se forma se mide a 750 nm y es directamente proporcional a la cantidad de polifenoles totales presentes en el medio (Singleton y Rossi, 1965).

En un tubo se introducen la muestra según concentración, Folin-Ciocalteu y anhidro una solución de Na_2CO_3 . Se deja desarrollar el color durante una hora y se centrifuga 5 minutos a 2000 rpm y se mide la absorbancia a 750 nm, frente a un blanco preparado de la misma forma, salvo que se ha sustituido la muestra por agua.

El contenido de polifenoles totales se obtiene usando la recta de calibrado calculada a partir de disoluciones conocidas de ácido gálico:

$C = 484,97 A - 11'59$, donde A es la absorbancia a 750 nm y C es la concentración de ácido gálico en mg/L.

2.2.1.5.- Determinación de las catequinas.

Las Catequinas se evalúan por reacción de condensación con la vainillina y se expresan como mg/L de D-catequina. La determinación se basa en la propiedad de estos compuestos de dar reacciones de condensación con los grupos carbonilos en medio ácido. Se emplean el aldehído vainílico (Vainillina) como compuesto carbonílico, que reacciona con los ciclos bencénicos “activados” de las catequinas originando un cromóforo rojo que se mide a 500 nm (Swain y Hillis, 1959). La recta de calibrado se calcula a partir de disoluciones patrón de D-catequina y es, $C = 308,17A - 12,5$ con el valor de $r =$

0'9994, siendo C la concentración en mg/L de D-catequina y A la absorbancia medida 500 nm.

2.2.1.6.- Determinación de las proantocianidinas.

Las Proantocianidinas se determinan tras su transformación en antocianidinas al calentarse en medio ácido, en presencia de oxígeno. El color rojo formado, fruto de la hidrólisis de las proantocianidinas se mide 550 nm (Ribéreau-Gayón y Stonestreet, 1965). El contenido total de proantocianidinas se expresa como mg/L de cloruro de cianidina y el valor se calcula a partir de la recta de calibrado, $C = 815A - 0'61$, donde C es la concentración en mg/L de cloruro de cianidina y A la absorbancia a 550 nm. Se expresan com mg/L de cloruro de cianidina.

2.2.1.7.- Determinación y aislamiento de melanoidinas.

Las melanoidinas fueron aisladas de las cervezas en estudio por un método de diálisis (Ames et al. 1999), utilizando una membrana de celulosa (Sigma) que retiene aquellas moléculas de peso molecular ≥ 12.000 Da, previamente acondicionada. En cada tubo de diálisis se introdujeron 15 mL de cerveza que se colocaron en un vaso con 1 L de agua MiliQ. Esta solución fue mantenida en agitación continua durante 12 horas a 5°C. Al cabo de las 12 horas se cambió del agua del vaso y se dejó de nuevo otras 12 horas en agitación. El volumen final retenido en el tubo de diálisis (dializado) fue llevado a un volumen de 50 mL con agua MiliQ.

2.2.1.8.- Cuantificación de las melanoidinas.

La cuantificación de melanoidinas tanto en la cerveza original como en el dializado, se efectúa tal y como se detallará a continuación. El patrón de melanoidinas se obtiene a partir de glucosa y glicina, siguiendo el método descrito por Hofmann (2000). Se disuelven 0,05 moles de glucosa y 0,05 moles de glicina en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, se liofiliza la disolución a una temperatura inferior a 30 °C. Se calienta la mezcla a 125 °C, durante 2 horas y se enfría hasta temperatura ambiente. Se toman 0,5 g de la muestra y se disuelven en 25 ml de agua destilada y se filtra a través de un filtro Whatman nº 4 (diámetro de poro 20-25 µm) recogiéndose el filtrado que contiene las melanoidinas solubles. Se lava el residuo dos veces y se mezclan ambos lavados con el filtrado original, siguiendo el mismo procedimiento descrito para las cervezas. Esta mezcla se llama solución A. Posteriormente se liofiliza y conserva a -80°C.

Se realiza el espectro UV-visible de una disolución de esta sustancia patrón en el rango de 200-600 nm, utilizando agua como blanco, teniendo que observarse un pico característico 345 nm (Pérez-Magariño et al., 2000). Por ello los valores de absorbancia a 345 se utilizan para cuantificar las melanoidinas presentes tanto en las cervezas como en los dializados.

2.2.1.9- Determinación del radical superóxido.

El radical superóxido se genera mediante la oxidación del fenazina metasulfato- β -nicotinamida adenina dinucleotido por el NADH y determinado por la reducción del nitroblue tetrazolium (NBT). En este experimento, el radical superóxido se genera en 3 ml de tampón Tris/ClH 16 mM a pH: 8.0 que contiene 78 μ M de NADH, 50 μ M de NBT y 10 μ M PMS. Los concentrados de cervezas fueron testadas a diferentes volúmenes (0,5, 1, 5 y 10 μ l). Al reaccionar el radical superóxido y el NBT se produce una coloración que fue detectada a una longitud de onda 560 nm (Liu et al., 1997).

2.2.2.- Técnica para el aislamiento de células hepáticas.

Se utilizaron ratas Wistar de 3-4 meses de edad y peso comprendido entre 250-300 g, alimentadas con dieta estándar IPM R-20 comercializada por la casa Leticia, Barcelona. Para el aislamiento de las células hepáticas se utilizó el método de perfusión (Berry y Friend, 1969; Seglen et al., 1972; modificado ligeramente por Romero y Viña 1983;).

La rata es anestesiada con pentotal sódico, a la dosis de 62,5 mg/Kg de peso. Para evitar la formación de trombos se le administra heparina 5% una dosis de 2 mL/Kg, vía intravenosa a través de la vena safena. A continuación se cortó la piel y posteriormente la pared muscular abdominal desde el límite superior de la región púbica hasta tropezar con el apéndice xifoides. Se pasa una ligadura por la vena cava por encima de la desembocadura de las arterias

MATERIAL Y MÉTODOS

renales, y otra por la vena porta unos 2 cm antes de su entrada en el hígado, ambas se dejan sin anudar.

Posteriormente se procede a una toracotomía amplia, de forma triangular, de base inferior a nivel diafragmático y vértice superior a la altura final del manubrio esternal y se pasa una nueva ligadura a nivel de la cava inferior en su desembocadura en aurícula derecha, sin anudar. Se practica un corte en la aurícula derecha y lo más rápidamente posible, se introduce una cánula de plástico de 1,5 mm de diámetro, que se lleva hasta la desembocadura de la cava inferior, dejando la punta a 1-2 cm del diafragma. Posteriormente, la ligadura se cierra y se pone en marcha el sistema de perfusión e inmediatamente después se anuda la cava inferior y se corta la porta, de esta forma, producimos una corriente en sentido cava-portal. En este momento comienza a fluir por la porta el medio de perfusión Krebs-Henseleit (K-H) sin calcio, siendo la velocidad de flujo de 20 mL/min. Una vez limpio se cogen 40 mL de Krebs-Henseleit con calcio y se mezclan con la colagenasa previamente disuelta con Cl_2Ca (25 mg de colagenasa / 4,3 mL de Cl_2Ca).

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

Esta mezcla se coloca en un Erlenmeyer de 250 mL en un baño a 37°C con agitación. Al cabo de 10 minutos la mezcla se pasa por un "colador" para quitar los restos de parénquima o tejido conectivo excesivamente grandes, y se

MATERIAL Y MÉTODOS

centrífuga a 500 rpm. Se decanta el sobrenadante, se pesa el sedimento (el peso húmedo de las células) y se resuspende en una proporción de 10 mL/g de célula. La suspensión así conseguida contiene proporción de 9-11 mg de peso seco de célula por mL (Krebs y col, 1979). La suspensión celular se utiliza para llevar a cabo las diferentes incubaciones.

Para preparar el medio de perfusión Krebs-Henseleit se mezclan las siguientes soluciones:

- 1L de cloruro sódico (ClNa) 9g/L
- 40 mL de cloruro potásico (ClK) 1,15%
- 10 mL de fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 2,11%
- 10 mL sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{SO}_4\text{Mg}_7\text{H}_2\text{O}$) 3,82%
- 30 mL de carbonato monosódico (CO_3HNa) 1,3%.

Al Krebs-Henseleit sin calcio se le añade 30 mL de ClNa 0,9%, y también un quelante, el Etilén glicol tetraacético (EGTA) previamente llevado a un pH 7 con hidróxido sódico NaOH, la concentración final del quelante es de 0,5 mM (Seglen 1972). Al K-H con calcio se le añade 30 mL de Cl_2Ca . Ambas soluciones son bajas en CO_3HNa , luego se gasean con O_2/CO_2 (95:5 v/v) hasta conseguir un pH comprendido entre 7,2-7,4.

Las incubaciones se llevaron a cabo con las siguientes condiciones:

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 25 mL de volumen. En cada uno de ellos se pipeteó los diferentes sustratos y se ajustó el volumen final hasta 2 mL con Krebs-Henseleit con calcio. Después añadimos 2 mL de suspensión celular equivalente aproximadamente a 85 ± 5 mg peso húmedo de hepatocitos. Con

MATERIAL Y MÉTODOS

ello obtenemos un volumen final de 4 mL por matraz. Estas incubaciones se gasean durante 15 segundos con una mezcla de O₂/CO₂ (95/5) dejándose en el baño termostatzado a 37°C en agitación continua durante 60 minutos.

Para averiguar la cantidad de células por mL de suspensión, se toman 2 mL de ésta (que es la cantidad de suspensión que se pone en cada erlenmeyer) y se secan en una estufa a 100°C. Igualmente, se toman 2 mL de la solución salina de Krebs-Henseleit con calcio y se secan en la estufa.

La diferencia entre el peso seco de la suspensión celular y el peso seco de la solución salina nos da el peso seco de la célula. Para obtener el peso húmedo de la misma, basta multiplicar el peso seco por 3,7 (Krebs y col., 1979).

Transcurrido el tiempo de incubación todas las reacciones se separaron mediante la adición del ácido perclórico al 20%, siguiendo el mismo orden en el que fueron introducidas en el baño. Posteriormente se centrifuga y el sobrenadante neutralizado (KOH al 30%) o sin neutralizar se determinan las correspondientes pruebas bioquímicas.

2.2.3.- Pruebas de viabilidad de los hepatocitos aislados.

Para comprobar el porcentaje de células en la suspensión se utilizó la técnica de exclusión del azul tripano, consistente en una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de hepatocitos con una solución de azul tripano al 0,2% en ClNa al

0,9% (Krebs et al., 1979). De esta mezcla se deposita una gota en una cámara cuenta glóbulos de Buerke y se observó al microscopio óptico. Las células con membrana íntegra no permiten la entrada del colorante, quedando transparentes. Las células alteradas toman una coloración azul debido a la entrada del colorante. El porcentaje de células viables fue superior al 90% en todos los casos coincidiendo con otros autores (Krebs et al. 1974; Carlsen et al. 1981).

2.2.4.- Diseño experimental para los estudios “in Vitro” del efecto antioxidante de la fracción 3 de la cerveza en los hepatocitos aislados de rata.

Las incubaciones se llevaron a cabo por duplicado con 2 mL de suspensión celular conteniendo aproximadamente 2×10^6 células en Krebs-Henseleit solución en presencia de adriamicina o doxorubicina, a una concentración de 25 μ M, en presencia/ausencia de diferentes concentraciones del extracto de cerveza (1,25; 2,5; 5; 10; 20 μ g / mL tanto de la F3 de la cerveza rubia como negra).

Estas incubaciones se gasean durante 15 segundos con una mezcla de O₂/CO₂ (95/5) dejándose en el baño termostático a 37°C en agitación continua durante 60 minutos.

2.2.5.- Diseño experimental para los estudios “in vivo”.

Se establecieron 4 grupos de animales (ratas Wistar) para cada tipo de cerveza (con/sin alcohol):

Grupo estudio (adriamicina + cerveza): La suplementación con cerveza se inicia 7 días antes del tratamiento con el quimioestático, y se continúa hasta una semana después de finalizar dicho tratamiento. El suplemento dietético de cerveza (con/sin alcohol) consiste en un concentrado (10 veces) de una cantidad equivalente a 400 ml/día para una persona de 70 kg de peso. A estos animales se les administra dos dosis de adriamicina de 5 mg/kg de peso vía intraperitoneal (que es la dosis establecida en humanos y utilizada en otros estudios) (Hong et al, 2002). Así pues, el día 7 de la suplementación se administra la primera dosis de adriamicina y el día 14 la segunda, y el aporte dietético de cerveza se mantiene hasta el día 21, procediendo en ese día a la toma de muestras biológicas.

Grupo adriamicina (adriamicina + H₂O): Durante los 21 días que dura el experimento, a los animales se les suplementa con agua en vez de cerveza y se sigue el mismo tratamiento con la adriamicina, igual que en el grupo anterior.

Grupo testigo (suero fisiológico + cerveza): Durante 21 días se sigue la suplementación dietética con cerveza, y la adriamicina es sustituida por suero fisiológico.

Grupo control (suero fisiológico + H₂O): Durante los 21 días las ratas se suplementan únicamente con agua y en vez de adriamicina se administra suero fisiológico.

2.2.6.- Aislamiento de mitocondrias de hígado y corazón de rata.

Para el aislamiento de las mitocondrias se utiliza el método descrito por Santos et al. (2002). Las ratas se anestesian con halotano. Posteriormente se realiza una extracción de sangre de la vena yugular, la cual se procesa para la obtención de plasma, realizando en él las correspondientes pruebas bioquímicas. A continuación seccionamos longitudinalmente el animal para extraer los órganos, hígado y corazón, los lavamos y homogeneizamos con la solución tampón 1 (sacarosa 250 mM, EGTA 1 mM y Hepes-KOH 5 mM a pH 7,4) para proceder a la obtención de las mitocondrias puras.

Corazón - Homogeneizamos el corazón con 5 ml de tampón 1 en frío y añadimos nagarse (1mg/ml de tampón). Posteriormente, llevamos el volumen hasta 30 ml y centrifugamos a 11.000 g durante 10' a 4^o C. Decantamos el sobrenadante y disolvemos el pellet con 15 mL de tampón 1, centrifugamos a 900 g durante 10' (este paso se repite tres veces). Finalmente, resuspendemos con tampón 2 (Sacarosa 250 mM, Hepes/KOH 5 mM, EGTA 0.5 mM a pH 7,4) con lo que se obtienen las mitocondrias que se congelan a -80 °C hasta que sean utilizadas para realizar los ensayos bioquímicos.

Hígado - Lavamos el hígado con la solución tampón 2. Homogeneizamos en 5 ml del tampón 2, y posteriormente añadimos 15 mL de la misma solución tampón. Centrifugamos a 900 g durante 10 minutos a 4 °C, filtramos el sobrenadante con una gasa doble y volvemos a centrifugar a 9.000 g durante 10 minutos a 4 °C (este paso se repite dos veces). Finalmente se resuspende el pellet con tampón 2 y congelamos las mitocondrias obtenidas a -80 °C hasta que se realicen las correspondientes pruebas bioquímicas.

2.2.7.- Determinaciones analíticas en las muestras biológicas.

2.2.7.1.- Determinación de la actividad lactatodeshidrogenasa. EC:

1.1.1.27.

La viabilidad celular se determinó mediante la cuantificación de la lactatodeshidrogenasa (LDH) liberada al medio extracelular. Se utilizó la técnica de Hakala (descrita por Bergmeyer y Bernt, 1974) basada en la conversión de piruvato en lactato.

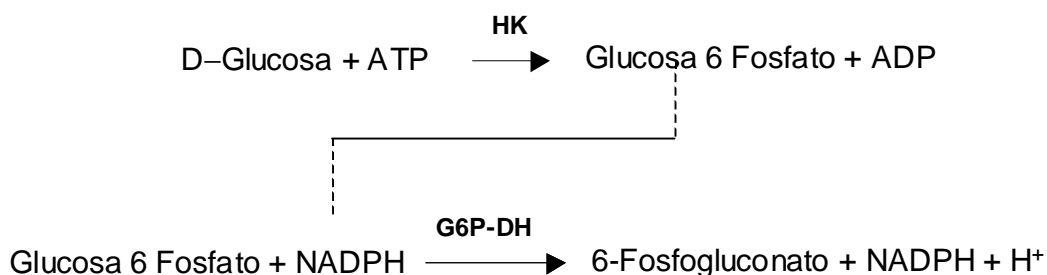


LDH = Lactato deshidrogenasa

La oxidación del NADH medida espectrofotométricamente a 340 nm por unidad de tiempo y a 25°C es equivalente a la cantidad de LDH de la muestra.

2.2.7.2.- Determinación de la concentración de adenosin trifosfato.

Para la determinación de adenosín trifosfato (ATP) se utilizó el método descrito por Lamprecht y Trautschold (1974), basado en las siguientes reacciones acopladas:



HK = Hexoquinasa, (EC 2.7.1.1.)

G6P-DH = Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49)

La formación de NADPH medida espectofotométricamente a 340 nm es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra.

2.2.7.3.- Determinación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico procedentes de la peroxidación lipídica.

Para determinar las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) procedentes de la peroxidación lipídica, se siguió la técnica de Stacey y Priestly (1987). Ésta se basa en añadir a 0'4 mL de una suspensión celular de hepatocitos, 1 mL de ácido tricloroacético al 10% (p/v) y 2 mL de ácido tiobarbitúrico 0'67% (p/v) respectivamente. De esta manera, se forma un complejo entre el tiobarbitúrico y los productos de la peroxidación lipídica. Tras incubar a 100°C durante 15 minutos, se deja enfriar y se centrifuga a unas 500

rpm. El sobrenadante se mide espectrofotométricamente a 535 y 520 nm, la diferencia de absorbancias es proporcional a la cantidad de TBARS.

2.2.7.4.- Determinación de grupos carbonilo en plasma.

La oxidación proteica se midió por la estimación de los grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos, según procedimiento desarrollado por Levine y cols (1990) con algunas modificaciones de Tian y cols (1998). La DNFH unida a proteínas se cuantificó colorimétricamente, tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

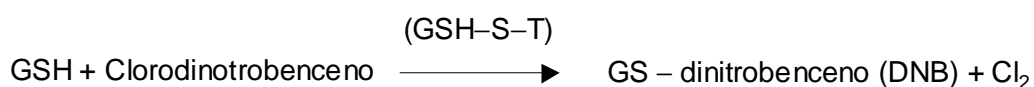
La cantidad de proteína en células utilizada oscila entre 0,5 – 1 mg/ml. Añadimos tampón de conservación de mitocondrias hasta 1 ml de volumen final. Centrifugamos a 13600 rpm 10' y al sobrenadante añadimos estreptomicina sulfato 10 % con tampón Hepes 50 mM pH:7,2, en una proporción de 1/9 v/v. (Ahn et al. 1987). Centrifugamos y cogemos 200 µl del sobrenadante y añadimos 400 µL de 2,4 dinitrofenilhidracina (DNFH) 10 mM / CIH 2,5 M a las muestras y 400 µL de CIH 2,5 M a los controles. Incubamos 1 h. a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Centrifugamos a 12600 rpm, 3'. Añadimos 1 mL de TCA al 20%. Centrifugamos a 12600 rpm 3'. Recogemos el pellet y lo lavamos 3 veces con 1 ml de Etanol:Acetato de Etilo 1:1 v/v, centrifugamos a 12600 rpm 3' y recogemos el pellet. Finalmente añadimos 1 ml de Guanidina 6N a pH: 2,3, centrifugamos a 12600 rpm y

medimos el sobrenadante a una $\lambda = 366$ nm frente a una solución de guanidina.

Coeficiente de extinción = $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.7.5.- Determinación de los niveles de glutatión .

La cuantificación del glutatión reducido (GSH) se llevó a cabo mediante la técnica de Brigelius et al (1983), de la Glutathion-S-Transferasa (GSH-S-T).



El GS-DNB absorbe luz a una longitud de onda de 340 nm, siendo proporcional el cambio de extinción medido espectrofotométricamente a la cantidad de GSH presente en la muestra.

2.2.7.6.- Determinación de antioxidantes totales en plasma tras la ingesta de cerveza.

Para la determinación de los niveles de antioxidantes totales se utiliza el kit: Total Antioxidant Status de Randox (United Kingdom, BT29 4QY), de la forma siguiente: El 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolín sulfonato) (ABTS) se incuba con peroxidasa y H_2O_2 para dar lugar a la formación del radical ABTS^+ . Este radical presenta una coloración verde-azulada relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de la coloración, siendo esta supresión, proporcional a la concentración de antioxidantes.

2.2.7.7.- Determinación de la actividad NADH-Ubiquinona oxidoreductasa, EC 1.6.5.3.

La actividad de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) se cuantificó siguiendo espectrofotométricamente la oxidación del NADH. La muestra se somete a 2-3 ciclos de congelación y descongelación con la finalidad de romper las membranas. Se utilizaron 25 μl de muestra a una concentración de proteína de 1mg/ml. Se incubó durante 1 minuto a 25°C con tampón Fosfato Potásico 50 mM a pH:7'4, EDTA 1mM, Decilubiquinona (Q1) 60 μM disuelta en etanol, Antimicina A 2 $\mu\text{g/ml}$ en etanol. La reacción se desencadena con 10 μL de NADH a una concentración final de 75 μM y se mide espectrofotométricamente la disminución de la actividad a 340 nm durante un minuto, considerando un coeficiente de extinción molar $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Santos et al. 2002).

2.2.7.8.- Determinación de la actividad citocromo oxidasa, EC 1.9.3.1.

Para medir la actividad de la citocromo oxidasa (complejo IV) nos basamos en la oxidación del citocromo C reducido.

Se incubaba 1 ml de tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7,0 con n-dodecil- β -D-maltosido 0.45 mM y citocromo C reducido a una concentración final de 15 μM a 25°C durante 1 minuto. Se adicionan 25 μl de la muestra de mitocondrias a una concentración de proteína de 0,6 mg/ml para iniciar la reacción de la citocromo oxidasa y espectrofotométricamente se mide la disminución de esta

actividad a una $\lambda=550$ nm durante un minuto (coeficiente de extinción $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Santos et al. 2002).

Para obtener el citocromo C reducido, se disuelve citocromo C oxidado en H_2O y con ditionito sódico en exceso. Se pasa por una columna PD-10-Sephadex G25 M (Farmacia-LKB), con lo que se consigue esta sustancia (Trounce et al., 1996).

2.2.7.9.- Determinación de malondialdehido + 4-hidroxinonenal (MDA+ 4HNE) en hígado y corazón de rata.

Para la determinación del malondialdehido + 4-hidroxinonenal se utilizó el kit de OXIS, BIOTECH HAE-586 ASSAY (OXIS Health Products, Inc. 6040 N Cutter Circle, Suite 317 Portland, OR 97217-3935 U.S.A.).

La oxidación de los ácidos grasos da lugar a la formación de peróxidos lipídicos, como malondialdehido (MDA) y alkanales. El método HAE-586 esta basado en la reacción del cromógeno N-metil-2-fenilindol (NMPI) con el MDA y 4-hidroxinonenal (HAE) a 45°C . Una molécula de 4-hidroxinonenal reacciona con dos moléculas de NMPI y da como producto una molécula estable. Medimos la absorbancia a 586 nm.

2.2.7.10.- Determinación de los niveles de la coenzima Q₁₀ y Q₉, y vitamina E en mitocondrias de hígado y corazón de rata.

Para la extracción de la coenzima Q₁₀ y Q₉ y Vitamina E se siguió la técnica de Takada, et al. 1984 y Lass et al. 1999 con ligeras modificaciones para determinar la vitamina E. La concentración de mitocondrias utilizada fue de 1 mg de proteína/mL del tampón de aislamiento de mitocondrias (tampon 1). Añadimos 2 ml de etanol : hexano 2/5 v/v, sonicamos durante 2 minutos y centrifugamos a 3000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se recoge la fase hexano y se introduce en un tubo de cristal. Al resto se le vuelve a añadir 2 ml de etanol : hexano, repitiendo de nuevo el proceso dos veces. El sobrenadante hexano se evapora con N₂ líquido. Finalmente el residuo se resuspendió en 200 µl de etanol. El contenido de coenzima Q₉, Q₁₀ y de la vitamina E se determinó por HPLC equipado con una bomba 422, detector UV-V 430 e inyector automático 360 de Kontron Instruments. Se utilizaron dos columnas continuas, una de 15 y la otra de 25 cm x 0.46 mm (Spherisorb y Kromasil respectivamente, RP18, 5 µm). La fase móvil se preparó disolviendo 7.0 g de NaClO₄ H₂O en 1000 ml de etanol: metanol: 70 % HClO₄ (700:300:1). La velocidad de flujo fue de 1,2 ml/minuto. La detección se realizó a dos longitudes de onda, para la Q₉ y Q₁₀ $\lambda = 275$ nm y para la vitamina E $\lambda = 293$ nm

2.2.7.11.- Extracción del ADN de tejidos.

Partimos de 0,1-0,3 g de tejido en 4 ml de tampón de extracción (Tris/CIH 10 mM a pH: 7,5, NaCl 37,5 mM y EDTA 0,5 mM a pH: 8), homogeneizamos y añadimos proteinasa K 0,2 mg/ml y SDS 16 % a una concentración final de 0,5 %, calentamos a 55 °C durante 3h. Transcurrido el tiempo de incubación, agregamos 1 volumen de una mezcla de cloroformo:isoamilalcohol 24/1 v/v, agitamos y vertimos a un tubo de gel (vacutainer SST, ref: 368510) y centrifugamos. Esta etapa se repite tres veces hasta que la muestra esté totalmente limpia. Decantamos a un tubo estéril y precipitamos el DNA, añadiendo NaCl 4 M a una concentración final de 0,2 M y 1 volumen de etanol al 100%. Finalmente se lava el DNA con etanol al 70% en frío. Se resuspende con tampón TE para guardar o en tampón TRIS/CIH 10 mM pH: 7,0 para realizar de inmediato la digestión (Gupta, 1984; Thomas et al., 1987).

2.2.7.12.- Hidrólisis enzimática del ADN de tejidos.

La digestión del DNA se realiza siguiendo el método descrito por Floyd et al en 1988 con ligeras modificaciones (Muñiz et al., 1995). Se diluyen 400 µg de ADN en tampón Tris/HCl 10 mM pH: 7,0 hasta un volumen de 100 µL. Se añaden 200 unidades de ADNasa I y posteriormente se incuba a 37° C durante 1 hora. Se añade 10 µl CH₃-COO⁻Na⁺ 0'5 M a pH: 5,1 y 6 µl de nucleasa P1, y nuevamente se incuba a 37° C durante 1 hora. Finalmente se agrega Tris/CIH a pH: 7,0 para que el volumen final sea 200 µL y 6 unidades de fosfatasa alcalina, e incubamos a 37° C durante 1 hora.

2.2.7.13.- Detección de la 8-hidroxideoxiguanosina en el ADN de hígado y de corazón.

Para la determinación de la 8-hidroxideoxiguanosina (8-oxo-dGuo) se utilizó el kit de la 8-oxo-dGuo-EIA-BIOTECH (OXIS Health Products, Inc. 6040 N Cutter Circle, Suite 317 Portland, OR 97217-3935 U.S.A.), tal como sigue: a una placa en la cual está fijada la 8-oxo-dGuo se añadió el anticuerpo monoclonal de 8-oxo-dGuo y la muestra o estándar. La 8-oxo-dGuo en la muestra o estándar compite con el 8-oxo-dGuo unido a la placa por los sitios de unión del anticuerpo monoclonal de 8-oxo-dGuo. Los anticuerpos que se han unido a la 8-oxo-dGuo de la muestra son lavados, mientras que aquellos que se han unido a la 8-oxo-dGuo de la placa permanecen. Posteriormente, añadimos el anticuerpo secundario marcado con el enzima, el cual se une al anticuerpo monoclonal que permanece en la placa. El anticuerpo secundario marcado con enzima que no se ha unido se elimina mediante un proceso de lavado. Finalmente se le añade un cromógeno, y la intensidad de coloración es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la placa.

2.2.7.14.- Determinación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se ha llevado a cabo mediante la técnica de Markwell et al (1978). Es una modificación de la técnica de Lowry et al (1951). Se basa en la formación de un compuesto coloreado al interaccionar el reactivo de Folin-Ciocalteu con los grupos fenólicos e indólicos

de los aas integrantes de las proteínas cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 600 nm.

La determinación de la cantidad de proteínas de las muestras se obtiene por interpolación sobre una recta patrón con concentraciones de BSA de 0-100 $\mu\text{g/mL}$ una vez conocida la absorbancia.

2.2.8. Análisis estadístico.

Aplicamos distintos tratamientos estadísticos a partir de los datos obtenidos en las diversas repeticiones enunciadas en los respectivos apartados. Con el fin de obtener la mayor información posible, y para su mejor interpretación, se llevaron a cabo análisis comparativos ANOVA y LSD, t de S'tudent, para determinar diferencias significativas entre grupos, y se recurrió al análisis de correlación lineal simple para estudiar las relaciones entre variables. Empleamos el programa Statgraphics Plus para Windows (Manugistics Inc, 1997).

3.- RESULTADOS.

3.- RESULTADOS.

3.1.- ENSAYOS “IN VITRO” CON HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.

Previamente a los estudios “in vitro” con hepatocitos aislados de rata, hemos determinado la fracción de la cerveza, tanto rubia como negra, que es rica en compuestos fenólicos y su actividad antioxidante global. Para ello se estudiaron tres fracciones y se observó la actividad antioxidante de las tres.

3.1.1.- Fraccionamiento y actividad antioxidante de la cerveza.

Tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos, las cervezas fueron sometidas a un fraccionamiento con el fin de poder evaluar que tipo de componentes eran los más asociados a la actividad antioxidante global de las cervezas (AAO).

Las distintas fracciones de cerveza analizadas presentaban la siguiente distribución de compuestos fenólicos.

Fracción 1: contiene esencialmente ácido gálico, que al no ser retenido por la resina coeluye con todas las sustancias solubles en agua, como pueden ser ácidos, aminoácidos, azúcares, dextrinas, péptidos, vitaminas, etc.

Fracción 2: contienen esencialmente los compuestos fenólicos del grupo de bajo peso molecular, es decir, ácidos benzoicos y cinámicos, y derivados de los

mismos, en su caso. Se han detectado en ella los ácidos ferúlico, siríngico, p-cumárico y vainillíco, y ocasionalmente el ácido p-hidroxibenzoico.

Fracción 3: contiene los derivados flavan-3ol, monómeros y oligómeros de hasta al menos cuatro unidades. Se han detectado en ella, independientemente del tipo de cerveza, siempre catequina y epicatequina, dímeros a niveles traza y algún trímero.

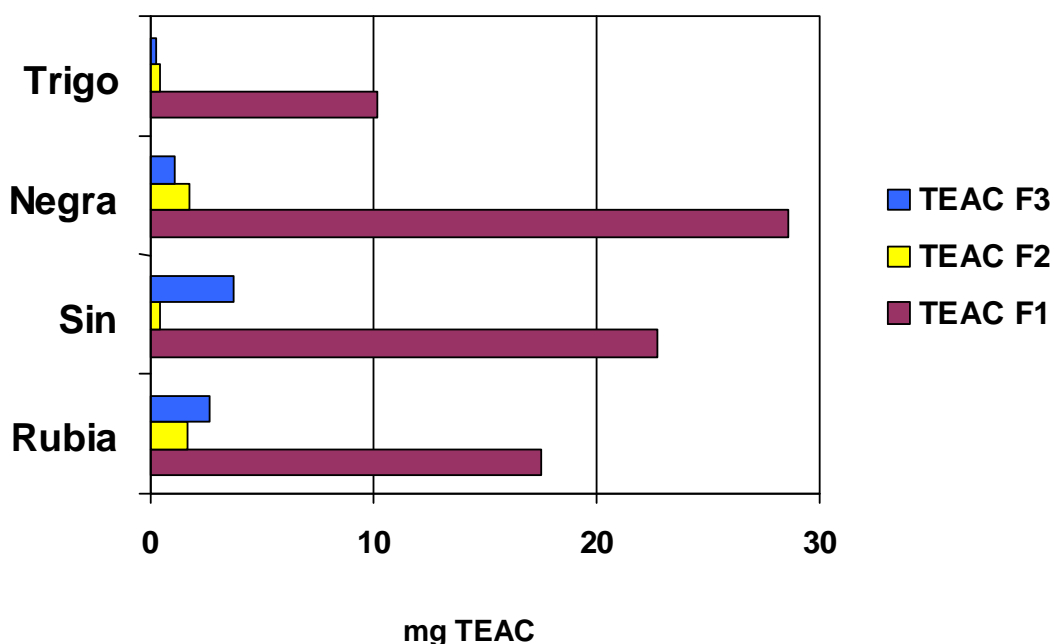
Los resultados obtenidos relativos a la actividad antioxidante global (AAO) de las fracciones por grupos se muestran de forma resumida en las gráficas de la figura 26 donde se han representado los valores medios. Dado que el grupo de cervezas especiales presentaba valores muy dispares entre muestras, se optó por desestimarlas. Las cervezas de frutas no fueron fraccionadas, ya que una separación correcta de sus constituyentes fenólicos hubiera implicado aplicar un protocolo distinto con el fin de separar los antocianos presentes tan solo en ellas. La cerveza ecológica se integró, por sus características, en el grupo de las cervezas rubias, y se dejaron por separado las cervezas de trigo.

En general, la fracción que presentó mayores valores de AAO es la F1, en la que se encuentran compuestos solubles en agua, de relativo peso molecular. Le sigue la F3, siendo la F2 la que menos AAO presenta.

Respecto a la variabilidad intragrupo, como en el resto de parámetros expuestos, se observaron grandes diferencias entre cervezas del mismo tipo, de tal forma que actividades similares se encontraban tanto en cervezas rubias

como negras ó sin. Es decir, no se puede establecer que un determinado tipo de cerveza, presente mayor o menor actividad antioxidante en alguna de sus fracciones. De hecho, el análisis de la varianza no detectó efecto factor “tipo de cerveza” y el test LSD no detectó diferencias dos a dos y entre ambos.

Figura 25.- Actividad antioxidante de las fracciones por grupos de cervezas, expresadas como TEAC.

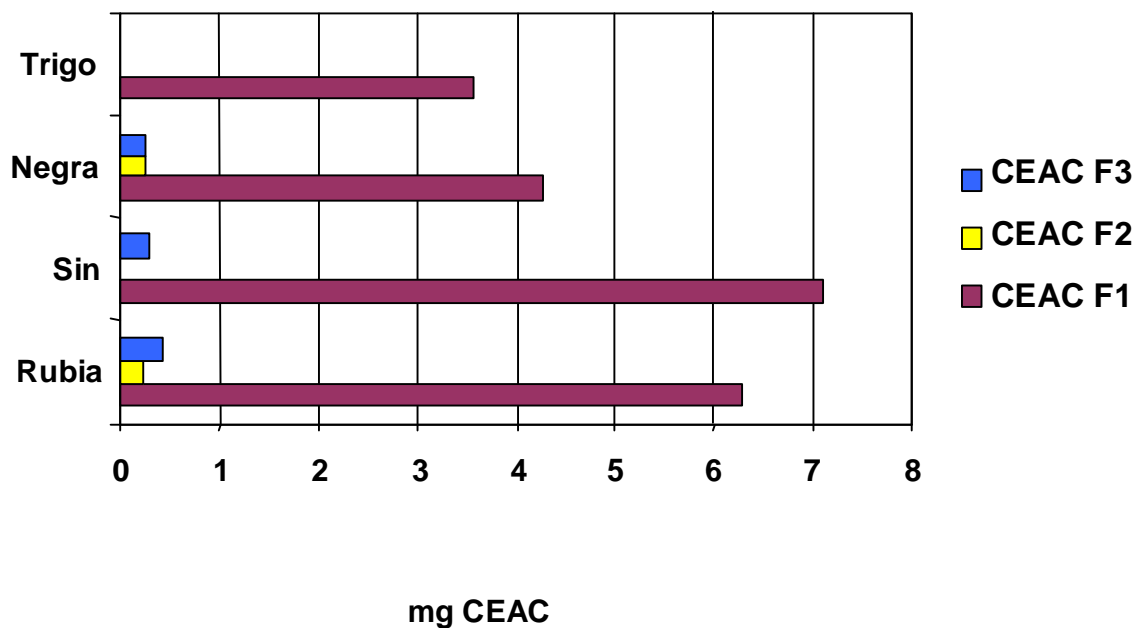


Resalta el hecho de que si se comparan las AAOs de las fracciones con las evaluadas en las cervezas de origen, las primeras presentan valores notablemente inferiores, llegando a explicar en el mejor de los casos entorno al 65% de AAO de las cervezas globalmente (Figura 26).

Esto indica que una parte importante de la AAO de las cervezas está asociada a compuestos de naturaleza polimérica que quedan retenidos en la columna de separación. Estos resultados están de acuerdo con datos publicados anteriormente sobre la retención de polímeros de alto peso

molecular en las resinas del tipo de la usada en este trabajo (Keramat y Nursten, 1994).

Figura 26.- Actividad antioxidante de las fracciones por grupos de cervezas, expresadas como CEAC.



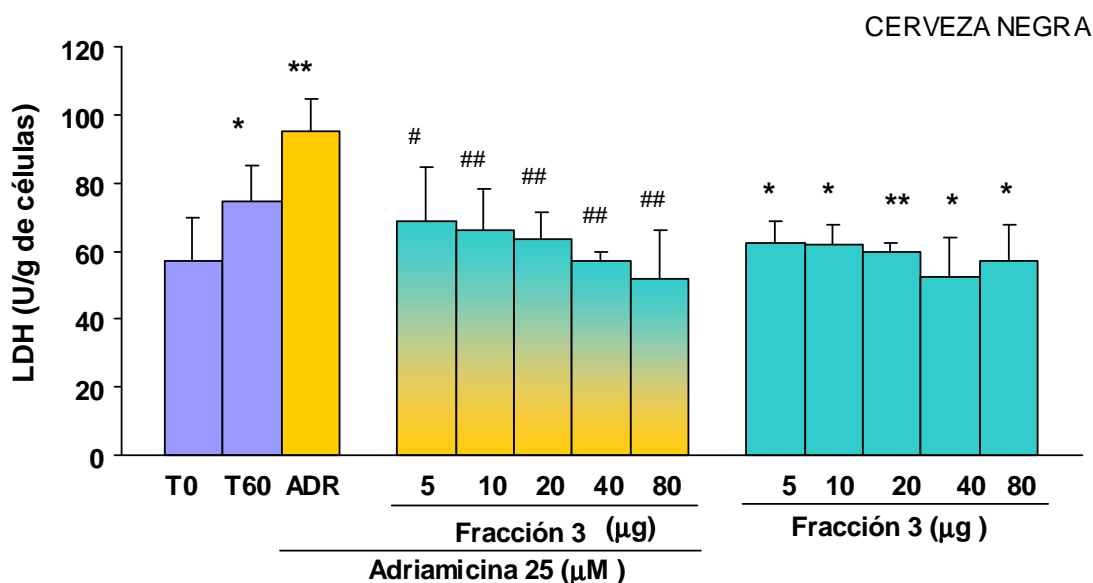
Después de observar los datos obtenidos, se decidió que la fracción 3 sería la fracción que se probaría en los ensayos “in vitro”, ya que aunque presenta una actividad antioxidante global menor que la fracción 1, contiene los derivados flavan-3ol, monómeros y oligómeros de hasta al menos cuatro unidades, alguno de los cuales había sido estudiado de forma aislada por nuestro grupo (Valls-Bellés et al., 2001). Vistos estos resultados pasamos a realizar los ensayos “in vitro” con las dos cervezas de mayor consumo (rubia y negra).

3.1.2. Viabilidad celular: actividad lactato deshidrogenada EC: 1.1.1.27.

La lactato deshidrogenada (LDH) liberada al medio extracelular se incrementa al producirse la incubación de los hepatocitos en un medio hiperóxico (68 ± 11 U/g de células a T60 frente a 57 ± 12 U/g de células a T0, $p < 0,05$), lo que indica una disminución de la viabilidad celular en esta situación. Al añadir la fracción polifenólica (F3) no se observa efecto a bajas concentraciones (5 y 10 μg) en ambos tipos de cerveza, en cambio, sí que se produce efecto protector a partir de 20 μg , únicamente en la cerveza rubia, disminuyendo la LDH (57 ± 5 U/g de células, $p < 0,005$), y a partir de 40 mg en ambos tipos de cerveza (52 ± 14 U/g de células en la cerveza negra y 55 ± 4 U/g de células en la cerveza rubia, $p < 0,005$). (Figuras 27 y 28)

Al añadir al medio de incubación adrimicina (ADR) disminuye de forma importante la viabilidad celular, como se ve contrarrestado por la fracción 3 de ambos tipos de cerveza ya desde concentraciones pequeñas ($p < 0,005$) (Figuras 27 y 28). Se puede observar como, efectivamente, cuando en el medio de incubación están presentes los extractos de cerveza, tanto negra como rubia, los valores obtenidos son iguales o inferiores al control T60. Estos resultados que ponen de manifiesto el papel protector que ejercen dichos extractos.

Figura 27.- Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extracto de cerveza negra.

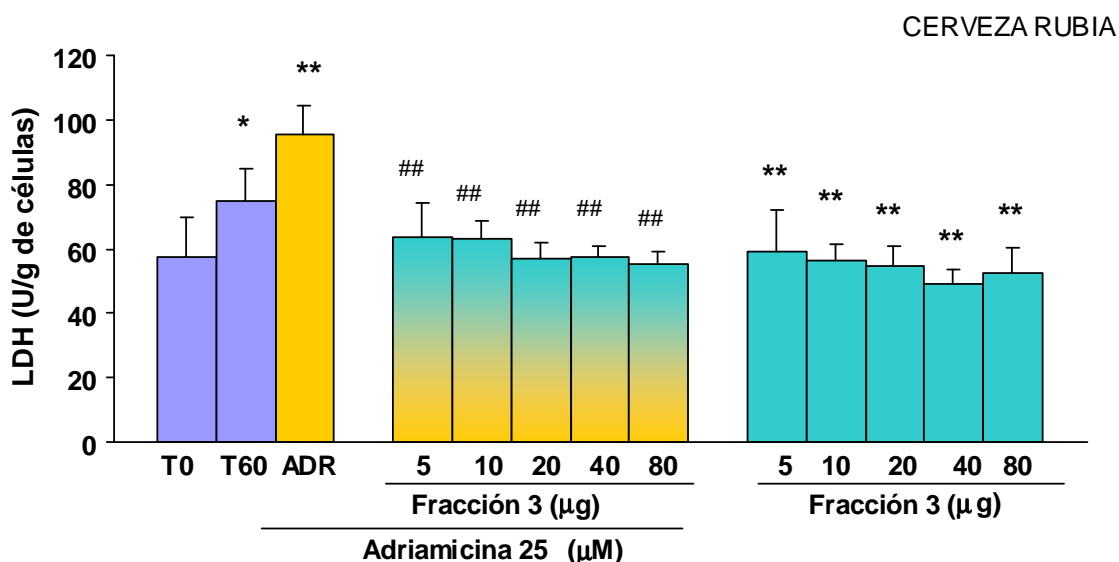


Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media ± SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

**P<0,005 y *P<0,05 – Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

P<0,005 y # P<0,5 – Comparando ADR 25 µM más diferentes concentraciones de F3.

Figura 28.- Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extracto de cerveza rubia.



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media ± SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

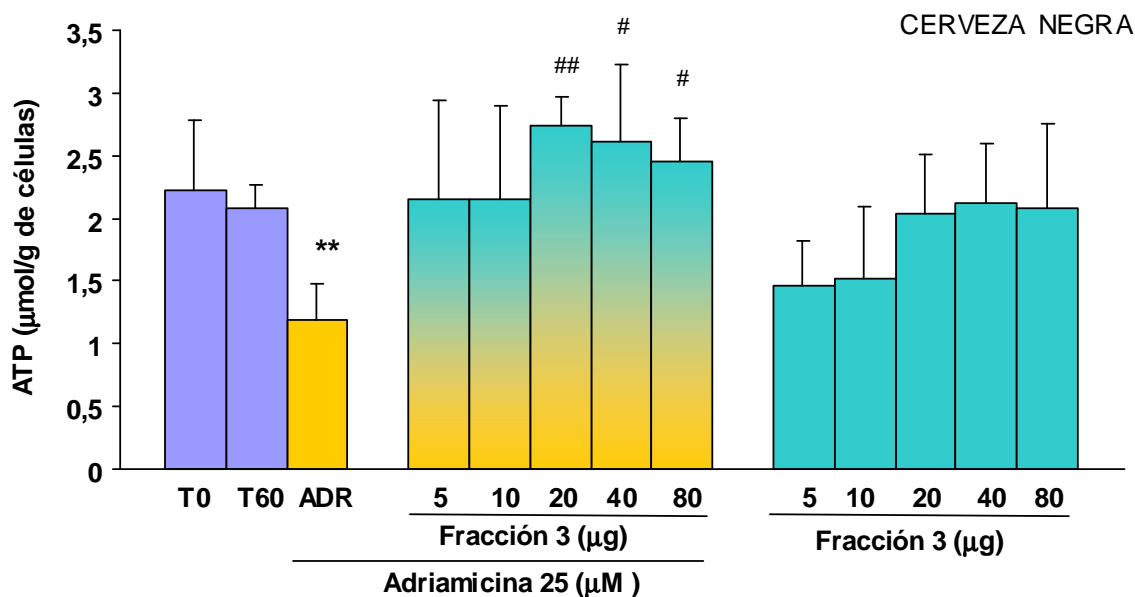
** P<0,005 y *P<0,05- Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25 µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

##P< 0,005 y #P<0,5- Comparando ADR 25 µM más diferentes concentraciones de F3.

3.1.3.- Niveles de adenosin trifosfato (ATP).

La formación de adenosin trifosfato (ATP) producido por la cadena respiratoria celular disminuye tras la incubación y en medio hiperóxico, todavía más tras la adición de adriamicina ($1,89 \pm 0,61 \mu\text{mol/g}$ de células en T0, $1,56 \pm 0,59 \mu\text{mol/g}$ de células a T60 de incubación, y $1,24 \pm 0,45$ tras añadir $25 \mu\text{M}$ de adriamicina, $p < 0,005$), (Figuras 29 y 30).

Figura 29.- Determinación del adenosin trifosfato (ATP) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

** $P < 0,005$ - Comparando T0 a T60 respecto a ADR $25 \mu\text{M}$ y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

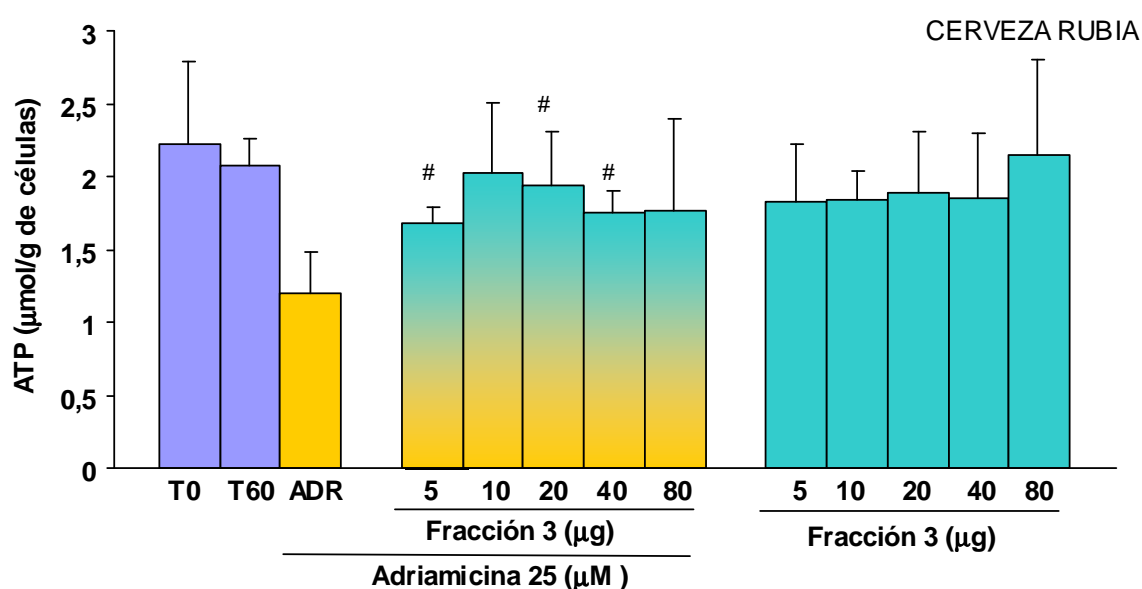
$P < 0,005$ y # $P < 0,5$ - Comparando ADR $25 \mu\text{M}$ más diferentes concentraciones de F3.

Esta concentración de ATP se incrementa cuando en el medio de incubación está presente la fracción 3 del extracto de cerveza tanto negra como rubia, si bien no de forma significativa, probablemente por la gran dispersión de los resultados. Sin embargo, sí se observa una significación

RESULTADOS

estadística al contrarrestar el efecto de la adriamicina por parte de la cerveza negra, ya que los extractos a partir de 10 μg incrementan el contenido de ATP de forma significativa ($1,96 \pm 0,35 \mu\text{mol/g}$ de células, $p < 0,005$). Esta situación se mantiene en concentraciones superiores del extracto si bien la significancia es menor, $p < 0,05$, por la dispersión de los resultados. También con una significancia menor el contenido de ATP aumenta al añadir cerveza rubia, pero solamente en algunas concentraciones.

Figura 30.- Determinación del adenosín trifosfato (ATP) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza rubia.



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

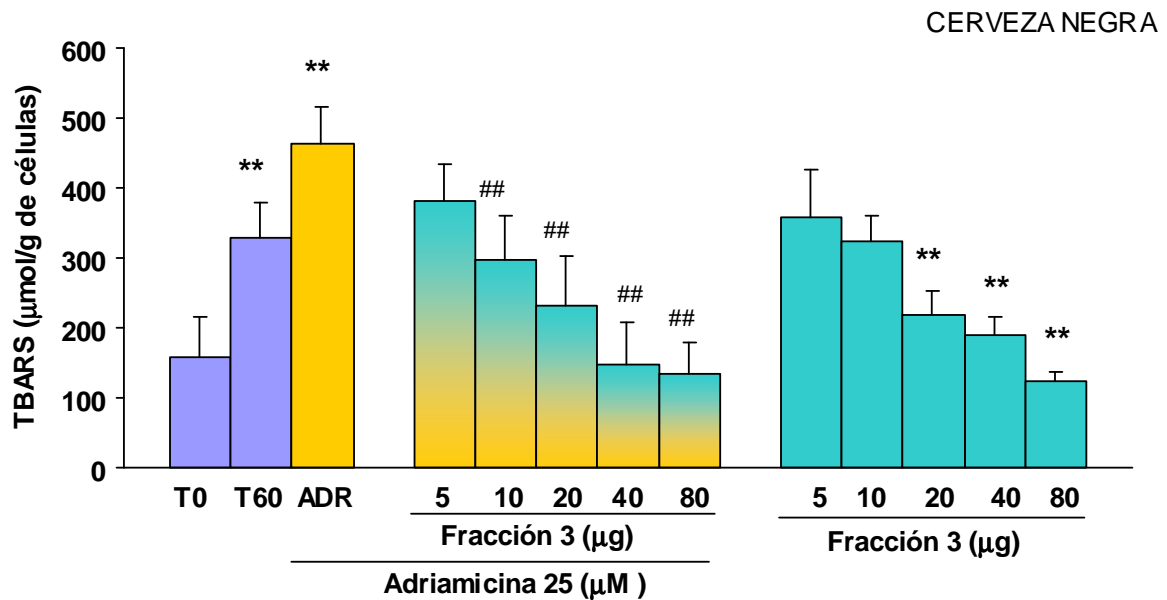
$P < 0,5$ - Comparando ADR 25 μM más diferentes concentraciones de F3.

3.1.4.- Daño a macromoléculas.

3.1.4.1.- Daño a lípidos. Peroxidación lipídica.

La incubación de los hepatocitos en presencia de O₂/CO₂, (95/5, v/v), provocó un incremento en la peroxidación lipídica, como lo demuestra el aumento de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), de 157,16 ± 59,06 a 312,27 ± 73,36 μmol/g de células, con una significación de p<0,005 (Figuras 31 y 32). Al adicionar la fracción 3 de la cerveza, tanto rubia como negra, no se encuentra un efecto protector a concentraciones bajas (5 y 10 μg). Sin embargo, a la concentración de 20 μg, ya se produce una protección significativa, disminuyendo la cantidad de TBARS con respecto a la incubación sin adicionar (232,68 ± 68,66 en la cerveza negra y 226,69 ± 31,68 en la cerveza rubia p< 0,05). Esta situación se ve aún más favorecida cuando se incrementa el extracto a 40 u 80 μg en ambos tipos cerveza (148,12 ± 60,83 y 134,35 ± 45,18 μmol/g de células, en la cerveza negra y 143,79 ± 5,46 y 157,41 ± 45,98 μmol/g de células, en la cerveza rubia respectivamente, p<0,005).

Figura 31.- Determinación de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.



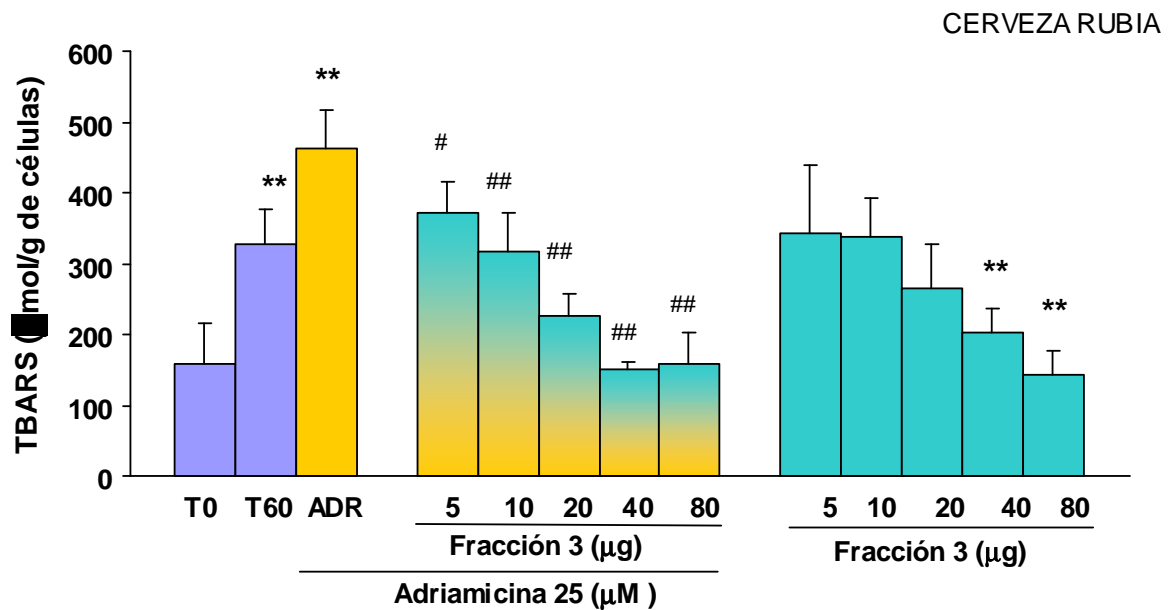
Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

** P<0,005 - Comparando T0 a T60 respecto a ADR 25 µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

P< 0,005 - Comparando ADR 25 µM más diferentes concentraciones de F3.

Al añadir ADR, antibiótico de gran poder oxidante, se produce un aumento de la peroxidación lipídica ($463,7 \pm 60,44$ µmol/ g de células, $p<0,005$) en los hepatocitos incubados. Este estrés oxidativo se ve contrarrestado por la adición de la fracción polifenólica de la cerveza, ya evidente desde concentraciones pequeñas (5 µg) en ambos tipos de cerveza ($356,67 \pm 70,14$ µmol/g de células en la cerveza negra, y $343,35 \pm 94,73$ µmol/g de células en la cerveza rubia, $p<0,05$), pero que alcanza mayor significación a medida que se eleva la concentración de la fracción polifenólica añadida (80 µg), ($124,15 \pm 13,52$ en la cerveza negra y $142,94 \pm 34,43$, en la cerveza rubia, $p<0,005$).

Figura 32.- Determinación de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza rubia.



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

** P<0,005 - Comparando T0 a T60 respecto a ADR 25 μ M y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

P< 0,005 - Comparando ADR 25 μ M más diferentes concentraciones de F3.

La disminución de los TBARS es dosis dependiente en ambos tipos de cerveza, lo que indica que a medida que aumenta la concentración del extracto en el medio de incubación los niveles de TBARS son inferiores, alcanzando incluso valores igual a T0 (células que no han sido incubadas). Por tanto, se puede afirmar que los compuestos presentes en dichos extractos están ejerciendo un efecto protector ante el daño inducido por la adriamicina.

3.1.4.2.- Daño a proteínas. Contenido en grupos carbonilo.

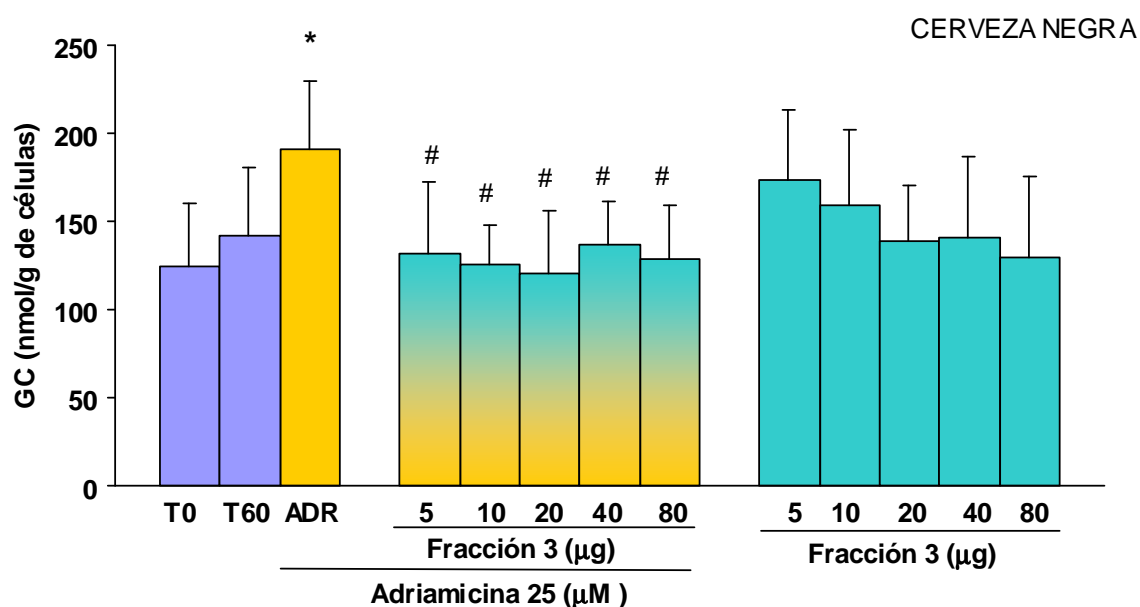
La medición de los grupos carbonilo como daño oxidativo a proteínas nos demuestra que no existe una lesión tras incubar las células hepáticas con

RESULTADOS

extracto, ya que no se modifican los niveles. Sin embargo, al añadir adriamicina sí que se produce un incremento de los mismos, indicativo de lesión proteica ($180,41 \pm 40,85$ nmol/g de células, frente a $146,15 \pm 50,12$ nmol/g de células a T60) (Figuras 33 y 34).

Al adicionar a los extractos de cerveza al medio dónde está presente la adriamicina se puede observar un efecto protector frente a esta lesión, ya que disminuye la concentración de estos grupos carbonilo, quedando al mismo nivel previo a la adición de la adriamicina ($140,78 \pm 15,01$ nmol/g de células a los 40 μ g de cerveza negra, y $125,1 \pm 18,93$, y $121,63 \pm 29,09$ a los 40 μ g y 80 μ g respectivamente de la cerveza rubia).

Figura 33.- Determinación de los grupos carbonilo de las proteínas en los hepatocitos aislados de rata incubados con extracto de cerveza negra.

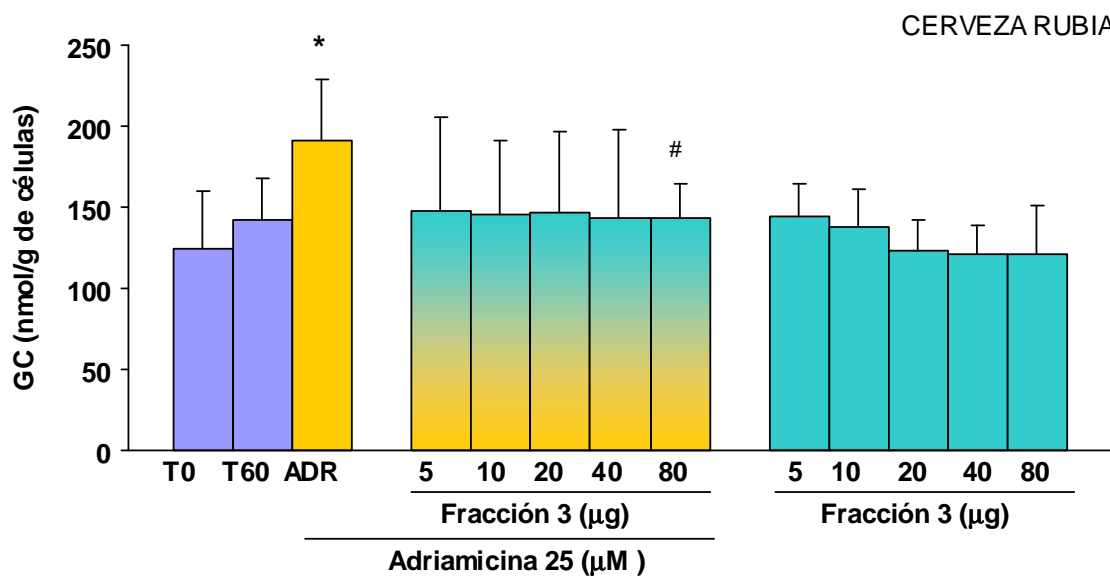


Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t'Student.

* $P < 0,05$ - Comparando T0 a T60 respecto a ADR 25 μ M y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

$P < 0,5$ - Comparando ADR 25 μ M más diferentes concentraciones de F3.

Figura 34.- Determinación de los grupos carbonilo de las proteínas en los hepatocitos aislados de rata incubados con extracto de cerveza rubia.



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

*P<0,05- Comparando T0 a T60 respecto a ADR 25 μ M y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

#P<0,5- Comparando ADR 25 μ M más diferentes concentraciones de F3.

3.1.5.- Reserva de la capacidad antioxidante: niveles de glutatión

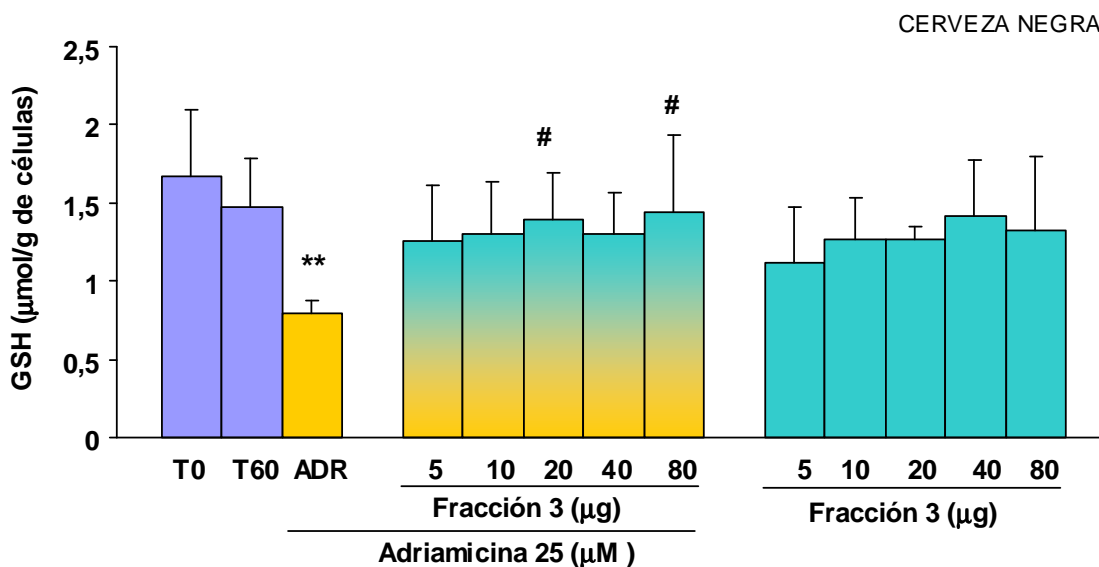
reducido.

La cuantificación del Glutatión reducido celular nos indica la reserva de la capacidad antioxidante. Esta capacidad antioxidativa celular lógicamente se ve disminuida tras la incubación de los hepatocitos en una medio hiperóxico ($1,39 \pm 0,37 \mu\text{mol} / \text{g}$ de células a los 60 minutos, frente a $1,68 \pm 0,32 \mu\text{mol} / \text{g}$ de células en el momento inicial), situación que se ve aún más comprometida al añadir otro factor prooxidante, la adriamicina ($1,12 \pm 0,35 \mu\text{mol} / \text{g}$ de células, $p<0,05$) frente a la situación basal.

RESULTADOS

Al añadir los extractos de cerveza no encontramos un factor protector, en el sentido de que no se incrementa el GSH al aportar las diferentes concentraciones de la fracción polifenólica de la cerveza rubia o negra (Figuras 35 y 36). Sin embargo, la cerveza rubia, parece que tiene un cierto efecto protector frente a la capacidad oxidativa de la adriamicina, por cuanto el contenido de GSH aumenta al añadir 10 μg ($1,47 \pm 0,26 \text{ nmol / g}$ de células) o 20 μg ($1,49 \pm 0,35 \mu\text{mol / g}$ de células, $p < 0,05$), de la fracción 3 a los hepatocitos adicionados con adriamicina. A concentraciones superiores no se detectó significación estadística.

Figura 35.- Determinación del nivel de glutation (GSH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.

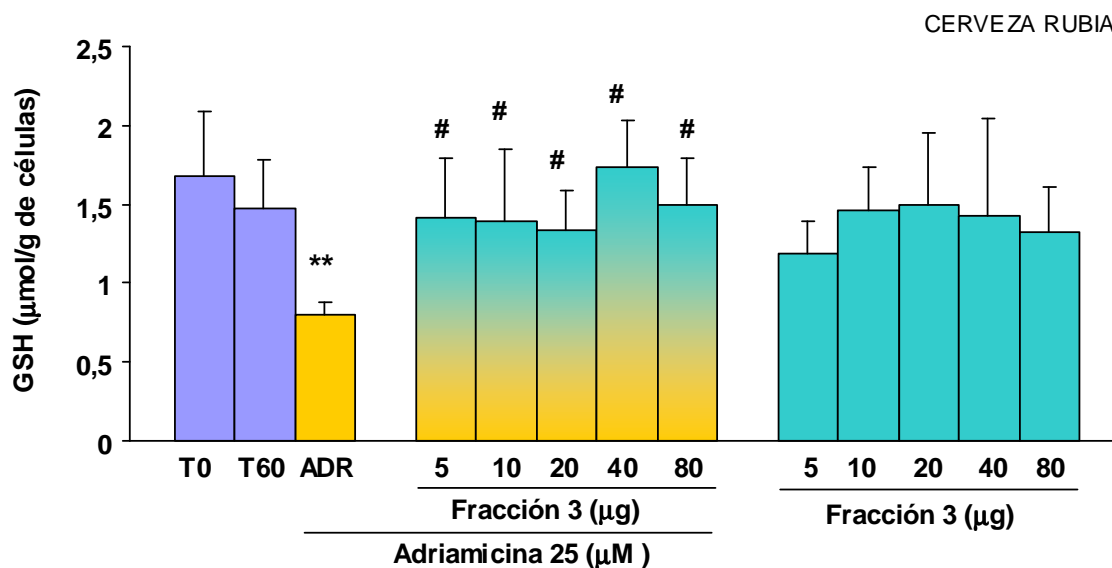


Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

** $P < 0,005$ - Comparando T0 a T60 respecto a ADR 25 μM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

$P < 0,5$ - Comparando ADR 25 μM más diferentes concentraciones de F3.

Figura 36.- Determinación del nivel de glutatión (GSH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza rubia.



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4 mL. Los resultados son media \pm SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

** P<0,005 - Comparando T0 a T60 respecto a ADR 25 μ M y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

P<0,5- Comparando ADR 25 μ M más diferentes concentraciones de F3.

3.2.- ESTUDIOS “IN VIVO” EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Antes de llevar a cabo el estudio “in vivo”, y además de manera similar al estudio “in vitro”, hemos realizado ensayos químicos con la cerveza con alcohol y sin alcohol concentrada, respecto a su composición, en cuanto a componentes fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante.

3.2.1.- Niveles de polifenoles totales, proacianidinas, catequinas, melanoidinas y actividad antioxidante de la cerveza concentrada.

La tabla 3 muestra los valores medios, por grupos, de los resultados obtenidos en un estudio cuantitativo de los diferentes parámetros evaluados en

RESULTADOS

las cervezas estudiadas. El ANOVA mostró el efecto factor “tipo de cerveza” para todos los parámetros evaluados. Los resultados del test de LSD muestran que la cerveza con alcohol es significativamente más rica en compuestos fenólicos. Asimismo la cerveza con alcohol presenta niveles significativamente superiores de Actividad antioxidante total (AAO) medido por el test DMPD respecto a la sin alcohol. Los niveles de procianidinas, catequinas y melanoidinas fueron similares en ambos tipos de cerveza.

Tabla 3.- Actividad antioxidante y niveles de polifenoles totales, procianidinas, catequinas y melanoidinas de la cerveza concentrada

	DMPD (mg/mL)	PPT (mg/mL)	PRO (mg/mL)	CAT (mg/mL)	MELANOIDINAS (mg/mL)
Con alcohol	1,49 ± 0,1 ^b	2892 ± 133 ^b	1936 ± 22,8 ^a	393 ± 17,2 ^a	6,11 ± 2,4 ^a
Sin alcohol	0,87 ± 0,03 ^a	2257 ± 138 ^a	1749 ± 4,0 ^a	337 ± 12,2 ^a	5,77 ± 1,2 ^a

Los resultados se expresan en media ± SD de 6 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de ANOVA. Valores con diferente letra son significativos ($P < 0,05$).

Se observa una correlación positiva entre actividad antioxidante y niveles de polifenoles totales ($R=0,6096$; $p < 0,05$), y procianidinas ($R=0,6476$; $p < 0,05$). Sin embargo no se observa ninguna correlación entre actividad antioxidante y niveles de catequinas y de melanoidinas.

La capacidad antioxidante total, que determina la inhibición de radicales libres, depende del contenido de polifenoles presentes en la cerveza, siendo éste superior en la cerveza con alcohol. Sin embargo, los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en esta bebida, las proantocianidinas y las catequinas, no difieren entre ambas. Analizamos también otros compuestos, originados en la reacción del malteado, entre los grupos amino de las proteínas

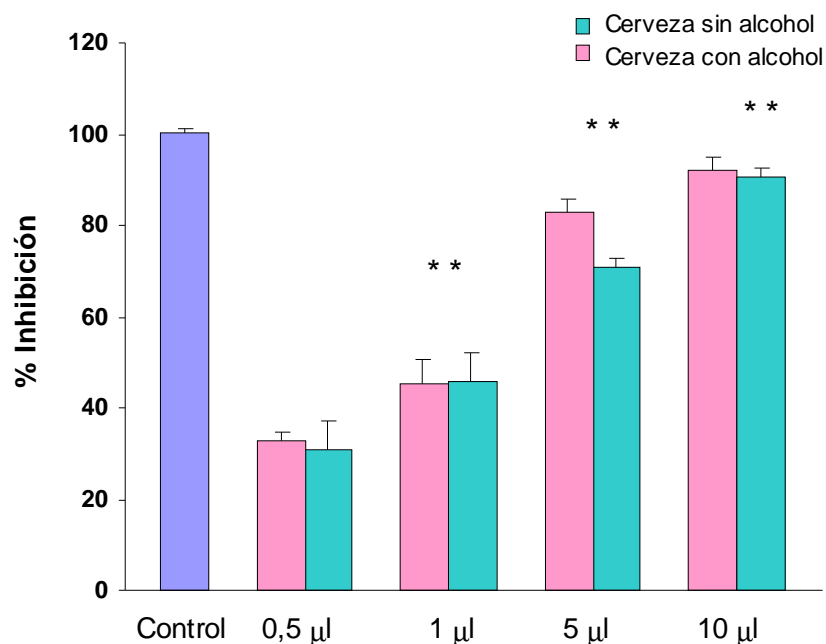
y los aldehídos de los azúcares, las melanoidinas, pigmentos de color pardo, responsables en gran parte del color de esta bebida. Estos compuestos presentan asimismo actividad antioxidante, como hemos demostrado previamente (Valls-Bellés et al., 2004), pero tampoco su contenido es diferente entre los dos tipos de cerveza estudiados. Por lo tanto existen otros compuestos en la cerveza con alcohol responsables de su mayor capacidad antioxidante.

3.3.2.- Radical superóxido.

Dentro de la actividad antioxidante valoramos específicamente la actividad del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Éste es un radical oxigénico que se produce en situaciones fisiológicas como producto de la acción catalítica de las oxidasas, o a consecuencia del flujo de electrones de la cadena transportadora. Es una especie de baja reactividad y mucha especificidad, que puede convertirse en especies altamente reactivas y poco específicas, como el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), tras su dismutación a H_2O_2 y reacción con metales de transición como el hierro (Fe^{+2}) o el cobre (Cu^+).

La actividad “scavenger” del radical superóxido se midió en la cerveza con o sin alcohol seleccionadas a diferentes concentraciones. Esta actividad era dependiente de la concentración (Figura 36) ya que la inhibición del radical superóxido llega a ser del 65-75% cuando la concentración de cerveza se incrementa 10 veces. No encontramos diferencias significativas entre los dos tipos de cerveza.

Figura 37.- Determinación del radical superóxido.



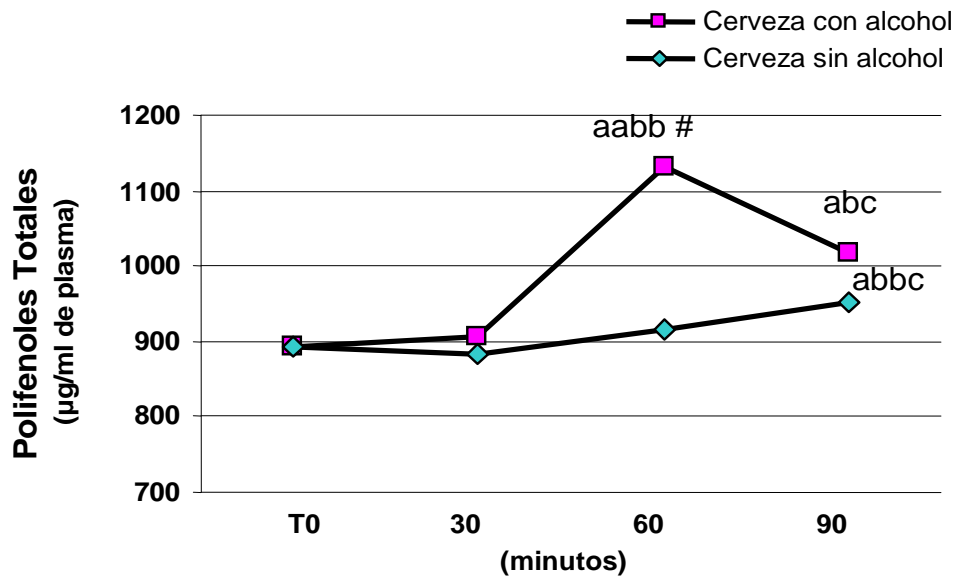
Los resultados están expresados en media \pm SD de 6 experimentos diferentes. Para la estadística se usó la ANOVA siendo $**P < 0'0001$ respecto al volumen. No existen diferencias significativas entre ambos tipos de cerveza.

Estas pruebas se han realizado en el Departamento de Biotecnología y Ciencias de los Alimentos en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos.

3.2.3.- Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en ratas.

En primer lugar evaluamos los niveles de polifenoles totales en el plasma de la rata tras la admisnistración de una suplementación de cerveza junto a su dieta habitual (Figura 38).

Figura 38.- Niveles de polifenoles totales en plasma a diferentes tiempos, tras la suplementación en la dieta con cerveza.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t'Student.

^aP<0,05 y ^{aa}P<0,005 - Comparando T0 respecto a los tiempos 30,60,90 minutos tras la suplementación.

^aP<0,05 y ^{bb}P<0,005 -Comparando 30 minutos respecto a 60 y 90 minutos.

^cP<0,05 y ^{cc}P<0,005 - Comparando 60 minutos respecto a 90 minutos.

[#]P<0,05 y ^{##}P<0,005 - Comparando cerveza con alcohol respecto a cerveza sin alcohol.

Valoramos en primer lugar, la absorción de los polifenoles contenidos en el concentrado de cerveza administrado como suplemento dietario. Tanto en el caso de la cerveza con alcohol, como de la sin alcohol, encontramos una diferencia significativa a los 90 minutos de la administración (T90), comparando con la situación basal (T0) y a los 30 minutos postingesta (T30), en el sentido de que existía un incremento en las cifras de polifenoles plasmáticos a los 90 minutos. Estos resultados indican la eficacia de la absorción de los compuestos fenólicos presentes en el concentrado de cerveza añadido a la dieta. En el caso de la cerveza con alcohol, además, observamos un aumento mayor en los niveles de polifenoles plasmáticos a los 60 minutos, situación que no ocurría cuando se administraba cerveza sin alcohol. Ello puede obedecer a una

facilitación en la absorción de la fracción polifenólica, debida al contenido alcohólico. Sin embargo, esto, no influye en el resultado final, puesto que, a los 90 minutos, ambos tipos de cerveza alcanzan valores muy similares, y significativos con los tiempos iniciales ($P < 0,05$, Figura 38).

El mecanismo de absorción de los flavonoides no está completamente dilucidado. Parece que hay difusión pasiva a nivel intestinal, sin embargo, estos compuestos está presentes en los alimentos mayoritariamente en su forma glicosilada. Una vez unida la fracción glicosídica a la pared intestinal, se incrementa la hidrofiliidad de la molécula, con lo que la difusión pasiva se dificulta. Esto conduciría a la hipótesis de que tendrían que ser absorbidos mediante transporte activo.

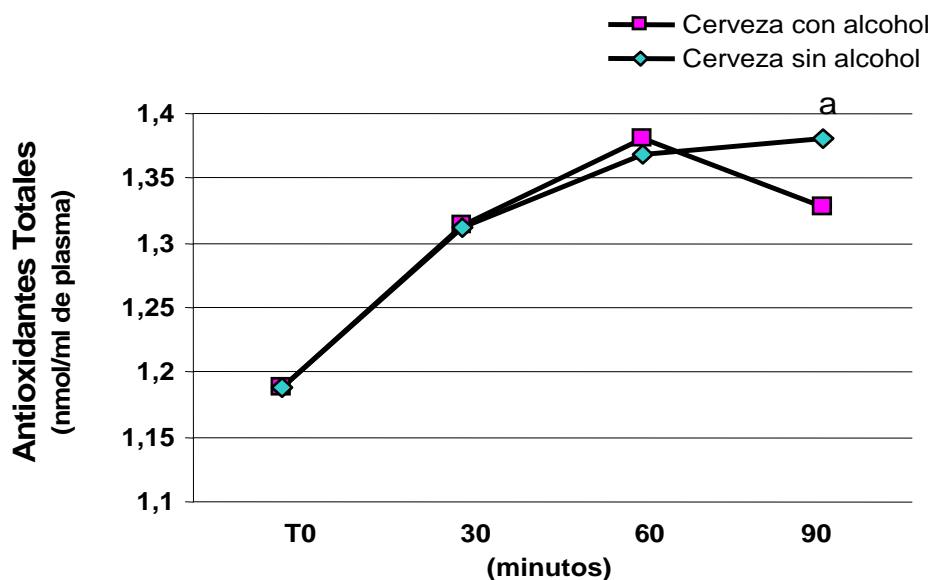
El alcohol actuaría de “facilitador” en un primer tiempo de la absorción, quizá a nivel gástrico, o al favorecer la escisión del radical glucídico del resto de la molécula, permitiendo así una mayor difusión pasiva. Posteriormente, al entrar en acción el transporte activo, esta situación se equilibra, no siendo por tanto, diferente la absorción a partir de la cerveza con alcohol en tiempos más prolongados.

3.2.4.- Actividad antioxidante total en plasma tras la suplementación con cerveza.

Para valorar si este incremento plasmático de la fracción polifenólica se acompañaba también de su actividad biológica, determinamos la actividad

antioxidante total del plasma, a los diferentes tiempos, 30, 60 y 90 minutos tras la suplementación en cerveza. Observamos, de forma coincidente con lo expuesto anteriormente, que la actividad antioxidante total era significativamente mayor ($P < 0,05$, Figura 39) a los 90 minutos de la ingestión de cerveza, lo que era debido, por tanto, a ese incremento de los polifenoles.

Figura 39.- Actividad de los antioxidantes totales en plasma a diferentes tiempos, tras la suplementación de la dieta con cerveza.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

^a $P < 0,05$ – Comparando T0 respecto a los tiempos 30, 60, 90, minutos tras la suplementación.

3.2.5.- Daño oxidativo a macromoléculas en la mitocondria.

Por otra parte, hemos valorado, en el animal de experimentación, mediante estudios "in vivo", la capacidad de modificar un estrés oxidativo inducido por un potente agente oxidante, la adriamicina. La adriamicina es uno de los agentes quimioterápicos más efectivos frente a una variedad de cánceres humanos, y principalmente sobre el cáncer de mama, estando millones de mujeres, a nivel

RESULTADOS

mundial, tratadas con dicho agente a consecuencia de esta dolencia. Sin embargo las limitaciones clínicas son considerables debido a sus efectos tóxicos, los cuales se originan, generalmente, a través de la producción de especies oxigenas. Está perfectamente demostrado que la mitocondria es el objetivo primordial de la toxicidad inducida por este antineoplásico (Figura 23).

En este estudio hemos valorado la capacidad del aporte suplementario de cerveza para inhibir el daño oxidativo producido a nivel mitocondrial por, el antineoplásico adriamicina, que actúa a través de la alteración de la cadena transportadora de electrones. Para ello hemos utilizado las mitocondrias aisladas de dos órganos con un metabolismo muy activo, como son el hígado y el corazón, obtenidos de los animales tratados con adriamicina y suplementados dietéticamente con cerveza o con placebo (suero fisiológico).

Tras el periodo de suplementación, aislamos las mitocondrias de hígado y corazón respectivamente y determinamos la actividad de los componentes de la cadena de transporte electrónico comparándola con la actividad en los componentes de las mitocondrias sin suplementar (Figura 40).

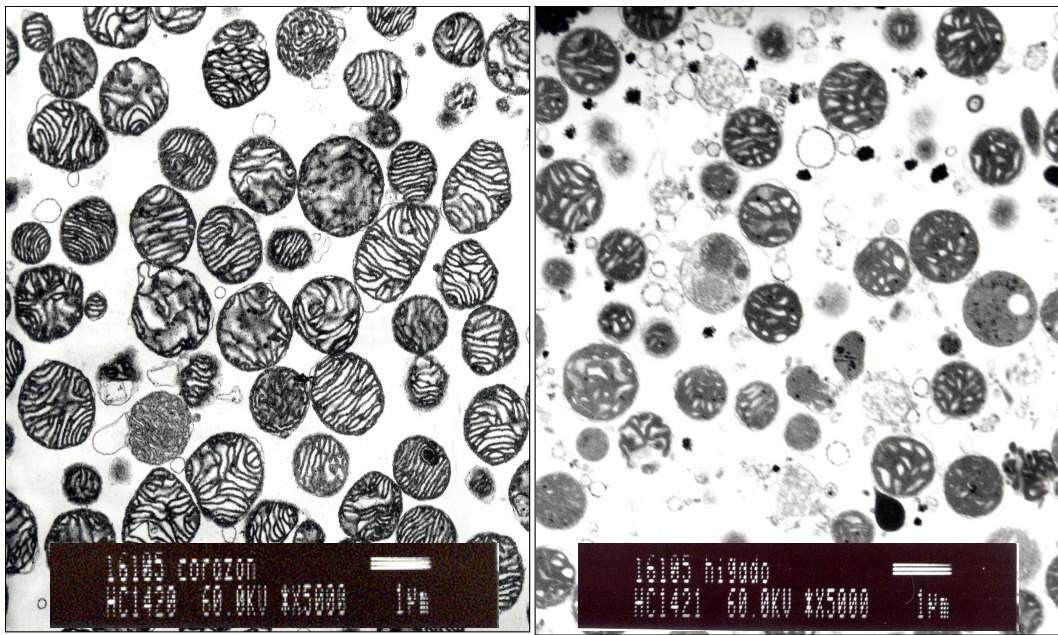


Figura 40.- Mitochondrias de corazón e hígado por microscopía electrónica.

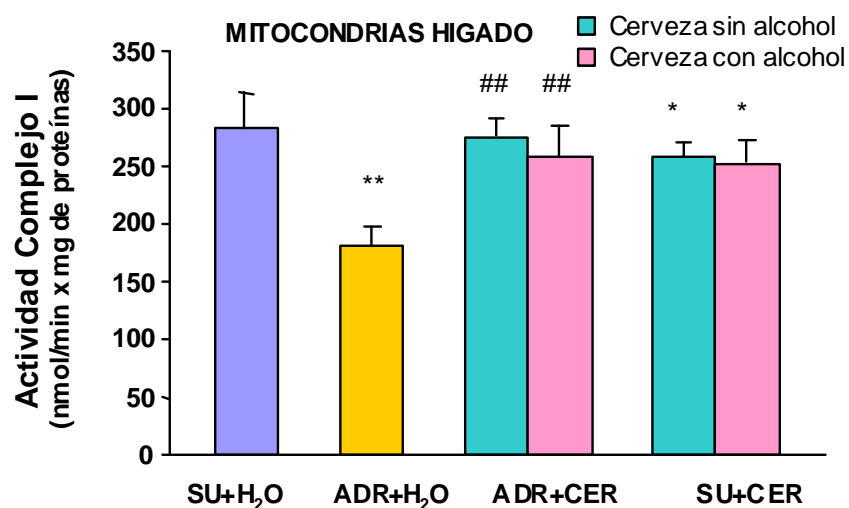
3.2.5.1.- Alteraciones de los componentes de la cadena de transporte electrónico.

Dentro de la mitocondria existen 5 complejos enzimáticos encargados del mantenimiento del aporte energético celular. El complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa es el paso inicial que controla el resto de la cadena transportadora de electrones, constituyendo de esta forma el principal factor responsable de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

3.2.5.1.1.- Actividad del complejo I en la cadena de transporte electrónico.

En las mitocondrias de hígado de rata observamos cómo disminuye de forma significativa ($P < 0,005$, Figura 41), la actividad del complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa en las mitocondrias hepáticas al administrar la adriamicina, en comparación con el grupo control, que había recibido suero en lugar de adriamicina. En los animales suplementados dietéticamente con cerveza no se produce este descenso del complejo I, siendo los valores prácticamente idénticos a los del grupo control. Tampoco en los animales a los que se les había administrado suero fisiológico, en lugar de adriamicina, junto con la cerveza, se encontraba disminución de este complejo.

Figura 41.- Actividad del complejo I en mitocondrias de hígado de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,005$ – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

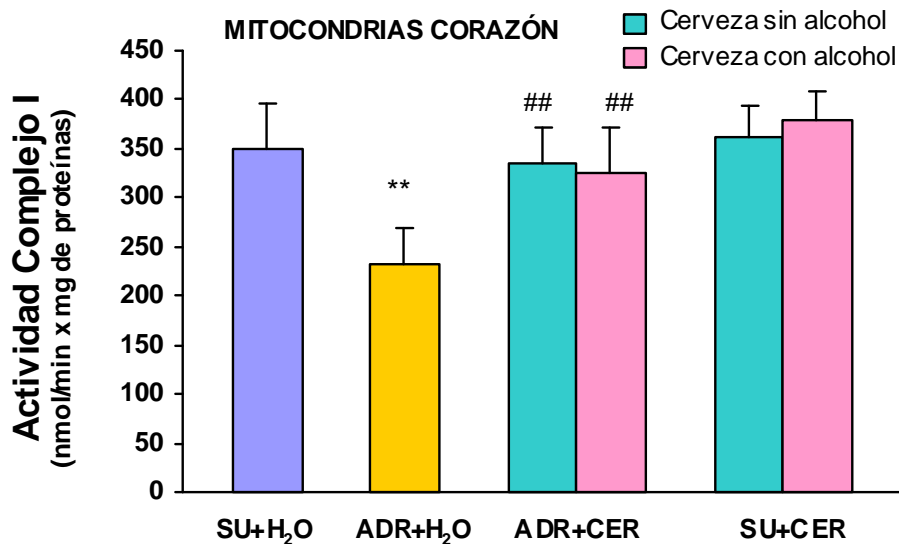
$P < 0,005$ – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

Complejo I = NADH-ubiquinona oxidoreductasa, ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

RESULTADOS

La adriamicina presenta una toxicidad principalmente a nivel cardíaco, por lo que presenta especial importancia evaluar este complejo I en las mitocondrias cardíacas. Nuestros resultados muestran, así como en el caso anterior, una disminución pronunciada en la actividad del complejo I en las mitocondrias de los animales tratados con adriamicina ($p < 0,005$). En los animales suplementados con cerveza, el complejo I era similar a la del grupo sin tratar, al que se le había dado únicamente suero fisiológico, (tanto con la cerveza con alcohol como con la cerveza sin alcohol). Incluso, en los animales a los que se había administrado cerveza, junto con el suero fisiológico, los valores de este complejo I eran ligeramente superiores, si bien sin significación estadística (Figura 42).

Figura 42.- Actividad del complejo I en mitocondrias de corazón de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

** $P < 0,005$ – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

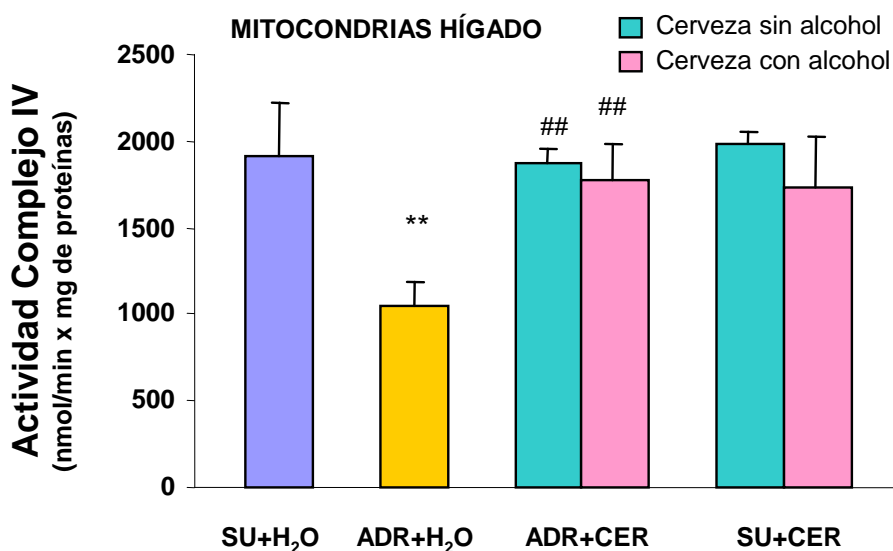
$P < 0,005$ – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

Complejo I = NADH-ubiquinona oxidoreductasa, ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

3.2.5.1.2.- Actividad del complejo IV en la cadena de transporte electrónico.

El complejo IV ó citocromo oxidasa es una hemoproteína localizada en la membrana interna de la mitocondria. Si se altera su actividad, se interrumpe el flujo de electrones en la cadena respiratoria, favoreciéndose la producción de radicales libres. Es fundamental, por lo tanto el determinar esta actividad para una evaluación adecuada del metabolismo oxidativo.

Figura 43.- Actividad del complejo de IV en mitocondrias de hígado de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

##P<0,005 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

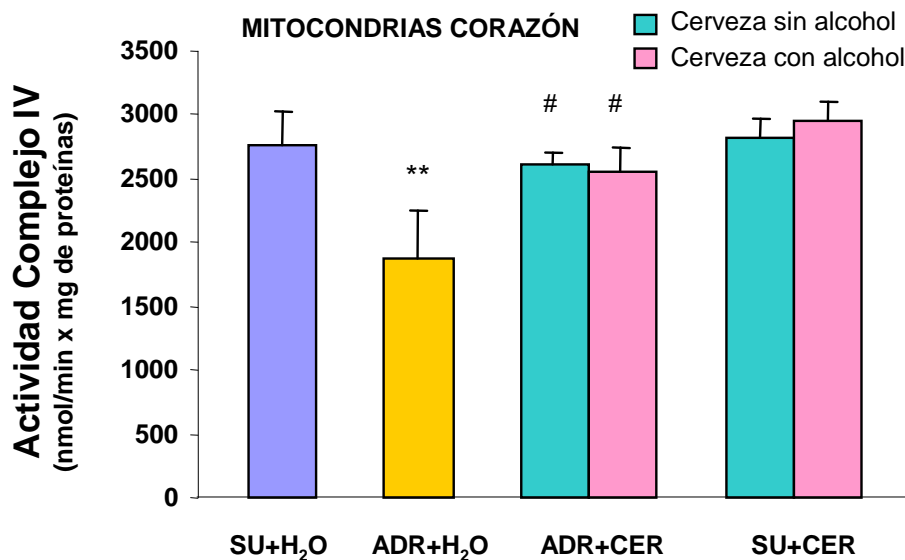
Complejo IV = Citocromo oxidasa, ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

Este complejo presenta una disminución importante a nivel hepático al ser tratadas las ratas con adriamicina (p<0,005). El efecto protector de ambos tipos de cerveza se pone de manifiesto tras su suplementación en las ratas tratadas con el quimioterápico. En efecto no se aprecia diferencia en cuanto a la

actividad del complejo I con el grupo control, y sí con el de las ratas sometidas a este antineoplásico ($p < 0,005$; Figura 43).

En las mitocondrias cardíacas, tras el tratamiento con adriamicina, la disminución del complejo IV es notoria ($p < 0,05$). Observamos que los niveles, en las ratas tratadas y suplementadas dietéticamente con cerveza, son similares a los de las ratas control. Se vuelve a poner de manifiesto, aunque no es significativo estadísticamente, un ligero incremento en las ratas a las que se les había dado suero fisiológico y cerveza, con respecto a las que administró únicamente suero fisiológico, en cuanto a la actividad del complejo IV en las mitocondrias del corazón, de forma similar a lo acontecido en la actividad del complejo I en las mismas mitocondrias (Figura 44).

Figura 44.- Actividad del complejo IV en mitocondrias de corazón de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

** $P < 0,005$ – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

$P < 0,005$ – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

Complejo IV = Citocromo oxidasa, ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

3.2.5.1.3.- Niveles de la coenzima Q₉ y Q₁₀.

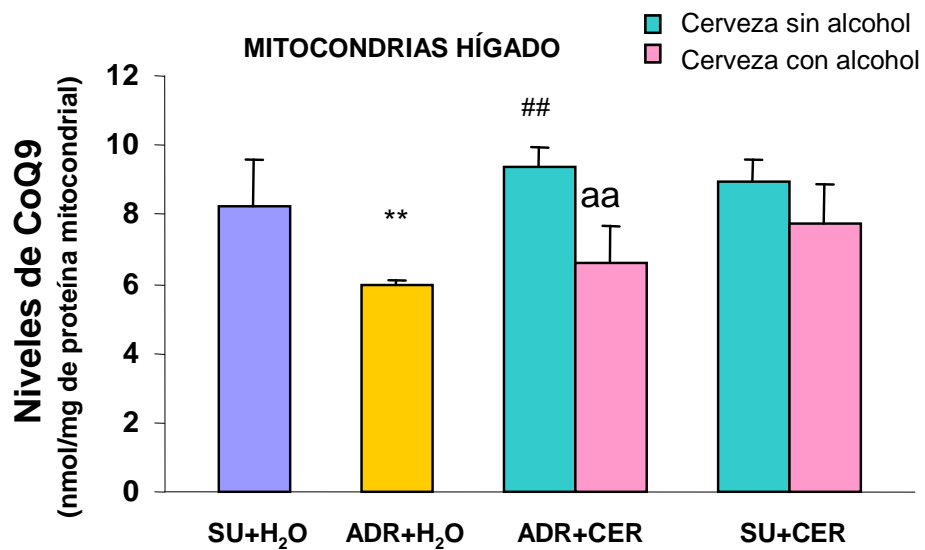
La coenzima Q es un componente crucial del proceso de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, puesto que es la molécula central en la cadena de transporte electrónico. Esta coenzima existe en tres estados redox diferentes: quinona (oxidada), semiquinona, y ubiquinona (reducida), lo que hace posible el que acepte electrones generados durante el metabolismo de las grasas y de la glucosa y los transfiera.

Hemos determinado tanto la coenzima Q₉ (predominante en los roedores), como la Q₁₀ (que se sintetiza preferentemente en los humanos), para poder evaluar adecuadamente el estado de la fosforilación oxidativa.

Ambas formas de coenzima Q disminuyen en las mitocondrias hepáticas de forma significativa, tras el tratamiento con adriamicina ($p < 0,005$; Figura 45 y 46). En los animales a los que se les ha suplementado con cerveza sin alcohol esta disminución no ocurre, encontrando una diferencia significativa ($p < 0,005$) con el grupo que había recibido agua en lugar de cerveza. Sin embargo, en el grupo de animales suplementados con cerveza con alcohol sí que los niveles de la coenzima Q₉ son menores que en los suplementados con cerveza sin alcohol. Ello podría indicar un menor efecto protector, en el mantenimiento de este antioxidante en el caso de este tipo de cerveza. En el caso de la coenzima Q₁₀ los niveles también son ligeramente menores en los animales suplementados con cerveza con alcohol en comparación con los suplementados con cerveza sin alcohol. De todas formas, ambos grupos de

animales presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los animales tratados con adriamicina y no suplementados, en el sentido de que los niveles de esta coenzima Q_{10} son superiores en caso de que las ratas hayan recibido el aporte dietético de cerveza.

Figura 45.- Niveles de CoQ_9 en las mitocondrias de hígado de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

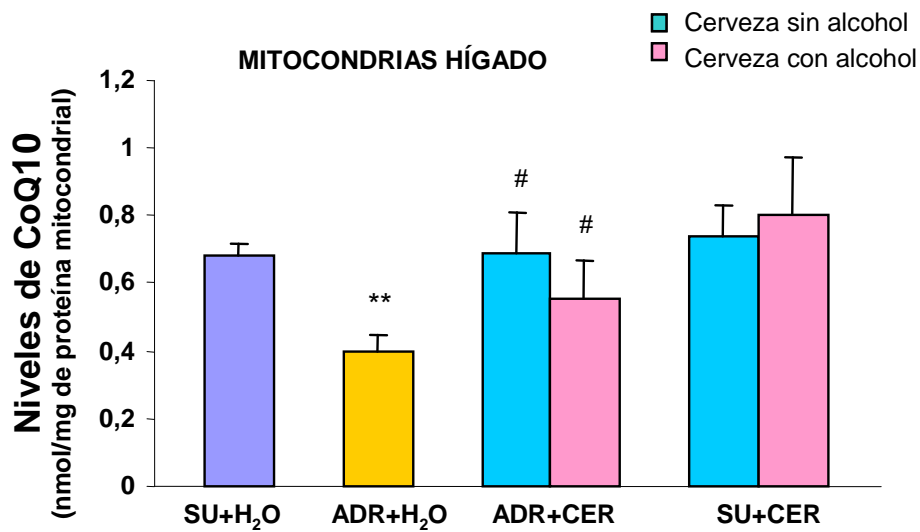
** $P < 0,005$ – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

$P < 0,005$ – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

aa $P < 0,005$ – Comparando el grupo (cerveza sin alcohol) respecto a (cerveza con alcohol).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

Figura 46.- Niveles de CoQ₁₀ en las mitocondrias de hígado de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

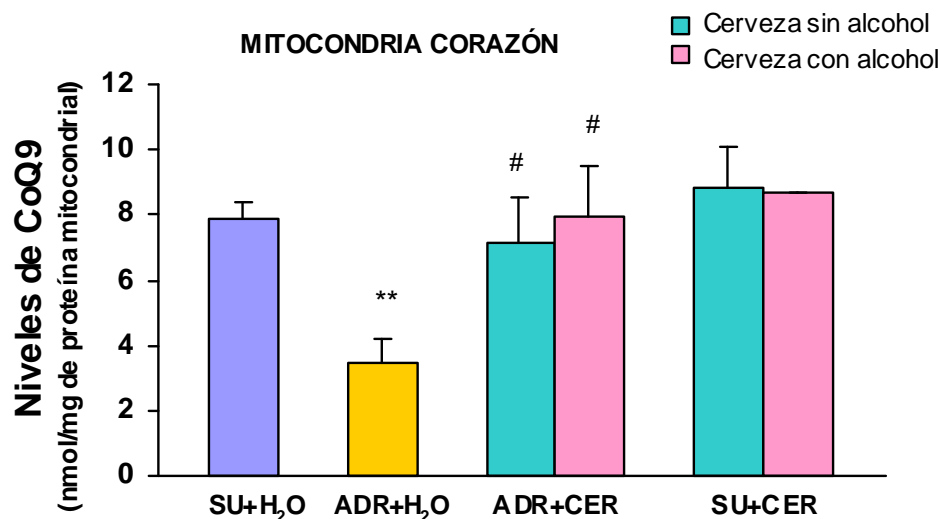
#P<0,05 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

De igual manera que en el caso anterior, los niveles de ambas coenzimas a nivel cardíaco se ven seriamente comprometidos en el caso del tratamiento de las ratas con adriamicina (p<0,005, Figura 47 y 48) con respecto al grupo control.

Cuando los animales están suplementados con cerveza no se observa esta caída enzimática, manteniendo los niveles iguales a los del grupo control. Hay que destacar, además, que en el grupo de animales no tratados con adriamicina sino con suero fisiológico, a los que se les había dado cerveza con alcohol, la coenzima Q₁₀ aumentaba de forma significativa (p<0,05). Estos animales no habían sido sometidos a un estrés oxidativo extra, y en ellos, la cantidad de este antioxidante es mayor tras el aporte dietético de cerveza.

Figura 47.- Niveles de CoQ₉ en mitocondrias de corazón de rata.



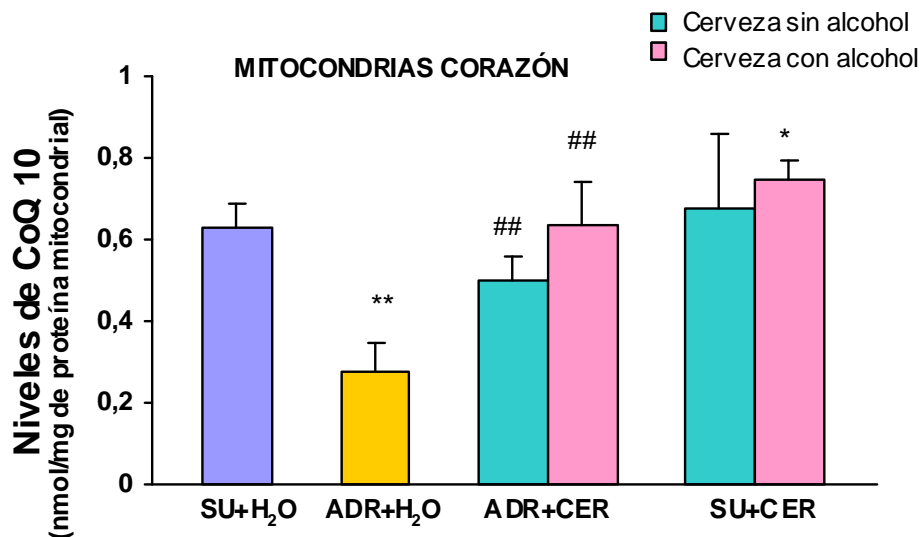
Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media ± SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

#P<0,05 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer)

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

Figura 48.- Niveles de CoQ₁₀ en las mitocondrias de corazón de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media ± SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

*P<0,05 y **P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

##P<0,005 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

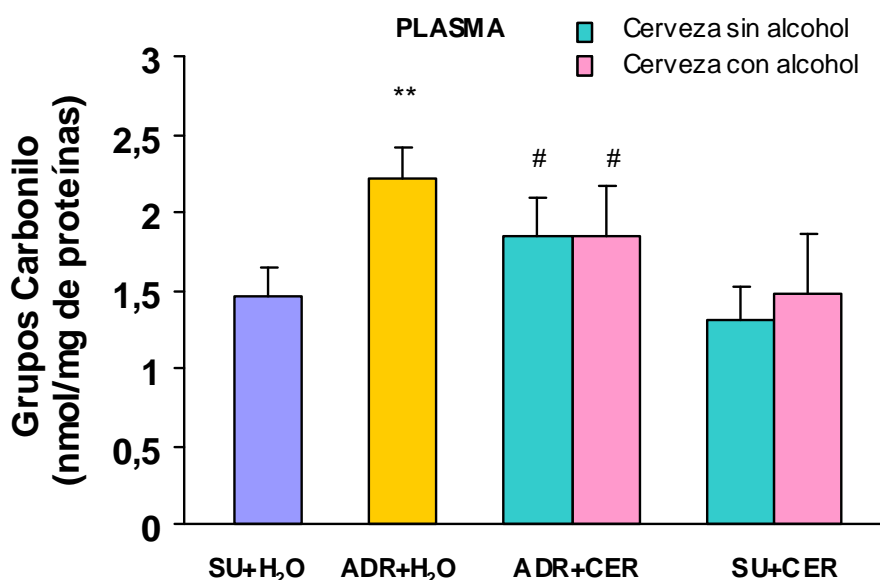
ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

3.2.5.1.4.-Contenido de grupos carbonilo en las proteínas plasmáticas

de rata.

Para apreciar si también se ocasionaba daño a nivel de macromoléculas determinamos, en primer lugar, la cantidad de grupos carbonilo producidos, puesto que es uno de los mejores indicadores de daño oxidativo proteico (Figura 49).

Figura 49.- Contenido de grupos carbonilo de las proteínas de plasma de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0'005 – Comparando el grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR+ H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

#P<0,05 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

Tras el tratamiento con adriamicina se observa un incremento significativo del contenido en estos grupos carbonilo con respecto a la situación basal (p<0,005), reflejando la oxidación proteica originada (Figura 49). Si el aporte de adriamicina se asociaba con un suplemento dietético de cerveza, los valores

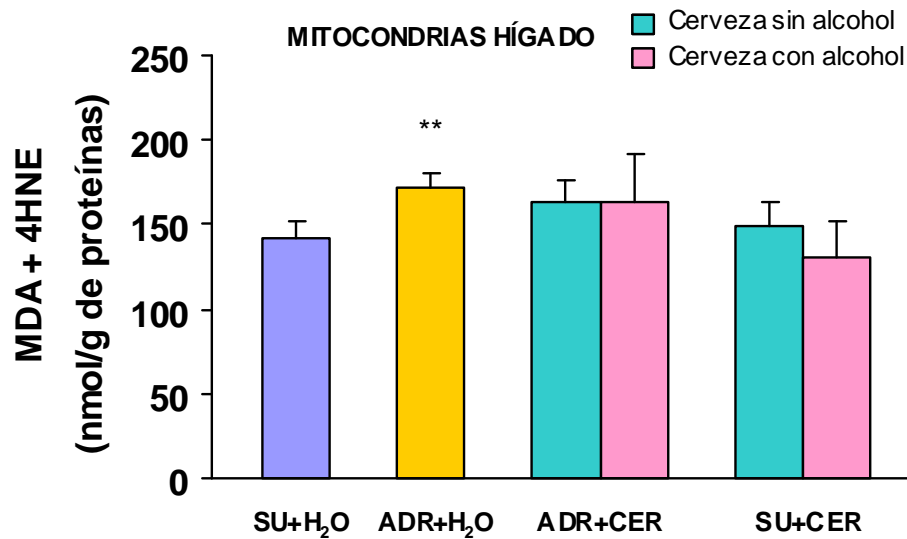
eran parecidos a los basales, indicando así el efecto protector sobre el estrés oxidativo originado.

3.2.5.1.5.- Niveles de malondialdehído más 4-hidroxinonenal (MDA+4HNE) en las mitocondrias.

El daño oxidativo a lípidos se evaluó mediante la producción de peróxidos lipídicos a nivel de la membrana mitocondrial. Como marcador utilizamos el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal, puesto que son productos formados directamente en la reacción de peroxidación lipídica, responsable de la mayoría de los efectos fisiopatológicos relacionados con el estrés oxidativo de las células y los tejidos.

En este trabajo hemos encontrado un incremento discreto de los valores de dichas sustancias en las mitocondrias hepáticas, tras el tratamiento del animal de experimentación con los ciclos de adriamicina. Las ratas tratadas con adriamicina y suplementadas con cerveza no mostraban diferencias significativas ni con el grupo control ni con el grupo tratado no suplementado (Figura 50).

Figura 50.- Niveles de MDA + 4-hidroxinonenal en mitocondrias de hígado de rata.



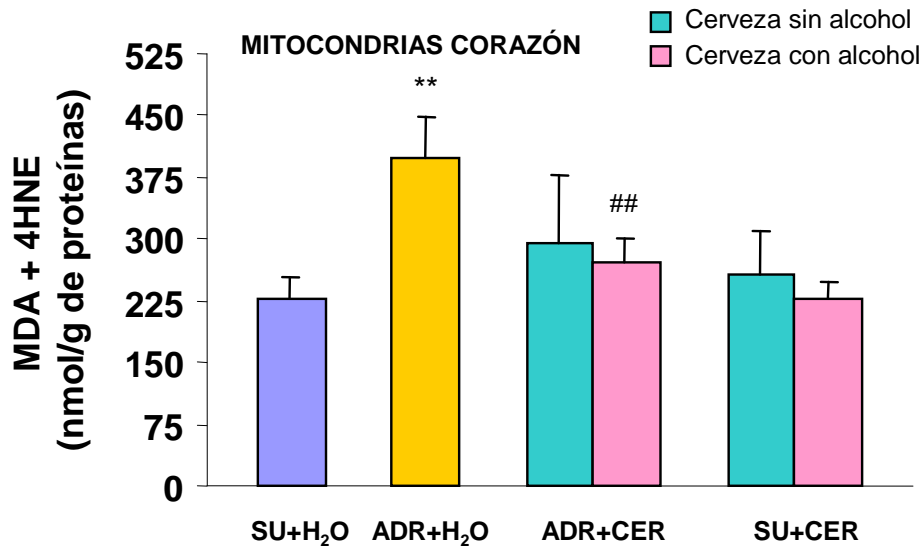
Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

En los mitocondrias cardíacas, la producción de malondialdehído y 4-hidroxinonenal era significativamente superior tras el tratamiento con adriamicina ($p < 0,005$) con respecto al grupo control. Ello explica, al menos en parte, los efectos tóxicos que se aprecian tras la terapéutica con este antineoplásico. Si en la dieta del animal añadíamos cerveza, los niveles disminuían, llegando a ser similares a los de la situación basal. Esta disminución era más marcada con la cerveza con alcohol (Figura 51).

Figura 51.- Niveles de Malondialdehído + 4-Hidroxinonenal en mitocondrias de corazón de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

##P<0,005 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

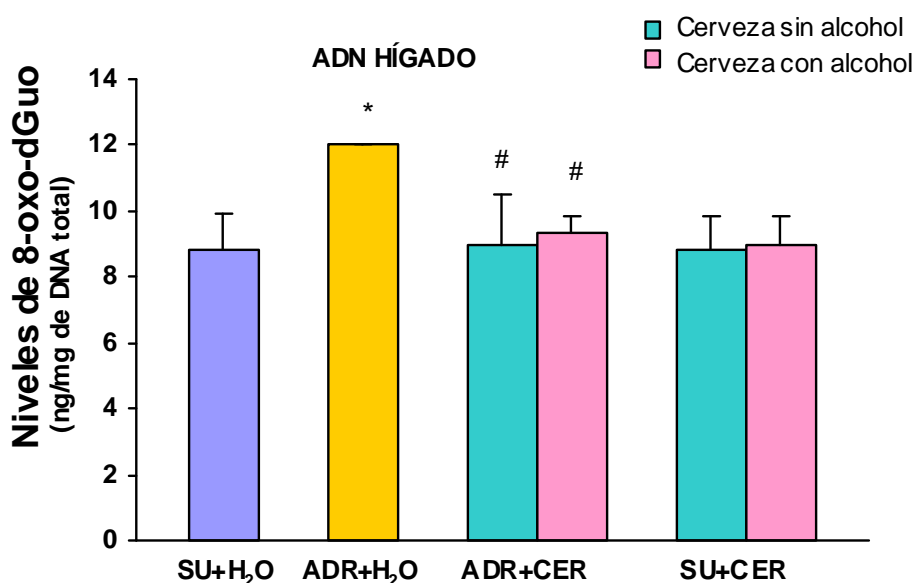
3.2.5.1.6. Niveles de 8hidroideoquanosina (8-oxo-dGuo) en el ADN de hígado y corazón de rata.

Uno de los riesgos principales de la producción de radicales libres es la posibilidad de inducir alteración en el ADN, a través de la modificación de sus bases. Utilizamos como marcador, para determinar la oxidación de la cadena de ADN, la producción de la base modificada 8-oxo-dGuo, formada durante el daño oxidativo al ADN por parte del radical hidroxilo (\cdot OH).

Por ello, determinamos el nivel de la 8-oxo-dGuo en situación basal, y tras los ciclos de terapia con adriamicina. Observamos un incremento significativo en esta base modificada en el ADN del hígado ($p < 0,05$), y principalmente en el

ADN del corazón ($p < 0,005$,) de las ratas tratadas (Figura 52 y Figura 53). Si en la dieta de los animales se añadía cerveza, este incremento no se producía, independientemente del tipo de cerveza, en el caso del ADN hepático, pero siendo más evidente en el caso de la cerveza con alcohol, a nivel del ADN del corazón. La 8-oxo-dGuo no se incrementa tras la suplementación con cerveza y suero fisiológico, lo que implica que la cerveza no induce ningún daño al ADN.

Figura 52.- Niveles de 8-oxo-dGuo en el ADN de hígado de rata.



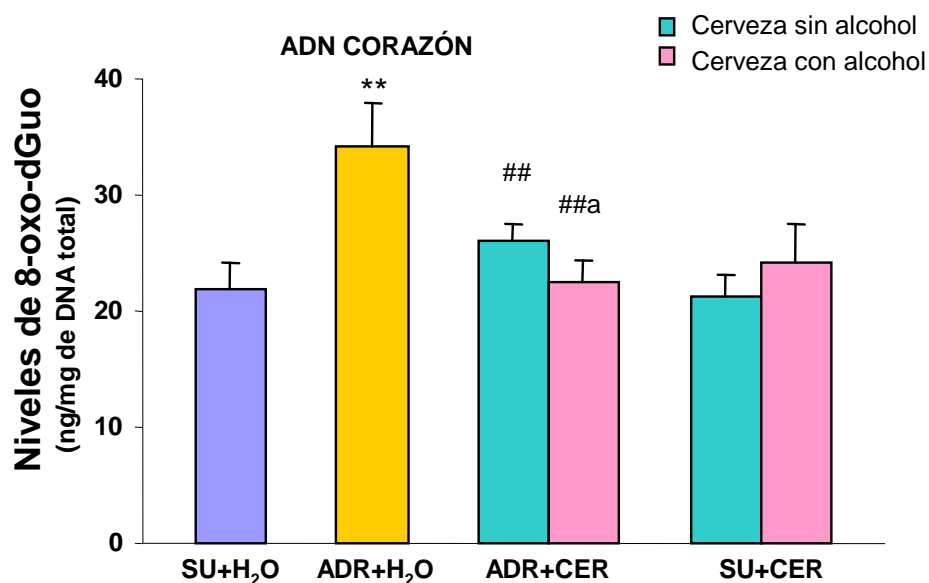
Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

* $P < 0,05$ – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

$P < 0,05$ – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

Figura 53.- Niveles de 8-oxo-dGuo en el ADN de corazón de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

##P<0,005 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

^aP<0,05 – Comparando el grupo (cerveza sin alcohol) respecto a (cerveza con alcohol).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

3.4.3.5.- Defensa antioxidante: niveles de α -tocoferol.

La vitamina E, en su forma de α -tocoferol es un antioxidante natural, presente en alimentos de origen vegetal sobre todo. Su principal papel lo ejerce a través de su acción como “barredor” (scavenger) de radicales libres ya formados. Su disminución por tanto nos indica, una formación excesiva de radicales oxigénicos, que precisan ser contrarrestados y pueden originar un consumo de este antioxidante.

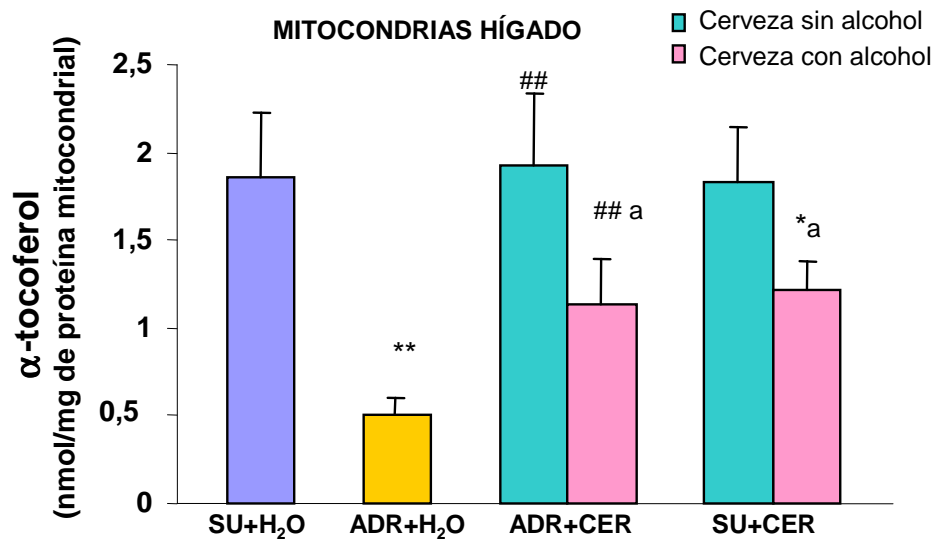
En las mitocondrias de hígado de rata hemos detectado una disminución muy importante (Figura 54) de este antioxidante en los animales sometidos a tratamiento con adriamicina (p<0,005) con respecto a los animales del grupo

RESULTADOS

control. En los animales a los que se les había administrado cerveza los valores de α -tocoferol estaban significativamente más altos. Este efecto era sobre todo, demostrable en los animales suplementados con cerveza sin alcohol, donde los valores de α -tocoferol permanecían al mismo nivel que los del grupo control, a pesar de haber recibido la adriamicina.

En los animales tratados que habían recibido la cerveza con alcohol, los valores de α -tocoferol eran más elevados que en los que no habían recibido este suplemento, pero se mantenían a un nivel más bajo que los del grupo control. Otro hecho destacable, es que, en estas mitocontrias hepáticas, el nivel de vitamina E era más bajo en el caso de que los animales hubieran recibido cerveza con alcohol, aún sin haber sido tratados con el quimioterápico, en comparación al grupo control. Este hecho no ocurría en caso de la administración de cerveza sin alcohol, por lo que podría estar atribuido al contenido alcohólico de la cerveza.

Figura 54.- Niveles de α -tocoferol en las mitocondrias de hígado de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

*P<0,05 y **P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

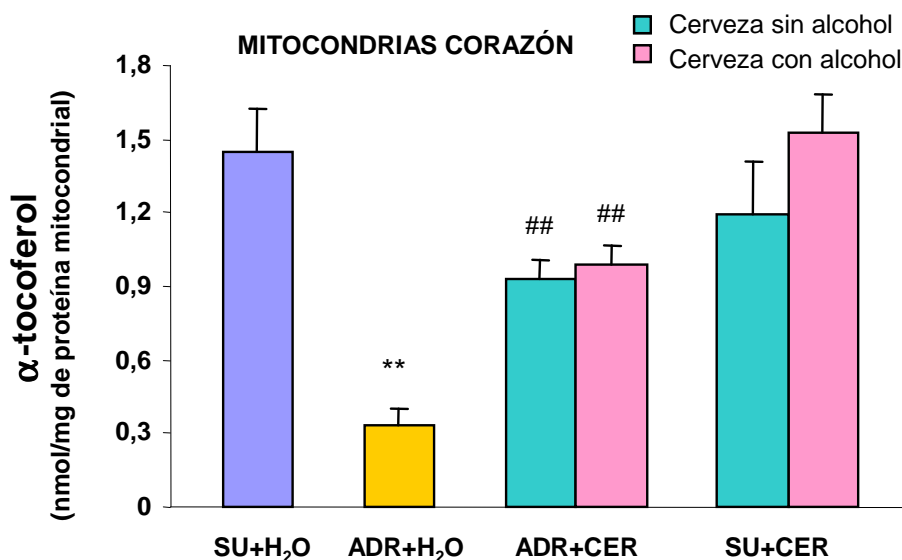
##P<0,005 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

^aP<0,05 - Comparando el grupo (cerveza sin alcohol) respecto a (cerveza con alcohol)

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

En el caso de las mitocondrias cardiacas la situación era diferente (Figura 55). En primer lugar, si que observamos una disminución de la vitamina E tras el tratamiento con adriamicina, al igual que en las mitocondrias hepáticas, pero ya no se aprecian diferencias en cuanto al tipo de cerveza administrada. Tras la suplementación, ambos grupos de animales (suplementados con cerveza sin alcohol o con alcohol) mostraban una recuperación de los niveles del α -tocoferol en comparación con los animales no suplementados ($p < 0,005$). Además, en los animales no tratados con adriamicina, y sólo suplementados con la cerveza, las cifras de esta vitamina E, eran incluso más elevadas en el grupo al que se le había aportado la cerveza con alcohol, si bien no presentaba significación estadística. Por lo tanto, a nivel de las mitocondrias cardiacas no se aprecia diferencia entre los tipos de cerveza.

Figura 55.- Niveles de α -tocoferol en mitocondrias de corazón de rata.



Tratamiento de las ratas especificado en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados en media \pm SD de 8 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la t' Student.

**P<0,005 – Comparando grupo control (Suero + H₂O) respecto a los grupos (ADR + H₂O), (ADR + Cer) y (Suero + Cer).

##P<0,005 – Comparando el grupo (ADR + H₂O) respecto al grupo (ADR + Cer).

ADR = Adriamicina; Cer = Cerveza y H₂O = Agua.

Se observa pues, un comportamiento diferente del corazón con respecto al hígado, en cuanto a la protección de la cerveza con alcohol frente a la oxidación, siendo esta protección menor en el hígado. Esta divergencia, es posiblemente debida a que el 90% del etanol ingerido es biotransformado en el hígado, y el 10% restante lo es en el resto de tejidos, tales como el corazón, cerebro, pulmón, etc., excretándose una pequeña parte por el sudor y la orina. El hígado posee tres vías metabólicas de eliminación del etanol. Cuando éste se ingiere en pequeñas cantidades con los alimentos fermentados, o por fermentación del intestino, la principal vía de biotransformación es a través de la enzima alcoholdehidrogenasa (ADH) que oxida el alcohol a acetaldehído. Esta enzima se encuentra mayoritariamente en el hígado (la actividad en nmol/minuto x mg de proteína es de 49,6), y minoritariamente en los otros tejidos como el corazón (la actividad en nmol/minuto x mg de proteína es de

RESULTADOS

0,8), de la que existen varias isoformas. Junto a ella tenemos la aldehidodeshidrogenasa mitocondrial que se ocupa de la oxidación del acetaldehído dando como producto final acetato. Esto puede implicar una mayor generación de ROS, y por tanto una disminución de la defensa antioxidante (Shiva et al., 2005). Ello puede ser la explicación de que observamos unos menores niveles de protección con la cerveza con alcohol respecto a la cerveza sin alcohol en el hígado, si bien el efecto final es protector en ambas, ya que la cantidad de alcohol ingerido es moderada.

4.- DISCUSIÓN.

4-DISCUSIÓN.

En el presente trabajo hemos estudiado el posible efecto protector antioxidante de la cerveza (tanto rubia como negra) frente a los efectos tóxicos producidos por la adriamicina en células hepáticas aisladas de rata. Por otra parte, también se ha valorado el efecto protector de la suplementación dietética con cerveza (tanto con alcohol como sin alcohol). La suplementación ha consistido en un concentrado de la misma 10 veces, y la cantidad equivalente a 400 mL / día para una persona de 70 Kg de peso, administrándose diariamente durante un periodo de 21 días. A los animales suplementados se les aplicaron dos dosis de adriamicina de 5 mg / Kg de peso (1 ciclo por semana), como inductor de estrés oxidativo. La finalidad ha sido valorar la capacidad antioxidante de la cerveza, tanto “in vitro” como “in vivo”.

El poder antioxidante de la cerveza puede atribuirse a diversos componentes, de entre ellos, hay que destacar los flavonoides que presentan una capacidad antioxidante demostrada. Dentro de los polifenoles, los flavonoides, y las melanoidinas constituyen unos antioxidantes activos en sistemas biológicos, y probablemente esta capacidad explica su abundancia en tejidos vegetales, en particular aquellos sometidos a un estrés oxidativo. (Leigthon, 2000).

Los polifenoles presentes en la cerveza, proceden esencialmente de la cáscara de la cebada de malta y del lúpulo. Son principalmente ácidos fenólicos, flavonoides de tres tipos: flavanos, antocianos y los productos

derivados de ellos, como las calconas; y los flavanoles siendo las más importantes las proantocianidinas.

Las melanoidinas son compuestos formados en los alimentos durante su tratamiento térmico. Se originan mediante las reacciones de Maillard entre los grupos amino de los péptidos y proteínas y los grupos aldehído del azúcar (Vernin y Parkanyi, 1982). En el caso de la cerveza se forma durante los procesos del malteado y la elaboración. Tienen influencia sobre el color, el aroma y se hacen necesarios para elaborar algunos tipos especiales de cerveza. Su actividad antioxidante ha sido investigada en bebidas mostrando que protegen contra el estrés oxidativo inducido por la adriamicina en hepatocitos de rata (Valls-Bellés et al., 2001; 2004; 2006). Varios estudios sugieren que las propiedades antioxidantes y la capacidad de quelar metales que aportan las melanoidinas a los alimentos puede mejorar el sistema de defensa del organismo (Faist et al., 2001; Mira et al., 2002). Estos datos sugieren que estos componentes junto con los polifenoles podrían ser responsables de la actividad antioxidante de las cervezas.

El agente que hemos utilizado como conductor de estrés oxidativo la adriamicina o doxorubicina, es un antibiótico aislado inicialmente de la bacteria *Streptomyces peucetis* al principio de los años 60. Este fármaco se usa clínicamente como un potente agente antineoplásico, con actividad frente a una gran variedad de cánceres. En su proceso de metabolización interacciona con el complejo I produciendo toxicidad a nivel mitocondrial. Ello llevó diversas investigaciones para desarrollar derivados que tuvieran los mismos o mejores

efectos antitumorales, pero con menor toxicidad cardíaca. Los derivados farmacéuticos más recientes tienen la misma estructura general del anillo de antraciclina pero con ligeras modificaciones, habiéndose probado, en los últimos 30 años, muchos análogos. Algunos de ellos todavía se encuentran en ensayos clínicos, pero la doxorubicina sigue siendo la antraciclina más usada (Weiss, 1992; Zhou et al., 2005; Ciesielska et al., 2005; Mano, 2006).

Se han llevado a cabo también diversos intentos, para reducir la toxicidad de estos fármacos. Así, se han administrado en una forma inactiva o prodroga que puede ser activado una vez haya entrado en las células objetivo. También se ha introducido el antineoplásico en un sistema cargador fosfolípido, es decir, a través de liposomas, lo que reduce la exposición de los tejidos normales al antraciclínico (Bóoser et al., 1994; Valls-Bellés et al., 1994). Otra posibilidad es combinar la doxorubicina con otro medicamento para aliviar la cardiotoxicidad. De esta forma el dexrazoxano (DXZ), un miembro de la clase de fármacos bisoxopiperazinos, elimina la producción de radicales libres y disminuye la posibilidad de cardiomiopatía (Weiss, 1992). Frente a todo ello, surge la hipótesis de reducir los efectos secundarios, debido a la formación de radicales libres, a través de la suplementación de antioxidantes que contrarresten sus efectos (van Acker et al., 2001; Zhan et al., 2005).

Los cultivos celulares se usan como modelo experimental y pueden aportar una información valiosa sobre los mecanismos metabólicos, la regulación en la transducción de señales de la expresión genética, la proliferación, la senescencia y la muerte celular. Sin embargo, pueden comportarse diferente a

las células “in vivo” de muchas maneras, ya que en ellos se impone un estado de estrés oxidativo a las células. Por ello nuestro grupo de investigación decidió trabajar con células aisladas y no con cultivos. Además, los medios de cultivo celulares pueden catalizar la oxidación de sus componentes, dando como resultado un efecto aparente sobre las células, y semejante al debido a los productos de oxidación como los EROs (Halliwell et al., 2005; Elaut et al., 2006).

La LDH es una enzima intracelular implicada en la producción energética de las células. Su aumento en el compartimento extracelular es un signo del daño a tejidos. Es decir, su liberación al medio extracelular, es un buen marcador de viabilidad de celular.

En nuestros resultados se observa un aumento de la LDH, al añadir al medio de incubación de los hepatocitos la adriamicina, lo que implica una disminución importante de la viabilidad celular. En presencia de la fracción 3 rica en polifenoles de ambos tipos de cerveza, los valores obtenidos son inferiores, indicativo de que se está ejerciendo un efecto protector. Estos datos son similares a los de los estudios en los que se añade la vitamina E (Young et al., 2005) o la vitamina C (Grajeda-Cota et al., 2004).

La producción del ATP es vital para la función celular, la contracción muscular y para el mantenimiento de la homeostasis quimiostática (Drew et al., 2003). Un aumento del estrés oxidativo implicaría un mayor generación de

especies oxigénicas reactivas y una menor producción de ATP como consecuencia de la alteración de la función mitocondrial (Caraceni et al., 2005).

En nuestros resultados observamos que los niveles de ATP en las células hepáticas incubadas con la adriamicina son significativamente inferiores en relación a los controles, debido al aumento de la producción de radicales oxigénicos. En cambio, en presencia del extracto de cerveza, recuperan valores control. Ello nos indica que, efectivamente, el antibiótico induce la formación de radicales que afectan a la función de la cadena electrónica mitocondrial, siendo éstos captados o reducidos por los flavonoides de dicha fracción de cerveza (Gasbarrini et al., 1998; Van de Berg et al., 2002; Gasowski et al., 2004; Moens et al., 2005; Facundo et al., 2005; Van Houten et al., 2005). En el proceso de metabolización, el antibiótico induce la formación de especies oxigénicas, e induce el fenómeno conocido como “transición a la permeabilidad mitocondrial“. Este fenómeno consiste en una transformación de las características de la membrana interna mitocondrial, en el sentido de que pasa de una barrera altamente restrictiva capaz de excluir iones tan pequeños como el de hidrógeno, a una que permita el equilibrio pasivo de solutos hasta 1500 daltons. Este fenómeno (llamado The Mitochondrial Permeability Transition o MPT en inglés) ha sido implicado en muchas patologías, particularmente las asociadas con el estrés oxidativo, y es una consecuencia del tratamiento con doxorubicina. Como resultado se produce una interferencia en las rutas mitocondriales dependientes de calcio y la síntesis calcio-estimulante del ATP (Wallace, 2003), con la consecuente disminución del ATP. Es decir, el antibiótico produce EROs que alteran las proteínas de la cadena electrónica

mitocondrial y además la permeabilidad de la membrana mitocondrial con la consecuente disminución de la síntesis del ATP. Los flavonoides de la cerveza reducirían a los radicales, manteniéndose así los niveles de ATP.

La toxicidad de la adriamicina está unida a los parámetros de estrés oxidativo, que incluyen la oxidación de lípidos, proteína y material genético. Estos constituyentes juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura y función de la membrana celular, y en la viabilidad celular, y su alteración está implicada en numerosos procesos patológicos. Por ello, se ha investigado el efecto protector de los antioxidantes contra enfermedades y procesos degenerativos causados por estrés oxidativo (Sahin et al., 2004; Zhou y Zhang, 2005).

En nuestro estudio podemos observar el papel protector del extracto de cerveza, ya que se produce una disminución dosis dependiente de los TBARS en ambos tipos de cerveza (rubia y negra), incluso alcanzando niveles inferiores al grupo control, lo que implicaría una disminución de peróxidos lipídicos y un menor daño a membranas celulares (Rodríguez et al., 2001; Navarro et al. 2003; Ameen et al., 2004; Sahin et al., 2004; Husain et al., 2005). Hay evidencias de que los flavonoides se localizan cerca de la superficie de la membrana lipídica para captar los radicales libres y por ello previenen la peroxidación lipídica de la membrana expuesta a radicales oxigénicos acuosos (Terao et al., 1994). Además, Verstraeten et al (2002) comprobaron la hipótesis de que las proantocianidinas (flavonoide más abundante en la cerveza) podrían ser absorbidas por las membranas creando un medio que limitaría el acceso a

las especies radicales y su propagación, a través de la cadena de reacciones en los ácidos grasos (Rasmussen et al., 2005).

La formación de los grupos carbonilo produce alteraciones en la conformación y en el funcionamiento de las proteínas, que puede llevar a una pérdida de la actividad enzimática y a un aumento en la digestión proteolítica.

Similarmente a lo que ocurre con los TBARS, la formación de grupos carbonilo fue inhibida al añadir el extracto, pero se observaron diferencias entre la cerveza negra y la cerveza rubia. El efecto era significativo a bajas concentraciones de cerveza negra pero no rubia. La diferencia observada entre la capacidad de protección proteica del extracto de cerveza, podría estar relacionada con la diferencia del contenido en proantocianidinas en ambos extractos de cerveza, ya que éstas son más abundantes en la cerveza negra y captarían las especies oxigenicas, disminuyendo la peroxidación de lípidos y proteínas (Ottaviani et al., 2002; Yagmurca et al., 2003; Sahin et al., 2004; Fadillioglu et al., 2004; Domenicalli et al., 2005; Albano, 2006.).

El GSH es un tripéptido compuesto de cisteína, ácido glutámico y glicina. Es un antioxidante intracelular importante, presente en tejidos de animales y plantas que forman parte de la dieta humana. Juega un papel principal en la protección de las células contra el estrés oxidativo, además del mantenimiento de la integridad de la mitocondria, de la membrana celular y de la homeostasis (Jones et al., 1992; Domenicali et al., 2005).

En nuestros resultados, los niveles de GSH de hepatocitos incubados con ADR han disminuido respecto a su control. En cambio, en presencia del extracto de cerveza, aumentan, aunque solamente se percibe con la cerveza rubia, en concreto a partir de la concentración de 10 μg y 20 μg . Otros autores han obtenido resultados similares (Johnston et al., 1993; Reiter et al., 2000, 2001; Sener et al., 2005; Domenicali et al., 2005). El mantenimiento del nivel de GSH es esencial para la viabilidad de la célula. Si se inhibe el consumo de la cisteína, o se disminuye la síntesis de GSH, se obtiene como resultado el agotamiento del glutatión y una muerte celular programada. El glutatión es una fuente importante de los grupos tiol en el espacio intracelular, puede actuar directamente como un antioxidante, como captador de especies reducidas, y como factor esencial para la glutatión peroxidasa. Por lo tanto, una deplección en el GSH puede deteriorar la acción de la glutatión peroxidasa, e impedir contrarrestar la peroxidación lipídica (Sahin et al., 2004; Ameen et al., 2004; Sener et al., 2005; Garcia-Ruiz et al., 2006). Puesto que los niveles de GSH se mantienen en los hepatocitos incubados solo con el extracto de cerveza, los flavonoides pueden actuar en la prevención de la disminución de los niveles de GSH, no limitando la actuación de los enzimas de su metabolismo. De esta manera el aumento de flavonoides en un estadio temprano puede reducir el daño a los tejidos.

Uno de los parámetros utilizados para valorar la actividad antioxidante del concentrado de cerveza ha sido medir su actividad frente al radical superóxido. Se observa que tanto en cerveza con alcohol o sin alcohol hay una inhibición del radical superóxido, pero dependiente de la concentración. Por lo tanto el

concentrado de cerveza ejerce su papel de “scavenger” del radical hidroxilo, tanto si es con alcohol o sin alcohol.

Los organismos animales utilizan los polifenoles a través de la dieta, en alimentos y bebidas como frutas, verduras, o productos derivados de ellos (como vino y cerveza). Simultáneamente, asociado a su consumo se detecta un aumento significativo de la capacidad antioxidante del plasma y del contenido de polifenoles en plasma. Nosotros hemos observado un aumento significativo de los niveles de polifenoles en plasma a diferentes tiempos. Dichos resultados indican que tanto en la cerveza con o sin alcohol hay una diferencia significativa a los 90 minutos de su administración, comparando con la situación basal. (Serafini, 1998; Wang, 2000; Rechner, 2002). Otra observación, que es corroborada por otros estudios, es que cuando se administra a las ratas concentrado de cerveza con alcohol, los niveles máximos de polifenoles en plasma son detectados a los 60 minutos, en cambio cuando se administraba el concentrado de cerveza sin los máximos se alcanzan a los 90 minutos. Parece ser que los polifenoles junto al alcohol pasan más rápidamente al plasma que si proceden de la cerveza sin alcohol (Lee et al., 1995; Unno et al., 1996; Hollman et al., 1996; Kivits et al., 1997; Aziz et al. 1998; Williamson et al., 2000;). El alcohol es una sustancia de bajo peso molecular, que pasa fácilmente por las membranas. Empieza a ser absorbido primero en la boca, luego en el esófago y el estómago hasta llegar finalmente al intestino que es el principal lugar de absorción. Además, el primer metabolito que se forma es el acetaldehído (ACCHO), que es un metabolito muy reactivo que será oxidado por la enzima Aldehídodeshidrogenasa. Existen varias

isoenzimas pero la más importante se encuentra a nivel de la mitocondria. Aunque hemos de tener en cuenta que el concentrado de cerveza con alcohol posee mayor nivel de polifenoles. Quizá la suma de los dos factores (presencia de alcohol y nivel de polifenoles) facilite la transferencia de los polifenoles a la circulación.

Paralelamente, para corroborar estos resultados determinamos la actividad antioxidante total. Un cambio en los niveles de antioxidantes totales es un biomarcador de estrés oxidativo. Así la capacidad antioxidante total (The Total Antioxidant Capacity, TAC o Total Radical-Trapping antioxidant parameter o TRAP en inglés), ha sido y es usada como una medida del estatus antioxidante, y expresa o comprende todos los procesos que previenen o retrasan la oxidación, la prevención en la formación de radicales y la inducción de los enzimas antioxidantes.

En nuestro grupo de investigación, hemos evaluado la capacidad antioxidante total en plasma a los diferentes tiempos 30, 60 y 90 minutos tras la suplementación del concentrado de cerveza. Al igual que los polifenoles, la actividad antioxidante total era significativamente mayor a los 90 minutos de la ingestión de la cerveza.

Nuestros datos están en concordancia con los datos aportados por Miyagi y colaboradores, y Giselli y colaboradores, los cuales han demostrado que la cerveza sin alcohol muestra una ligera tendencia a incrementar la actividad antioxidante a los 90 minutos. Sin embargo, durante los primeros 30 minutos, al

igual, que ocurre en otros estudios, no existen diferencias entre cerveza con alcohol o sin alcohol. A los 60 minutos hay un menor aumento para la actividad cuando la cerveza es sin alcohol pero la actividad se recupera, incluso aumenta a los 90 minutos (Miyagi et al., 1997; Ghiselli et al., 2000; Gorinstein et al., 2004; Nardini et al 2006). Estos resultados sugieren que los componentes polifenólicos y las melanoidinas de la cerveza pasan al plasma más eficientemente si proceden de la cerveza con alcohol que de la cerveza sin alcohol, y que su actividad antioxidante en plasma es mayor a los 90 minutos.

En cuanto a la absorción de los polifenoles existen datos limitados. En los alimentos la mayoría de los polifenoles se encuentran en forma glicosilada. Se sabe que existe un preabsorción en la boca, pero es escasa. Se conoce mejor la absorción de los flavonoides glicosilado, que puede ser muy rápida o muy lenta, pero entre el intervalo que ofrecen nuestros resultados. Puesto que estas sustancias no son hidrolizables por los ácidos del estómago pasan intactos al intestino delgado, dónde tiene lugar la absorción solamente de agliconas y algunos glucósidos, mientras que el resto son hidrolizados por la microflora del colon (Scalbert et al., 2000). Varios factores limitan esta absorción como son: el tamaño molecular, la solubilidad, el pKa, el tiempo de tránsito intestinal y la interacción con enzimas de la microflora intestinal (Stahl et al., 2002). Así pues, el contenido de alcohol en el concentrado de cerveza podría facilitar la absorción de los polifenoles, pero también podría frenar su actividad antioxidante durante un pequeño intervalo, ya que en su proceso de metabolización podría interaccionar con enzimas diferentes a los del concentrado sin alcohol.

También, poco es conocido sobre la biodisponibilidad de las melanodidinas pero estudios en ratas han permitido saber que se absorben a través del tracto gastrointestinal por difusión y son captados en el hígado, riñón, músculo y eliminados por la orina.

Como hemos comentado anteriormente, la adriamicina interacciona con el complejo I de la cadena de transporte electrónico e inhibe la función mitocondrial. Si tenemos en cuenta que el corazón es muy rico en mitocondrias esto implicaría un efecto cardiotóxico (Nicolay et al., 1987; Wallace, 2003).

La incidencia con la que la adriamicina presenta toxicidad cardíaca está estimada según la bibliografía en un 20% de los pacientes que reciben dosis superiores a los 500 mg/ m². La cardiotoxicidad que causa la ADR puede incluso manifestarse en etapas tardías, y no desarrollarse hasta meses o años después del tratamiento (Wallace, 2003; Berthiaume, 2005). De hecho hay estudios previos con mitocondrias aisladas que afirman que los efectos de la droga persisten una vez las membranas han sido lavadas y purificadas (Solem y Wallace, 1993; Solem et al., 1994).

Aunque existen estudios previos que prueban que todos los complejos de la cadena respiratoria se ven afectados (Nicolay et al., 1987), nuestro grupo de investigación ha medido la actividad del complejo I o NADH deshidrogenada, ya que este reduce la adriamicina a semiquinona, y es la primera ruta dónde se pueden formar radicales libres, como el ión superóxido y el ion hidroxilo (De Beer et al., 2001). Esta proteína es la primera en la cadena de transporte

electrónico, es decir, es el principal factor responsable de la fosforilación oxidativa.

Hemos estudiado la actividad del complejo I en las mitocondrias de hígado de rata, ya que es el órgano en el cual se metaboliza el alcohol, y en las mitocondrias de corazón de rata por la cardiotoxicidad que causa la adriamicina.

En las mitocondrias de hígado observamos una disminución en la actividad del complejo I respecto al grupo control cuando se administra adriamicina al animal de experimentación. Lo que corroboran otros estudios (Praet et al., 1988; Santos et al., 2002; Clementi et al., 2003; Ohkura et al., 2003). Cuando los animales tratados son suplementados con cerveza, los niveles de actividad del complejo I son similares a los del grupo control, poniendo en evidencia el efecto protector de la cerveza tanto con alcohol como sin alcohol.

Nuestros datos indican que la adriamicina presenta toxicidad más elevada a nivel cardíaco que a nivel hepático cuando las ratas son tratadas ($P < 0,005$), (Ohkura et al., 2003). Cuando los animales son tratados con adriamicina y suplementados con cerveza, al igual que los tratados con cerveza solamente, la actividad del complejo I experimenta una recuperación, llegando a conservar el nivel de actividad del grupo control o superarlo en el caso de que las ratas sean tratadas con suero fisiológico. Esto se ha puesto de manifiesto también en otros estudios donde se protege a la mitocondria de los efectos de la

adriamicina con un antioxidante como melatonina, vitamina E y carvedilol (Santos et al., 2002; Balli et al., 2004).

Ya se ha comentado que el complejo I reduce la adriamicina a radicales semiquinónicos que en presencia de oxígeno producen radicales hidroxilos y superóxidos. Pero además, este fenómeno está relacionado con la peroxidación lipídica mediada también por las reacciones redox del hierro. El hierro procedente de la ferritina reacciona con la adriamicina formando ADM- Fe^{3+} reduciendo el oxígeno e induciendo la formación de radicales libres y causando peroxidación lipídica de la membrana (Wallace, 1986). Este hecho puede alterar la estructura y la función de la membrana mitocondrial. Es decir, el daño al complejo I mitocondrial no solo puede estar provocado por la presencia de radicales libres generados por la adriamicina al ser reducida sino también por su reacción con el hierro. Hemos de tener en cuenta que el corazón (junto con el hígado) es uno de los órganos donde hay más cantidad de ferritina, además de un mayor número de mitocondrias, y por tanto hay un mayor daño que es reducido con la presencia de los flavonoides y las melanoidinas.

Sugerimos, a la vista de los resultados, que los flavonoides junto con las melanoidinas presentes en el extracto de cerveza, captan las especies oxigénicas y disminuyen su reacción con la membrana lipídica y enzimas del sistema mitocondrial. Además, el hígado biotransforma el 90% del etanol, cuando este se ingiere con los alimentos, la principal vía de transformación es a través de la alcoholdehidrogenasa que oxida el alcohol a aldehído. Este

enzima se encuentra mayoritariamente en el hígado. Existen varias isoformas. Junto a ella tenemos la aldehidodeshidrogenasa mitocondrial que se ocupa de la oxidación del acetaldehído dando como producto final el acetato. Este hecho podría implicar una mayor generación de EROs y explicar una disminución en la defensa antioxidante, razón que explicaría porque en el hígado es más efectivo el concentrado sin alcohol, si bien ambos tipos de cerveza son protectores. Este fenómeno se repite en la mayoría de los parámetros medidos (Shiva et al., 2005).

Así mismo, hemos medido también el nivel de actividad del complejo IV o la citocromo oxidasa, de gran importancia para la transferencia de electrones si se altera su actividad porque se irrumpe el flujo de electrones, favoreciéndose la producción de radicales libres. Varios artículos confirman que este complejo es uno de los más sensibles a la doxorubicina, y su actividad queda reducida en un 50% sobre los valores control cuando se aplica esta (Nicolay et al., 1987; Huertas et al., 1992). Por ello considerábamos fundamental determinar la actividad del complejo IV, tanto en mitocondrias de hígado como de corazón. Así pues, observamos una disminución importante de la actividad del complejo IV a nivel hepático cuando las ratas son tratadas con el antibiótico, debido a la sensibilidad del complejo, ($p < 0,005$) al igual que ocurre con el complejo I, tanto en hígado como en corazón. Cuando las ratas son suplementadas con cerveza los niveles de actividad vuelven a la normalidad ($P < 0,005$). En las mitocondrias de hígado, la disminución de la actividad del complejo es patente, pero menos obvia que en las mitocondrias de corazón, a causa de la toxicidad durante el tratamiento de la adriamicina que podría deberse a que el hígado de por sí es

un órgano detoxificador, y además posee una mayor cantidad de ferritina, que sería una fuente de hierro con la que podría reaccionar con el antineoplásico y dar lugar a la peroxidación lipídica (Praet et al., 1993; Wallace, 1986). Cuando las ratas tratadas son suplementadas con cerveza, los niveles de actividad del complejo IV en células cardíacas son aproximados a los valores control ($P < 0,05$), (Huertas et al., 1992). Si las ratas son suplementadas con cerveza y no tratadas, la actividad de este complejo aumenta, pero muy ligeramente, aunque no de forma significativa. Como se ha dicho anteriormente, el complejo IV se ve más afectado por el antibiótico adriamicina que el complejo I. Quizá este hecho se deba a que el complejo IV necesita para su normal funcionamiento un fosfolípido insaturado, la cardiolipina. Este fosfolípido insaturado es muy abundante y es el principal componente de la membrana mitocondrial interna. Desempeña un papel fundamental en la función de transporte en la membrana mitocondrial cardíaca, en su fluidez y estabilidad. Además, facilita la función de las enzimas bioenergéticas que se encuentran en la membrana. La cardiolipina es más sensible que otros fosfolípidos a ser oxidado debido a su elevado grado de insaturación (Jackson et al., 2002). Nicolay y Kruijff (1987), sugieren que el antibiótico adriamicina compite por el mismo sitio de unión en la membrana interna mitocondrial que la cardiolipina. Por todo ello, a la vista de los resultados, quizá los flavonoides y las melanoidinas del extracto de cerveza puedan actuar como scavenger y disminuyan la cantidad de especies oxigenicas reactivas, o bien impidan directamente la peroxidación lipídica de la cardiolipina. Al igual que ocurre con el complejo I, en el complejo IV también se observa una diferencia de la actividad en mitocondrias de hígado y corazón cuando son tratadas con el

concentrado de cerveza con alcohol. Este hecho se explica por el aumento de la generación de EROs al biotransformar el alcohol con la consecuente disminución de la defensa antioxidante (Shiva et al., 2005).

La Coenzima Q (CoQ) es un componente central de la cadena de transporte electrónico que coexiste como forma oxidada o ubiquinona y como forma reducida como ubiquinol. Para el mantenimiento del índice respiratorio dentro de la normalidad se requiere una concentración adecuada de la CoQ. Pudiendo una ligera disminución alterar el funcionamiento normal. Por otra parte, en los últimos años la CoQ ha despertado un gran interés, ya que el ubiquinol es un eficiente antioxidante endógeno liposoluble y su actividad como antioxidante no solo depende de su concentración sino también de su estado redox (Zhang et al., 1995; Lass et al., 1999; Tang et al., 2004).

En el presente estudio hemos determinado los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ en mitocondrias del hígado y del corazón frente al estrés oxidativo causado por el antibiótico. La CoQ₁₀ representa solo una parte menor de la fracción del CoQ. La forma que más prevalece en roedores es la CoQ₉, en cambio en humanos es la CoQ₁₀. El índice de las CoQ₉ y CoQ₁₀ varía de forma diferente según los tejidos. El órgano más rico en CoQ₉ y CoQ₁₀ es el corazón, ya que es uno de los órganos más energéticos dependiente de la CoQ (Tang et al., 2004).

En nuestros resultados los niveles de CoQ disminuyen cuando los animales han sido tratados con adriamicina. Si son suplementados con cerveza no se observa esta disminución. Al igual que en el trabajo de Gvozdjakova de 1999

los niveles de las CoQ en mitocondrias de corazón, se mantienen similares a los del grupo control al ser los animales tratados con antioxidantes y un tóxico, y disminuyen al ser tratados solamente con el tóxico. En un estudio realizado, por Valls et al., (1994) en hepatocitos de rata, se obtienen resultados similares. En él los niveles de la CoQ₁₀ disminuyen mucho menos que los de la CoQ₉, resultado que también se refleja en el trabajo presente. Esta disminución de los niveles de ambas coenzimas cuando son tratados con el antibiótico podría deberse, primero, a que se daña la membrana interna de la mitocondria que alberga la cadena de transporte electrónico debido al aumento de los radicales libres producidos por el antibiótico, con la consecuente alteración de su actividad. Segundo, ser consecuencia de una disminución en su biosíntesis, ya que hay que recordar que la adriamicina daña al ADN (Baghi et al., 1995; Signal et al., 1997; Gerwitz, 1999). Ante estos dos motivos los flavonoides y las melanoidinas del extracto de cerveza podrían ofrecer protección, como captadores de radicales libres, protegiendo a la membrana mitocondrial y al ADN.

Hay que destacar en nuestros resultados que, en mitocondrias de hígado, el aumento de las CoQ, tanto la CoQ₉ como la CoQ₁₀, en presencia del extracto de la cerveza sin alcohol experimenta un aumento significativamente mayor en comparación con la cerveza con alcohol, fenómeno que ocurre al contrario en mitocondrias de corazón. Ello podría indicar un menor efecto protector, en el mantenimiento de este antioxidante en el caso de este tipo de cerveza, quizá porque el alcohol facilite su transporte, pero además se ha de tener en cuenta que las mitocondrias de corazón contienen más cantidad de CoQ₁₀ que otro

tejido (Tang et al., 2004). También hay que considerar que el hígado detoxifica el 90% del etanol a través de tres vías, siendo la principal la ruta de la alcoholdehidrogenasa (ADH) y este hecho puede generar mayor cantidad de EROs, disminuyendo así la defensa antioxidante (Shiva et al., 2005).

Durante el proceso de la peroxidación lipídica se forman intermediarios y varios productos finales tales como el malondialdehído y 4-hidroxinonenal. La actividad biológica del MDA, y otros aldehídos como el 4-HNE, incluye entrecruzamiento con proteínas y ADN, alterando su función y su actividad. Ambos productos de la peroxidación lipídica han mostrado toxicidad en los tejidos, el MDA puede reaccionar con grupos amino y grupos tioles. Además hay que tener en cuenta que los aldehídos son más difusibles que los radicales libres, pudiendo dañar a estas moléculas en lugares diferentes a los de su origen. Si bien también los aldehídos son eliminados rápidamente por los enzimas que controlan el metabolismo celular

Nuestro grupo de investigación ha medido los niveles de MDA + 4-HNE y hemos observando un discreto aumento de los valores de dichas sustancias en las mitocondrias hepáticas cuando los animales eran tratados con adriamicina. Los animales que además de tratados eran suplementados con cerveza, no mostraban diferencias significativas con el grupo control ni con el grupo tratado pero no suplementado. Sin embargo, en las mitocondrias cardíacas, se producía un aumento significativo tras la administración del antibiótico, que explica en parte uno de los efectos tóxicos del antineoplásico, la cardiotoxicidad (Chaiswing et al., 2004; Sakurai et al., 2006). Cuando los animales eran

tratados y suplementados con cerveza, los niveles disminuían, llegando a ser similares a los de la situación basal.

Puesto que tanto el MDA y el 4-HNE son productos de la peroxidación lipídica, el extracto de cerveza podría actuar disminuyendo ésta con la consecuente disminución de los niveles de MDA y de 4-HNE, pero este hecho solo ocurre en mitocondrias de corazón, siendo más evidente cuando estas son tratadas con el extracto de cerveza con alcohol. Que este fenómeno no ocurra en mitocondrias de hígado y sólo ligeramente en las mitocondrias de corazón, podría ser explicado por la difusibilidad de los aldehídos, sin dar la oportunidad a los flavonoides y las melanoidinas del extracto de cerveza de captar al MDA y al 4-HNE (Halliwell y Chirico, 1993; Feng et al., 2004).

Por otra parte, el contenido de grupos carbonilo es usado como biomarcador de oxidación proteica. Su uso tiene algunas ventajas respecto de las determinaciones de otros productos de la oxidación, ya que se forman relativamente pronto. La mayoría de los ensayos para la detección de los grupos carbonilo implican la derivatización del grupo carbonilo con la 2,4-dinitrophenylhidrazina (DNPH), (Dalle-Donne et al., 2003).

De esta forma, hemos estudiado el contenido en grupos carbonilo, como marcador de la oxidación proteica. De manera similar a lo que ocurre con la peroxidación lipídica, los grupos carbonilo aumentan significativamente en las mitocondrias de hígado ($P < 0,005$) respecto a la situación basal cuando las ratas son tratadas con adriamicina. Al ser suplementadas con el extracto de

cerveza, los valores alcanzados son similares a los basales (Yagmurca et al., 2003; Fadillioglu et al., 2004; Valls-Bellés et al., 2004; Yagmurca et al., 2004;).

Por otra parte, las especies oxigenas reactivas, alteran al ADN lesionándolo con producción de rotura de cadenas y modificación de bases. La modificación de bases, es una de las lesiones más críticas que causan los radicales libres, ya que pueden dar lugar a la mutagénesis. La cuantificación de la modificación de la base 8-oxo-dGuo se ha convertido en uno de los biomarcadores de la oxidación del ADN. Por tanto, también hemos determinado los niveles de la base 8-oxo-dGuo como marcardor de daño al ADN.

Tras el tratamiento de las ratas con ADR se observa un incremento significativo ($P < 0,05$) de las bases modificadas, en el ADN de hígado pero sobre todo en el ADN del corazón ($p < 0,005$). Estos resultados coinciden con un estudio llevado a cabo por Muller en 1997. Cuando las ratas tratadas son suplementadas con extracto de cerveza este incremento no ocurre, aunque era más evidente en el caso de la cerveza sin alcohol en el ADN del corazón (Leighton et al., 1999; Brennan et al., 2000; Jacobson et al., 2000). Hay que resaltar que tanto en el ADN de hígado como de corazón, la base 8-oxo-dGuo no se incrementa tras la suplementación con cerveza y suero. Por lo tanto la cerveza no ejerce ningún efecto dañino sobre el ADN, si bién disminuye los niveles de la base 8-oxo-dGuo y evita que haya ADN oxidado, lo que amplificaria el estrés oxidativo y disminuiría la expresión de proteínas importantes como las que reparan o eliminan las bases modificadas (Rivero D et al, 2005; Van Houten et al., 2006).

Se acepta generalmente que la vitamina E forma parte de los componentes que protegen a las biomembranas del estrés oxidativo. Se sabe que actúa conjuntamente con las CoQ como defensa antioxidante. También se cree que reacciona directamente con los radicales inhibiendo la peroxidación lipídica. Por tanto la alteración en la cantidad de la vitamina E contribuye a los cambios en la función mitocondrial (Gille et al., 2001; Kamzalov et al., 2004).

Hemos determinado los niveles de vitamina E en su forma α -tocoferol detectándose una disminución cuando las ratas son tratadas con adriamicina. La vitamina E disminuye porque actúa de “scavenger”, capta a las especies reactivas oxigenas. Además hay que tener en cuenta la disminución del CoQ que se ve afectado por el antibiótico y que actúa reduciendo la forma oxidada de la vitamina E para que pueda volver a captar radicales. Cuando se les suplementa con cerveza los valores de α -tocopherol están más elevados (Geeth et al., 1992; Matsura et al., 1992; Kehrer et al., 1994; Gvozdjakova et al., 1999). A partir de estos resultados se ha de diferenciar la cantidad de α -tocoferol en mitocondrias de hígado o de corazón. En ambos tipos de mitocondrias los niveles de α -tocoferol aumentan cuando las ratas tratadas con el antineoplásico son suplementadas con cerveza, pero en las mitocondrias de hígado tanto en las ratas tratadas y suplementadas con cerveza sin alcohol, como las no tratadas y suplementadas, este aumento es mucho más significativo y recupera los niveles control. Este hecho, como ya se ha comentado anteriormente, se debe a que el hígado detoxifica el 90% del alcohol en el cuerpo y genera un aumento de los radicales libres con una consecuentemente disminución o consumo de la vitamina E (Shiva et al.,

2005). En el caso de las mitocondrias de corazón, el nivel de α -tocoferol aumenta de manera similar a las mitocondrias hepáticas, pero no se aprecian diferencias en las ratas tratadas y suplementadas con cerveza con o sin alcohol (Kehrer et al., 1994). Hemos de tener en cuenta que el corazón, junto con el resto de órganos, solo biotransforma el 10% del alcohol ingerido, por ello aunque existen diferencias debido al alcohol en el hígado, el efecto final de ambos concentrados de cerveza, tanto con alcohol como sin alcohol es protector.

5.- CONCLUSIONES.

5.- CONCLUSIONES.

1.- La cerveza es un producto con una capacidad antioxidante global significativa, independiente, en principio, del tipo de cerveza.

2.- La fracción con mayor contenido de compuestos fenólicos (F3) aumenta la viabilidad celular (LDH) y los niveles de ATP, disminuye el daño a macromoléculas e incrementa la defensa antioxidante (GSH).

3.- Tras la ingesta de cerveza se observa un incremento, tanto en los niveles de polifenoles totales como en la actividad antioxidante del plasma, que es máxima a los 60 minutos postingesta para la cerveza con alcohol y a los 90 para la cerveza sin alcohol.

4.- La suplementación dietética de cerveza en el animal de experimentación reduce los efectos tóxicos de la adriamicina en la cadena de transporte electrónico.

5.- La suplementación dietética de cerveza en el animal de experimentación reduce los efectos tóxicos de la adriamicina en el daño inducido a proteínas, lípidos y ADN.

6.- La suplementación dietética de cerveza en el animal de experimentación aumenta los niveles de α -tocoferol en las mitocondrias de hígado y corazón sometidas a estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

7.- La suplementación dietética de cerveza, a nivel del animal de experimentación contrarresta los efectos cardiotoxicos y hepatotóxicos del antineoplásico adriamicina.

6.- BIBLIOGRAFIA.

6- BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Abudu N, Miller JJ, Attaelmannan M and Levinson SS. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta* 2004; 339(1-2): 11-25.
- 2.- Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolfram S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol* 1996; 81: 9443-55.
- 3.- Ahn b, Rhee Sg, Stadtman ER. Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorometric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein and polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1987; 161(2): 245-257.
- 4.- Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006; 65(3): 278-90.
- 5.- Ameen M, Ahamd I, Musthpa MS, Rahman Q. Cytotoxic effect and role of exogenous in rat hepatocytes in vitro. *Toxicol in vitro* 2004; 18(4): 419-425.
- 6.- Ames J, Caemmerer B, Veliesek J, Cejpek K, Obretenov C and Cioroi M. The nature of melanoidins and their investigation. *Melanoidins in food and health. European Communities* 1999; 1:13-22.
- 7.- Ames BN, Viguie CA, Frei B, Shinenaga MK, Paches L and Brooks GA. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 1993; 75(2), 566-575.
- 8.- Ames BN, Frei B, Stocker R and England L. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990; 264: 155-163.
- 9.- Ames BN, Frei B, Stocker R. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85(24): 745-752.

BIBLIOGRAFIA

- 10.- Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1973; 90: 7915-7922.
- 11.- Arcamone F, Verini MA, Cassazza AM, Fioretti A. Some structural requirements for the antibiotic action of distamycins. *FEBS Lett* 1971; 16(4): 249-252.
- 12.- Arimoto-Kobayashi S, Sugiyama C, Harada N, Takeuchi M et al. Inhibitor effects of beers and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogenesis. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 221-230.
- 13.- Auroma IO, England TG, Jenner A, Halliwell B. Determination of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. Effect of derivatization conditions on artifactual formation of certain base oxidation products. *Free Radic Res* 1998; 29(4): 320-321.
- 14.- Aziz AA, Edwards CA, Lean ME, Crozier A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 1998; 29(3): 257-269.
- 15.- Bagchi D, Sen C, Ray S, Das D, Bagchi M, Preuss H et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mut Res* 2003; (87-97): 523-524.
- 16.- Bagchi D, Bagchi EA, Hassoun J, Kelly J, Stohs SJ. Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology* 1995; 95: 1-9.
- 17.- Balli E, Mete UO, Tuli A, Tap O, Kaya M. Effect of melatonina on the cardiotoxicity of doxorubicin. *Histol Histopathol* 2004; 19(4): 1101-8.

BIBLIOGRAFIA

- 18.- Bamforth CW. Nutritional aspects of beer. A review. *Nutr Res* 2002; 22: 227-237.
- 19.- Bannister JV. Foreword. *Handbook of methods of oxygen radical research*. Boca Ratón, Florida USA: RA Greenwald ed. CRC Press. 1986.
- 20.- Barogi S, Buracca A, Carazonni M, Parenti Castelli G and Lenaz G. Effect of the oxidative stress induce by adriamycin on rat hepatocyte bioenergetics during ageing. *Mech Ageing Dev* 2000; 13(1): 1-21.
- 21.- Beckman KB, Ames BN. The free radicals theories of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 547-581.
- 22.- Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr* 2003; 133(10): 3248-3254S.
- 23.- Benov L, Szejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(7): 826-831.
- 24.- Bergmeyer HU and Bernt T. Lactatedehydrogenase, assay with pyruvate and NADH. *Methods of Enzymatic analysis*. Ed. Bergmeyer.1974. Pp. 574-579.
- 25.- Bertsche V. Induction and repair of x-ray damage in mammalian cell cultures treated with membrane-active drugs. *Br.J. Cancer* 1984; 49: 121-130.
- 26.- Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovascular Toxicol* 2005; 5(3): 257-67.
- 27.- Berry MN and Friend DS. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biology* 1969; 43: 506-520.
- 28.- Betteridge J. What is de Oxidative Stress?. *Metabolism* 2000; 49 (2) S1: 3-8.

BIBLIOGRAFIA

- 29.- Booser DJ, Hortobahyi GN. Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 1994; 47(2): 223-258.
- 30.- Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Kyle JA and Collins AR. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. *Eur J Nutr* 2000; 39: 213-223
- 31.- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56: 317-333.
- 32.- Brennan LA, Morris GM, Wasson GR, Hannigan BM, Barnett YA. The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human. *Br J Nutr* 2000; 84(2): 195-202.
- 33.- Brigelius R, Muckel C, Akerboom TD and Sies H. Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983 1; 32(17): 2529-2534.
- 34.- Brigelius-Flohé R and Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999; 13: 1145–1155.
- 35.- Bulinsky R, Bloniarz J, Koktycz N, Kot A. Nutritive and energy values of Polish beer. *J Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 1986; 19:73-76.
- 36.- Buxton G, Greenshock C, Helman W and Ron A. Critical review of rate constants for reaction of hydrated electrons hydrogen atoms and hydroxyl radicals. *Phys Chem* 1988; 17: 513-886.
- 37.- Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G, Grattagliano I, Pertosa A, Nardo B et al. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res* 2005; 124(2):160-168.

BIBLIOGRAFIA

- 38.- Carlsen SA, Schmell E, Weigel PH, Roseman SJ. The effect of isolation on the surface properties of isolated rat hepatocytes. *Biol Chem* 1981; 256: 8058-8052.
- 39.- Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate and α -tocopherol. *Circ Res* 2000; 87: 349.
- 40.- Casares R, Garcia-Puertas M, Masoud TA, y Garcia-Sanchez A. Mineral elements in bottled and Canned Spanish beer. *Anal Bromatol* 1979; 31(3/4): 279-294.
- 41.- Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignan and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1044-1062.
- 42.- Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, Mordente A, Misiti F. Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Research* 2003; 23(3B): 2445-2450.
- 43.- Clifford MN. Anthocyanidins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1063-1072.
- 44.- Chaiswing L, Cole MP, St Clair DK, Ittarat W, Szweda Li, Oberley TD. Oxidative damage precedes nitrate damage in adriamycin-induced cardiac mitochondrial injury. *Toxicol Pathol* 2004; 32(5): 536-547.
- 45.- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59(3): 527-605.
- 46.- Chance B. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria V. The energy transfer pathway. *J Biol Chem* 1961; 236: 1569-1577.

BIBLIOGRAFIA

- 47.- Chance B. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria II. General properties of adenosine triphosphate-linked oxidation of cytochrome and reduction of pyridine nucleotide. *J Biol Chem* 1961; 236: 1544-1554.
- 48.- Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J and Frei B. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrin Metab* 2000; 279(6): E1406-12.
- 49.- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-T substitutions. *J Biol Chem* 1992; 267(1): 166-172.
- 50.- Chung MH, Kasai H, Jones DS, Inoue H, Ishikawa H, Ohtsuka E et al. "An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA". *Mutat Res* 1991; 254(1): 1-12.
- 51.- Chuyen NV. Maillard reaction and food processing. Application aspects. *Adv Exp Med Biol* 1998; 434: 213-235.
- 52.- Ciesielska E, Strudizian K, Wasoska M, Oszapuwic I, Sznigiero I. Cytotoxicity cellular uptake and DNA damage by daunorubicin and its new analogues with modified daunosamina moiety. *Cell Biol Toxicology* 2005; 21(3-4): 139-147.
- 53.- Dalle-Donnen I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329(1-2): 23-38.
- 54.- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals. A question of balance. *FEBS letter* 1995; 369 (2-3): 131-5.

BIBLIOGRAFIA

- 55.- Davies KJA. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995; 61: 1-31.
- 56.- Davies KJ and Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclins by cardiac mitochondria. I Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986; 261: 3060-3067.
- 57.- Day AJ, Canada FJ, Diaz JC. Dietary flavonoid and isoflavona glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizinhydrolase. *FEBS Letter* 2000; 468: 166-170 .
- 58.- Day AJ, DuPont MS, Ridley S. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glycosidase activity. *FEBS Letter* 1998; 436: 71-5.
- 59.- De Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *European Journal of Pharmacology* 2001; 415: 1-11.
- 60.- De la Asunción JG, Del Olmo ML, Gomez-Cambronero LG, Pallardo FV and Viña JV. AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: protective effect of vitamins C and E. *Life Sci* 2004; 76: 47-56.
- 61.- Demple B, and Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 915-948.
- 62.- Di Stefano y Cavrero MC. Frazionamiento dei polifenoli dei vini rossi. *L'enotecnico* 1990; 26: 99-106.
- 63.- Dhremer E, Valls V, Muñoz P, Cabo J, and Sáez GT. 8-Hydroxydeoxyguanosine and antioxidant status in rat liver fed with olive and corn oil diets. Effect of ascorbic acid supplementation. *J Food Lipids* 2001; 8: 281-294.

BIBLIOGRAFIA

- 64.- Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D and Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J* 1998; 332: 251-255.
- 65.- Dittrich R, El-Massry F, Kunz K, Rinaldi F, Peich, C, Beckmann MW, Pischetsrieder M. Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 3900-04 .
- 66.- Dives HM, Hrycyna CA, Chemielewski J. Bivalent probes of the human multidrug transporters p-glycoprotein. *Biochemistry* 2006; 45(38): 11695-702.
- 67.- Dizdaroglu M. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 1994; 234: 3-6.
- 68.- Domenicali M, Vendemiale G, Serviddio G, Grattagliano I, Pertosa AM, Nardo B. Oxidative injury in rat fatty liver exposed to ischemia-reperfusion is modulated by nutritional status. *Dig Liver Dis* 2005; 37(10): 786-92.
- 69.- Drew B, Leeuwenburgh C. Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and a caloric restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285(5): 259-267.
- 70.- Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- 71.- Echelin P. Phytochemical phylogenetic. Ed. by JB Holborne. New York: Academic Press. 1970.
- 72.- Elaut G, Henkens T, Papelu P, Srychers S, Vinken M, Vanhaecke T et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* 2006; 7(6): 629-60.

BIBLIOGRAFIA

- 73.- Elgendy FM, Abou-Seif MA. Photolysis and membrane lipid peroxidation of human erythrocytes by m-chloroperbenzoic acid. *Photochem Photobiol* 1998; 277(1): 1-11.
- 74.- Erbersdobler HF, and Faist V. Metabolic transit of Amadori products. *Foods* 2001; 3: 177-181.
- 75.- Evans PJ, Cecchini R, Halliwell B. Oxidative damage to lipid and α -antiproteinase by phenylbutazone in the presence of haem proteins: protection by ascorbic acid. *Biochem Pharmacol* 1992; 44(5): 98-4.
- 76.- Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-Sensitive K^+ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. *J Bioenerg Biomembr* 2005; 37(2): 75-82.
- 77.- Fadillioglu E, Oztas E, Erdogan H, Yagmurca M, Sogut S, Ucar M. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2004; 24(1): 47-52.
- 78.- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and Nutrition. *Nutrition* 2002; 18(10): 872-9.
- 79.- Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; 32(6): 804-12.
- 80.- Faist V, Erbersdobler HF. Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Ann Nutr Metab* 2001; 45: 1-12.
- 81.- Favreau LV, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar

BIBLIOGRAFIA

- aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1991; 266: 4556-61.
- 82.- Feig DI, Reid TM, Loeb LA. Reactive oxygen species in tumorogenesis. *Cancer Res* 1994; 54(Suppl.7): 1890-1894.
- 83.- Feng Z, Hu W, Tang MS. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(23): 8598-602.
- 84.- Fiotakis K, Valavanidis A. Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OhdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxiguanosine by transition of particule matter in relation to metal content and redox activity. *Free Radic Res* 2005; 39-1071-1081.
- 85.- Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Loft S. 8-Hydroxydeoxyguanosine in vitro: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med* 1992; 13(2): 121-6.
- 86.- Floyd RA, Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 2001; 28(10): 1456-1462.
- 87.- Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11(9): 1447-1450.
- 88.- Floyd RA, West M, Eneff KL, Hogsett W, Tingey DTH. Hidroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophys* 1988; 262: 266-272.
- 89.- Floyd RA, Watson JJ, Wog PK, Altmiller DH, Rockard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxiguanosine. Sensitive and mechanims of formation. *Free Radic Res Commun* 1986; 1(3): 163-172.

BIBLIOGRAFIA

- 90.- Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritienei A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem* 1999; 47(3): 1935-1940.
- 91.- Fridovich I. Cytochrome C. En: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. USA: Florida, Boca Ratón. Greenwald, R.A (Ed) 1986. p. 213-215.
- 92.- Fridovich I. Superoxide Dismutase in Biology and medicine. En: *Anne P Pathology of Oxygen* Londrés: Academic Press. 1982. p.1-21.
- 93.- Fridovich I. Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. *Ciba Found Symp* 1978; 65: 1-4.
- 94.- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-880.
- 95.- Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. *Free Rad Biol* 1976; 6(1); 239-277.
- 96.- Fridovich I. Superoxide and evolution. *J. Biochem Biophys*,1974; 1: 1-37.
- 97.- Fridovich I. Superoxide Dismutase. *Adv Enzymol* 1974; 41: 35-97.
- 98.- Fridovich I, Handler P. Detection of free radicals generated during enzymic oxidations by the initiation of sulfite oxidation. *J Biol Chem* 1961; 236: 1836-40.
- 99.- Friedman M. Food browning and its prevention: an overview. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 631-653.
- 100.- García Taberner MD. Aporte Dietario de Arginina y Patología Diabética. [Tesis doctoral]. Universidad de Valencia. Facultad de Medicina y Odontología. (2000).
- 101.- Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione: Hepatocellular survival-death switch. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(6)S3: S3-6.

BIBLIOGRAFIA

- 102.- Gasbarrini A, Addolorato G, Simoncini M, Gasbarrini G, Fantozzi P, Mancini F. Beer effects oxidative stress due to ethanol in rats. *Dig Dis Sci* 1998; 43(6): 1332-8.
- 103.- Gasowski B, Leontowicz M, Leontowicz M, Katrich E, Lojek A, Ciz M et al. The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free radicals. *J of Nutr Biochem* 2004; 15: 527-533.
- 104.- Geeth A, Devi CS. Effect of doxorubicin on heart mitochondrial enzymes in rats. A protective role for alpha-tocopherol. *J Exp Biol* 1992; 30(7): 615-18.
- 105.- Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 2005; 41(13): 1941-54.
- 106.- Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 727-741.
- 107.- Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P. and Scaccini C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 76-80.
- 108.- Ghiselli A, Serafini M, Natella F. and Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(11): 1106-1114.
- 109.- Gilbert DL. Oxygen and living processes. An interdisciplinary approach. New York: Springer Verlag.1981.

BIBLIOGRAFIA

- 110.- Gille L, Staniek K, and Nohl H. Effects of tocopheryl quinone on the heart: model experiments with xanthine oxidase, heart mitochondria, and isolated perfused rat hearts. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(8): 865-876.
- 111.- González ML, Muñoz P y Valls V. En: *Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo*. Madrid: Editada por El Centro de Información Cerveza y Salud. Monografía. 2001.
- 112.- Goodman J, Hochstein P. Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77: 797-803.
- 113.- Gorinstein S, Zemser M, Weisz M, Haruenkit R, Trakhtenberg S. The influence of dry matter of different alcoholic beverages on lipids, proteins and antioxidant activity in serum of rats. *J Nutr Biochem* 1998; 15(9):131-135.
- 114.- Gvozdjakova A, Simko F, Kucharska J, Baraunova Z, Pesenek P, Kyselovic J. Captopril increased mitochondrial coenzyme Q₁₀ level, improved respiratory chain function and energy production in the left ventricle in rabbits with smoke mitochondrial cardiomyopathy. *Biofactors* 1999; 10(1): 61-5.
- 115.- Grajeda-Cota P, Ramirez-Mares MV, Gonzalez de Mejía E. Vitamin C protects against cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro* 2004; 18(1): 13-9.
- 116.- Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A et al. Biomarkers. *Mol Asp Med* 2002; 23: 101-208.
- 117.- Griffiths HR, Unsworth J, Blake DR, Lunec J. *Free radicals in chemistry, pathology and medicine*. London: Richeliue.1988. p.439-54.

BIBLIOGRAFIA

- 118.- Gupta RC. Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 6943-6947.
- 119.- Gutteridge JM, Bannister JV. Copper + Zinc and Manganese superoxide dismutase inhibit deoxyribose degradation by the superoxide driver. Fenton reaction and two different stages. Implications for the redox stages of copper and manganese. *Biochem J* 1986; 234(1): 225-8
- 120.- Gutteridge JMC, Quinlan GJ. Free radical damage to deoxyribose by anthracycline, aureolic acid and aminoquinone antitumor antibiotics. An essential requirement for iron, semiquinones and hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 1985; 34.
- 121.- Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH. Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo?. *IUBMB Life* 2005; 50(4-5): 251-257.
- 122.- Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?. *FEBS letter* 2003; 541: 3-6.
- 123.- Halliwell B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review Nutrition* 1996; 16: 33-50.
- 124.- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease. Curiosity, cause, or consequence?. *The Lancet* 1994; 334: 721-724.
- 125.- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation. Its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl): 15S-724; discussion 724S-725S
- 126.- Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal iron-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Letter* 1992; 307(1): 108-12.

BIBLIOGRAFIA

- 127.- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of the radicals and catalytic metal ions in human disease an overview. *Methods of Enzimol* 1990; 186(1-2): 9-19.
- 128.- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in biology and Medicine*. Second ed. New York: Oxford University Press. 1989.
- 129.- Halliwell B. Halliwell (eds). *Oxygen radicals and tissue injury*. Proceedings of an Upjohn Symposium. 1988.
- 130.- Halliwell B, Cross CE, Borish ET, Pryor WA. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107(4): 526-545.
- 131.- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test Tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165: 215-219.
- 132.- Hamilton B, Gutteridge JMC, Auroma O. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165: 215-219.
- 133.- Harman D. Free radical theory of aging: role of free radicals and origination and evolution of life, aging and disease proceses. *Free radicals Aging, and Degenerative Diseases*. Alan R. Liss, Incl. New York: 1986. pp. 3-51.
- 134.- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 572-584.
- 135.- Hensley K, Floyd RA. Reactive Oxygen Species and Protein Oxidation in Aging: Alook Back, A Look Ahead. *Arch of Biochem and Biophys* 2002; 397(2): 377-383.
- 136.- Hertog MG, Feskens EJM, Kromhout D. Antioxidant flavonols from tea. *Food Sci Nutr* 1997; 37(8): 719-738.

BIBLIOGRAFIA

- 137.- Hodge JE. Dehydrated foods: Chemistry of Brownig reactions in model systems. *J Agric Food Chem* 1953; 15: 928-943.
- 138.- Hoffman T. In *Chemistry and Physiology of Food Colorants*. New Orleans: ACS Symposium Series. 2000.
- 139.- Hoffman T. Characterization of the chemical structure of novel colored Maillard reaction products from furan-2-carboxaldehyde and amino acids. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 932-940.
- 140.- Hollman PC, Katan MB. Health effects and bioavailability of dietary flavonol. *Free Radic Res* 1999; 31S: 75-80.
- 141.- Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and bioactivity of flavonoids. In: *Flavonoids in health and disease*. New York: Dekker, M., (Ed.). 1998. p. 447-467.
- 142.- Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letter* 1997; 418: 152-156.
- 143.- Hollman PCH, van Tripj JMP, Buysman MNCP, van der Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM, et al. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 703-707.
- 144.- Hong YM, Kim HS, Yoon HR. Serum lipid and fatty acid profiles in adriamycin-treated rats after administration of L-carnitine. *Pediatr Res* 2002; 51(2): 249.
- 145.- Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 1997; 54(4): 1-7.

BIBLIOGRAFIA

- 146.- Hough JS, Briggs DE, Stevens R, Young TW. Malting and brewing science (2nd. Ed). II Hopped wort and beer. London: Chapman and Hall. 1982.
- 147.- Hsieh Y, Guan Y, Tu C, Bratt Pj, Angerhofer A, Lepock JR, et al. Probing the active site of human superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry* 1998; 37(14): 4731-19.
- 148.- Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. *Proc Nutr Soc* 2003; 62 (2): 469-78.
- 149.- Huertas JR, Battino M, Mataix F, Littarru GP, Lenaz G. Cytochrome oxidase induction following oxidative stress produced by adriamycin in the heart of rats fed olive oil. *Cardiologia* 1992; 37(10): 705-707.
- 150.- Husain K, Mejía J, Lalla J, Kazim S. Dose response of alcohol-induced in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharm Res* 2005; 337-343.
- 151.- Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakarawa Y. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1998; 273(4). 1990-1997.
- 152.- Jacksons MJ, Papa S, Bolaños J, Bruckdofer R, Carlsen H, Elliott RM. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gen induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med* 2002; 23(1-3): 209-85.
- 153.- Jacobson JS, Begg MD, Wang LW, Wang Q, Agarwal M, Norkus E. Effects of a 6-month intervention on DNA damage in heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9.
- 154.- Johnston CS, Meyer CG, Srilankshmi JC. Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy. *Am J Clin Nutr* 1993; 58(1): 103-5.

BIBLIOGRAFIA

- 155.- Jones DP, Coates RJ, Flagg EW, Eley JW, Block G, Greenberg R et al. Glutathione in foods listed in the National Cancer Institute's Health Habits and History Food Frequency Questionnaire. *Nutr Cancer* 1992; 17(1): 57-55.
- 156.- Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Fukada S. DNA modifications by the mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis* 1998; 19(8): 1459-1465.
- 157.- Kamiya H, Kasai H. Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation. *J Biol Chem* 1995; 270(33): 19446-19450.
- 158.- Kamzalov S, Sohal RS. Effect of age caloric restriction on coenzyme Q and α -tocopherol levels in the rat. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1199-1205.
- 159.- Kenneth B, Ames BN. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Phys Rev* 1998; 78(2): 547-581.
- 160.- Kehrer JP and Lund LG. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 65-75.
- 161.- Krebs HA, Cornella NW, Lund P and Hems R. Regulation of hepatic metabolism. Munksgaard, Copenhagen, Lundquist, F. Tygstrup N Eds. 1974
- 162.- Krebs HA, Lund P, Edwards H. Cell populations. *Methodological surveys (B)*. Biochemistry, Chichester, West Sussex, England. Publisher 1979; 9: 1-6.
- 163.- Kim H, Son K, Chang HW and Kang S. Anti-inflammatory plant-flavonoids and cellular action mechanism. *J Pharmacol Sci* 2001; 96: 229-45.
- 164.- Kivits GA, van der Sman FJP, Tijburg LBM. Analysis of catechins from green and black tea in humans: a specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids. *Int J Food Sci Nutr* 1997; 48: 387-392.

BIBLIOGRAFIA

- 165.- Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Report* 2001; 6(4): 229-234.
- 166.- Lamprecht W, Trautschold I. Adenosin triphaste (ATP), determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer. Ed 1974. p: 2101-2110.
- 167.- Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 2848-52.
- 168.- Langguth P, Ofer M, Wolfram S, and Koggel A. Modulation of drug transport by selected flavonoids: Involvement of P-glycoprotein and OCT?. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25: 263-271.
- 169.- Lass A and Sohal RS. Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammanlian species. *Free Radic Biol Med* 1992; 27: 220-226.
- 170.- Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemol Biomarkers Prev* 1995; 4(4): 393-4.
- 171.- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analisis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 1973; 32: 302-314.
- 172.- Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Perez DD, Strobel P, San Martín A et al. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25(2-3): 133-41.
- 173.- Leighton F. Polifenoles Vegetales. *Biol Res* 2000; 33(2): 6.

BIBLIOGRAFIA

- 174.- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In Parker L and Glazer A (Eds.). *Methods in Enzymology*. Academic Press. 1990. Vol 186. p: 464-479.
- 175.- Lian Z, Niwa K, Tagami K, Hashimoto M, Gao J, Yokoyama Y et al. Preventive effects of isoflavones, genistein and daidzein, on estradiol-17beta-related endometrial carcinogenesis in mice. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92(7). 726-734.
- 176.- Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Mol Aspects Med* 2002; 23:1-38.
- 177.- Liu F, Oi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* 1987; 60(10): 763-771.
- 178.- Lipshultz SE, Cohen H, Colan SD and Herman EH. The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. *Leuk Lymphoma* 2006; 47(8): 1454-8.
- 179.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. *J Bio Chem* 1951; 193: 265-275.
- 180.- Lleídas F, Rangel P and Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 1998; 10630-10637.
- 181.- Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(5): 885-8.
- 182.- Lugasi A, Hovari J. Antioxidant properties of commercial alcoholic and non-alcoholic beverages. *Food* 2003; 47: 79-86.
- 183.- Lugasi A. Polyphenol content and antioxidant properties of beer. 2003; 32(2): 181-192.

BIBLIOGRAFIA

- 184.- Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Boca Raton, Florida; CRC Press. 1990.
- 185.- Majima HJ, Oberley Td, Fukurawa K, Mattson MD, Yen HC, Szveda Li. Prevention of mitochondria injury by manganese superoxide dismutase for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem* 1998; 273(14): 8217-24.
- 186.- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols. Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-47.
- 187.- Mano M. Vinorelbine in the management of breast cancer: New perspectives, revised role in the era of targeted therapy. *Cancer Treat rev* 2006; 32(2): 106-18.
- 188.- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87(1): 206-10.
- 189.- Mataix JV. Nutrición y alimentación humana. Situaciones fisiológicas y patológicas. Vol. 2. Ed 1ª. Ergon. Madrid: Majadahonda. 2002.
- 190.- Mates JM, Sánchez-Jimenez F. Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: d339-345.
- 191.- Mates JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem* 1999; 32(8): 595-603.
- 192.- Mathews CK, van Holde KE. Bioquímica. 2ª ed. España McGraw Hill interamericana. 1998.
- 193.- Matsura T, Yamada K, Kawasaki T. Difference in antioxidant activity between coenzyme Q₉ and reduced coenzyme Q₁₀ in the cell: studies with isolated rat and guinea pig hepatocytes treated with a water-soluble radical initiator. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1123(3): 309-315.

BIBLIOGRAFIA

- 194.- Mayer O, Simon J, Roslova H. A population study of beer consumption on folate, and homocysteine concentrations. *Eur J Clin Nut* 2001; 55: 605-609.
- 195.- McCord JM. The evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
- 196.- McCord JM and Fridovich I. Superóxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
- 197.- Michaelis L. *Cold Spring Harbor Sump. Quant. Biol.* 7,33 (1939). Citado en *Free Radicals in Biology* (WA Pryor ed) p.1 Academic Press, New York 1961.
- 198.- Michaelis L. Fundamentals of oxidations and reduction. En *Currents in Biochemical Research*. Green D.E. (Ed.). New York: Interscience.1946. p. 207-227.
- 199.- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH and Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002; 36: 1199-208.
- 200.- Miyagi Y, Miwa K, Inou H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol* 1997; 80(12): 1627-1631.
- 201.- Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M and Kawahishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicine through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* 2005; 76(13): 1439-1453.
- 202.- Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005; 100(2): 179-90.
- 203.- Muller DP. Antioxidant therapy in neurological disorders. *Adv Exp Med Biol* 1990; 264: 475.

BIBLIOGRAFIA

- 204.- Muller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D, Halliwell B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin—apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(2): 254-7.
- 205.- Muñiz P, Saez P, Iradi A, Viña J, Oliva MR, Saez GT. Differences between cysteine and homocysteine in the induction of deoxyribose degradation and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(4): 354-362.
- 206.- Muñiz P, Sáez G, Valls V. Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato. Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina. Valencia. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (Ed.). 2000. p. 63-70.
- 207.- Muñiz P, Valls V, Perez-Croseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR et al. The role of 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine in rifamicin-in-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1995; 18(4): 747-55.
- 208.- Murphy GP, Lawrence WJr, Lenhard RE. Textbook of Clinical Oncology. En: Atlanta GA. American Cancer Society. Eds. American Society. 1995.
- 209.- Namiki M. Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagen. *Adv Food Res* 1988; 32: 115-183.
- 210.- Nathan C, Xien QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269(19): 13725-13728.
- 211.- Nardini M, Natella F, Sacaccinni C, Ghiselli A. Phenolic acids from beer are absorption and extensively metabolized in humans. *J Nutr Biochem* 2006; 17(1): 14-22.

BIBLIOGRAFIA

- 212.- Narziss L, Kieninger H, Reicheneder E. Use of whole hops and extract of different varieties and source II. Trials with Hallertau, Hersbruck, Spalt, Tettngang and Saaz hops. *Brauwelt* 1972; 112: 547-552.
- 213.- Nauser T, Kopenol WH, Geibicki JM. The kinetics of oxidation of GSH by protein-bound radicals. *Biochem J* 2005; 392(Pt3): 693-70.
- 214.- Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 286: R505-R511.
- 215.- Nicolay K, de Kruijff B. Effects of adriamycin on respiratory chain activities in mitochondria from rat liver, rat heart and bovine heart. Evidence for a preferential inhibition of complex III and IV. *Biochem Biophys Acta* 1987; 892(3): 320-30.
- 216.- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids. A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 418-425.
- 217.- Nozawa H, Yoshida A, Tajima O, Katayama M, Sonobe H, Wakabayashi K et al. Intake of beer inhibits azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in male fischer 344 rats. *Int. J Cancer* 2004; 108: 404-411.
- 218.- Ohkura K, Lee JD, Shimizu H, Nakano A, Uzui H, Horikoshi M. Mitochondrial complex I activity is reduced in latent adriamycin-induced cardiomyopathy of rat. *Mol Cell Biochem* 2003; 248(1-2): 203-8.
- 219.- Ottaviani JI, Carrasquedo F, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz H, Fraga C. Influence of flavan-3-ols and procyanidins on UVC-mediated formation 8-oxo-

BIBLIOGRAFIA

- 7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys* 2002; 406: 203-208.
- 220.- Peiró Alós Celsa María. Actividad mitocondrial y metabolismo oxidativo en los procesos de envejecimiento. [Tesis doctoral] Universidad de Valencia. Facultad de Medicina y Odontología. 1998.
- 221.- Pérez-Magariño S, Rivero MD, González-SanJosé ML. Melanoidins in Brown Alcoholic Beverages. *Czech J Food Sci* 2000; 18 Special Issue: 108-109.
- 222.- Piendl A. The role of beer in present-day nutrition. *Brauwelt International*, III. 1990. p: 174-176.
- 223.- Praet M, Ruyschaert JM. In vivo and in vitro mitochondrial membrane damages induced in mice by adriamycin and derivatives. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1149(1): 79-85.
- 224.- Praet M, Calderon PB, Pollaski G, Robertroind M, Ruyschaert JM. A new classes of radical scavengers reducing adriamycin mitochondrial toxicity. *Biochem Pharmacol* 1988; 37(24): 4617-22.
- 225.- Pryor, W.A. Free radicals in Biology. En Pryor, W.A.(Ed.) New York; Academic press . 1976. Vol 1 p. 1-277.
- 226.- Pryor, W.A. The role of free radicals reactions in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1976; 1: 1-43.
- 227.- Pryor, W.A. Free radicals. New York. McGraw-Hill. 1966.
- 228.- Pryor, W.A. Free Radicals in Biology. En Pryor, W.A. (Ed.). New York: Academic Press. 1939. p.1-33.
- 229.- Pulido R, Hernandez-Garcia M, Saura-Calixto F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1275-1282.

BIBLIOGRAFIA

- 230.- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 79-95.
- 231.- Rasmussen SF, Friederikssen H, Strntze Krogholm K, Paulsen L. Dietary proanthocyanidin: occurrence, dietary intake, bioavailability and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(2): 159-74.
- 232.- Ray SD, Lam TS, Rotollo JA, Phadke S, Patel C, Dontabhaktuni A. Oxidative stress is the master operator of drug and chemically-induced programmed and unprogrammed cell death: Implications of natural antioxidants in vivo. *Biofactors* 2004; 21(1-4): 223-32.
- 233.- Ray SD, Patel D, Wong E, Bagchi D. In vivo protection of DNA damage associated apoptotic and necrotic cell deaths during acetaminophen-induced nephrotoxicity, amiodarone-induced lung toxicity and doxorubicin-induced cardiotoxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2002; 107: 137-166.
- 234.- Rechner AR, Kuhnle G, Hu H, Roedig-Penman A, van den Braak M.H, Moore KP. The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Rad Res* 2002; 36(11): 1229-41.
- 235.- Reiter RJ, Karbownik M, Lewinski A. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(8): 735-55.
- 236.- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gito E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000; 7(6): 444-58.
- 237.- Ribereau-Gayon P, Stonestreet E. Determination of anthocyanins in red wine. *Bull Soc Chim Fr* 1965; 9: 2649-52.

BIBLIOGRAFIA

- 238.- Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(7): 838-49.
- 239.- Rice-Evans C. Flavonoids and Isoflavones: Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radic Biol Med* 2003; 36(7): 827-828.
- 240.- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-956.
- 241.- Rivero D, Perez-Magariño S, Gonzalez-Sanjosé ML, Valls-Bellés V, Codoñer P, Muñoz P. Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *J Agric Food Chem* 2004; 53(9); 3637-42.
- 242.- Rodríguez RJ, Miranda CL, Stevens JK, Deninzer ML. Buhler DS. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 2001; 39(5): 437-45.
- 243.- Romero FJ, Viña J. Preparation of isolated liver cells. Edited by E.J. Wood. *Practical Biochemistry for Colleges*. 1983. p: 111-113.
- 244.- Saduzka Y, Sugiyama T, Shimoi L, Kinae N and Hirola S. Protective effect of flavonoids on doxorubicine-induced cardiotoxicity. *Toxicol lett* 1997; 92: 1-7.
- 245.- Saez GT, Muñoz P, Iradi A, Viña J, Oliva MR. Difference between and homocysteine in the induction of deoxyribose degradation and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(4):354-362.
- 246.- Saez GT, Blay P, Viña JR, Viña J. Metabolic effects of glutathione depletion. *Biochem Soc Trans* 1987; 15(2): 227-228.

BIBLIOGRAFIA

- 247.- Sahin E, Gumuslu S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behavioural Brain Research* 2004; 155: 241-248.
- 248.- Santos DL, Moreno AJM, Leino RL, Froberg MK, Guayanés KB. Carvediol protects against doxorubicin-induced mitochondria cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 185: 218-227.
- 249.- Sakurai T, Kanayana M, Shibata T, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto H et al. Ebselen, a Seleno-organic antioxidant, as a electrophile. *Chem Res toxicol* 2006; 19(9): 1196-204.
- 250.- Salmon TB, Evert BA, Song B, Doetsch PW. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Sacharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2004; 432(12): 3712-23.
- 251.- Sartori AA, Jiricny J. Enzimology of base excision repair in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* *J Biol Chem* 2003; 278(27): 24563-76.
- 252.- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of phenols. *J Nutr* 2000; 130: 2073S-85S.
- 253.- Seglen PO. Preparation of rat liver cells. I. Effect of calcio enzymatic dispersion of isolated perfused liver. *Exptl C Res* 1972; 74, 450-454.
- 254.- Sen CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36:1-30.
- 255.- Sendra JM, Carbonell JV. Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Monografía. Madrid. Centro de Información Cerveza y Salud. 1999.

BIBLIOGRAFIA

- 256.- Sener G, Sehirli A, Ipçi Y, Çetinel S, Cikler E, Gedik N. Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Fund Clin Pharm* 2005; 19: 155-164.
- 257.- Serafini M, Maiani G and ferro-Luzzi A. Alcohol-Free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* 1998; 128(6): 1003-1007.
- 258.- Serveis S, Boussousar A, Molnar A, Douki T, Pequignot JM and Favier R. Age-related sensitivity to lung oxidative stress during ozone exposure. *Free Radic Res* 2005; 39 305-16.
- 259.- Sies H, Sharov VS, Klots LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27812-27817.
- 260.- Sies H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am J of Med* 1991; 91(3): 31-38.
- 261.- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Engl* 1986; 25: 1580-1571.
- 262.- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. En: Sies, H. (Ed.) *Oxidative stress*. Orlando: Academic Press. 1985. p. 1-7.
- 263.- Singal PK, Deally CMR, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart. A concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 817-828.
- 264.- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdic-phosphtungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic* 1965; 16: 144-158.
- 265.- Shiva S, Oh JY, Landar AL, Ulasova E, Venkatraman A, Bailey SM. Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(3): 297-306.

BIBLIOGRAFIA

- 266.- Solem LE, Wallace KB, Henry TR. Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 129(2): 214-22.
- 267.- Solem LE, Wallace KB. Selective activation of the sodium-independent cyclosporine A-sensitive calcium pore of cardiac mitochondria by doxorubicin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 121(1): 50-7.
- 268.- Spiteller G. The relation of lipid peroxidation processer with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 999-1013.
- 269.- Stacey N, Priestly BG. Lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: relationship to toxicity of CCl₄, ADP/Fe⁺³, and diethyl maleate. *Tox Appl Pharmacol* 1978; 45: 41-48.
- 270.- Stahl W, van der Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 2002; 23(2): 39-100.
- 271.- Starke PE, Hock JB, Farbor JL. Calcium dependent and calcium-independent mechanism of irreversible cell injury in cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 1986; 261: 3006-3012.
- 272.- Stocker R, Keaney JK Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84(4): 1381-478.
- 273.- Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 1959; 10: 63-68.
- 274.- Takada M, Ikenoya S, Yuzuriha T, Katayama K. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones. *Methods Enzimol* 1984; 105: 147-155.
- 275.- Tang P, Mile MV, Miles L, Quinlan J, Wong B, Wenisch A. Measurements of reduced and oxidized coenzyme Q₉ and coenzyme Q₁₀ levels in mouse

BIBLIOGRAFIA

- tissues by HPLC with coulometric detection. *Clin Chim Acta* 2004; 341: 173-184.
- 276.- Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42(6): 1075-81.
- 277.- Taylor S, Davenport LD, Speranza MJ, Mullenbach GT, Linch RE. Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 600-605.
- 278.- Terao J, Piskulan L, Yao Q. Protective effect of epicatequin, epicatequin gallate, and quercetin lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 1994; 308: 278-284.
- 279.- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grolman AP et al. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(11): 4690-4694.
- 280.- Thomas S, Tihzer L and Moreno SF. Use of silica gel polymer for DNA extraction with organic solvents. *Anal Biochem* 1987; 183(1): 13-15.
- 281.- Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs rats during aging. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(9): 1477-148.
- 282.- Tomas-Barberan JJ, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1073-80.
- 283.- Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol. Academic Press.* 1996; Inc, 264. p 484-509.

BIBLIOGRAFIA

- 284.- Tubaro F, Ghiselli A, Rapazzi P, Maiorino M, Ursini F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1228-1234.
- 285.- Unno T, Kondo K, Itakura H, Takeo T. Analysis of (-)-epigallocatequin gallate in human serum obtained after ingesting green tea. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; 60: 2066-2068.
- 286.- Ursini F, Bindoli A. The role of seleniumperoxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids* 1987; 44(2-4): 225-276.
- 287.- Valls-Bellés V, Torres MC, Muñiz P, Beltrán S, Martínez- Alvarez JR and Codoñer Franch P. Defatted milled grape seed protects adriamycin-treated hepatocytes against oxidative damage. *Eur J Nutr* 2006; 45: 251-8.
- 288.- Valls-Bellés V, Torres-Rodríguez MC, Muñiz P, Boix L, González-Sanjose ML, Codoñer-Franch P. The protective effects of melanoidins in adriamycin-induced oxidative stress in rat isolated hepatocytes. *J Sci Food Agric* 2004; 80: 1701-1707.
- 289.- Valls-Bellés V, Muñiz P, González P, González-Sanjose ML, Beltrán S. Mechanism of protection by epicatechin against tert-butylhydroperoxide induced oxidative cell injury in isolated rat hepatocytes and calf thymus DNA. *Process Biochem* 2002; 37: 659-667.
- 290.- Valls-Bellés V, Codoñer-Franch P, González San José ML, Muñiz Rodríguez P. "Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in Vitro e in vivo. Monografía. Madrid. ed. Centro de Cerveza y Salud. 2001.
- 291.- Valls-Bellés V, Castellucio C, Fato R, Genova ML, Bovina C, Saez G et al. Protective effect of exogenous coenzyme Q against damage by adriamycin in perfused rat liver. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 33(4): 633-642.

BIBLIOGRAFIA

- 292.- van Acker F, Hillshof JW, Haenen GR, Menge WH, van der Vijgh et al. New synthetic flavonoids as potent protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(1): 31-37
- 293.- van Acker F, van Acker S, Kramer K, Haenen GRMM, Bast A, van der Vijgh WJF. MonoHEr protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1337.
- 294.- van Acker S, Boven E, Kuiper K, van den Berg D, Grimbergen JA, Kramer A et al. Monohydroxyethylrutin, a dose dependent cardioprotective agent, does not affect the antitumor activity of doxorubicin. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1747.
- 295.- van der Berg H, van der Gaag M, Hendriks H. Influence of lifestyle on vitamin bioavailability. *INT J Vitam Nutr Res* 2002; 72(1): 53-9.
- 296.- van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondria DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2006; 5(2): 145-52.
- 297.- van der Ouweland GAM, Peer HG, Tjan SB. Occurrence of Amadori and Heyns rearrangement products in processed foods and their role in flavour formation. In: *Flavour of Foods and Beverages*, ed. G Charalambous, G.E. Inglett. Academia Press. 1978. pp: 131-143.
- 298.- van't Veer PV, Kok FJ. Human studies to substantiate health effects of antioxidants. What is needed?. *Free Radic Res* 2000; 33: S109-S115.
- 299.- Vernin G, Parkanyi C. Mechanism of formation of heterocyclic compound in Maillard and pyrolysis reactions. In: *The Chemistry of heterocyclic compounds in flavours and aromas*, Chichester, ed. G. Vernin. Ellis Horwood. 1982. p: 151-207.

BIBLIOGRAFIA

- 300.- Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, Fraga C, Oteiza PI. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid peroxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Rad Bio Med* 2003; 34: 84-92.
- 301.- Vitrac X, Monti JP, Vercauteren J, Deffieux G, Merillon JM. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta* 2002; 458: 103-10.
- 302.- Wallace KB. Doxorubicin-Induced Cardiac Mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 105-115.
- 303.- Wallace KB. Non enzymatic oxygen activation and stimulation of lipid peroxidation by doxorubicin-copper. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 86: 69.
- 304.- Walling C. Free radicals in solution. Willey. New York. 1957.
- 305.- Wang Y, Cao S, Zeng S. Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol, and isorhamnetin. *J Pharmacol* 2005; 57(6): 751-8.
- 306.- Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CC, Schmitz HH. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative stress. *J Nutr* 2000; 130(8S): 2115S-9S.
- 307.- Waters WA. The Chemistry of Free Radicals. 2nd Waters, W.A. (Ed.) London and NY: Ed. Oxford Univ. Press. 1948.
- 308.- Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Semin Oncol* 1992; 19(6): 670-686.
- 309.- Wienik PH, Dutcher JP. Clinical importance of anthracyclines in the treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1992; 6(1): 67-69.

BIBLIOGRAFIA

- 310.- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules?. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(7): 838-849.
- 311.- Williamson G, Scarlbert A. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000; 130: 2073S-2085S.
- 312.- Wink DD, Wink CB, Nims RW, Ford PC. Oxidizing intermediates generated in the Fenton reagent. Kinetic arguments against the intermediary of the hydroxyl radical. *Environ Health Perspect* 1994; 102S, 3: 11-5.
- 313.- Woo J. Relationships among diet, physical activity and other lifestyle factors and debilitating diseases in the elderly. *Eur J Clin Nutr* 2002; 54: 143-7.
- 314.- Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta* 2004; 348(1-2): 27-34.
- 315.- Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK. Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003; 48(4): 377-382.
- 316.- Yamamoto K, Barzilai A. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2004; 3(8-9): 1109-15.
- 317.- Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 1997; 328: 599-605.
- 318.- Young J, Rosenvold K, Stagsted J, Nielsen J, Andersen H. Significance of Vitamin E Supplementation, Dietary Content of Polyunsaturated Fatty Acids, and Preslaughter Stress on Oxidative status in Pig As Reflected in Cell Integrity and Antioxidant Enzyme Activities in Porcine Muscle. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 745-749.

BIBLIOGRAFIA

- 319.- Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 2001; 385(1): 20-7.
- 320.- Zhang Y, Aberg F, Appelkvist EI, Dallner G and Ernster L. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *J Nutr* 1995; 125: 446-453.
- 321.- Zhan XY, Li WG, Wu Yj, Cao HT. Amelioration of doxorubicin-induced myocardial oxidative stress and immunosuppression by grape seed proanthocyanidins in tumour-bearing mice. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57(8): 1043-52.
- 322.- Zheng S, Wang Y and Cao J. Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol and isorhamnetin. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 751-758.
- 323.- Zhou C, Zhang C. Protective of antioxidant vitamins on Aroclor 1254-induced toxicity in cultures chicken embryo hepatocytes. *Toxicology in vitro* 2005; 9: 65-673.
- 324.- Zmijewski JW, Landar A, Watanabe N, Dickinson DA, Noguchi N and Darley-Usmar Vm. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1385-9.

7.- APÉNDICE.

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1: Especies oxigénicas reactivas.	10
Tabla 2: Composición nutricional de la cerveza.	82
Tabla 3: Actividad antioxidante y niveles de polifenoles totales, procianidinas, catequinas y melanoidinas de la cerveza.	136

ÍNDICE DE FIGURAS	pág.
Figura 1: Reactividad de especies oxigénicas	11
Figura 2: Generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) en la reducción monovalente del oxígeno y en la cadena de transporte electrónico.	15
Figura 3: Sistema hidroxilante microsomal hepático.	17
Figura 4: Sistema oxidante en las células fagocitarias.	18
Figura 5: Esquema de la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa.	20
Figura 6: Daño producido a las biomoléculas.	23
Figura 7: Esquema de la peroxidación lipídica.	24
Figura 8: Daño oxidativo al ADN.	34
Figura 9: Esquema de la generación de EROs y defensa antioxidante.	41
Figura 10: Reacción de la SOD con el radical superóxido.	41
Figura 11: Reacción de la catalasa con el peróxido de hidrógeno.	43
Figura 12: Reducción del ROOH por la GPx.	44
Figura 13: Síntesis de GSH.	48
Figura 14: Inhibición de la peroxidación lipídica.	49
Figura 15: Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina E.	50
Figura 16: Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina C.	52
Figura 17: Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina A.	54
Figura 18: Estructuras químicas de los diferentes ácidos fenólicos y compuestos polifenólicos de los alimentos.	57
Figura 19: Estructura química del flavonoide.	58
Figura 20: Estructuras químicas de las diferentes familias de flavonoides.	60
Figura 21: Esquema de la generación de EROs y defensa antioxidante.	71
Figura 22: Molécula de adriamicina.	85
Figura 23: Inhibición de la función mitocondrial por la ADR.	87

Figura 24: Daño a la mitocondria por la ADR.	88
Figura 25: Actividad antioxidante de las fracciones por grupos de cervezas expresadas como TEAC	123
Figura 26: Actividad antioxidante de las fracciones por grupos de cervezas expresadas como CEAC.	124
Figura 27: Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza negra.	126
Figura 28: Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza rubia.	126
Figura 29: Determinación del adenosín trifosfato (ATP) en hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza negra.	127
Figura 30: Determinación del adenosín trifosfato (ATP) en hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza rubia.	128
Figura 31: Determinación de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbotúrico (TBARS) en hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza negra	130
Figura 32: Determinación de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbotúrico (TBARS) en hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza rubia.	131
Figura 33: Determinación de los grupos carbonilo de las proteínas en los hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza negra.	132
Figura 34: Determinación de los grupos carbonilo de las proteínas en los hepatocitos de rata incubados con extracto de cerveza rubia.	133
Figura 35: Determinación del nivel de glutation (GSH) con cerveza negra.	134
Figura 36: Determinación del nivel de glutation (GSH) con cerveza rubia.	135
Figura 37: Determinación del radical superóxido.	138
Figura 38: Niveles de polifenoles totales en plasma a diferentes tiempos, tras la suplementación en la dieta con cerveza.	139

Figura 39: Actividad de los antioxidantes totales en plasma a diferentes tiempos, tras la suplementación de la dieta con cerveza.	141
Figura 40: Mitocondrias de corazón e hígado por microscopia electrónica.	143
Figura 41: Actividad del complejo I en mitocondrias de hígado de rata.	144
Figura 42: Actividad del complejo I en mitocondrias de corazón de rata.	145
Figura 43: Actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado de rata.	146
Figura 44: Actividad del complejo IV en mitocondrias de corazón de rata.	147
Figura 45: Niveles de CoQ ₉ en las mitocondrias de hígado de rata.	149
Figura 46: Niveles de CoQ ₁₀ en las mitocondrias de hígado de rata.	150
Figura 47: Niveles de CoQ ₉ en las mitocondrias de corazón de rata.	151
Figura 48: Niveles de CoQ ₁₀ en las mitocondrias de corazón de rata.	151
Figura 49: Contenido de grupos carbonilo de las proteínas de plasma de rata.	152
Figura 50: Niveles de MDA + 4-hidroxinonenal en mitocondrias de hígado de rata.	154
Figura 51: Niveles de MDA + 4-hidroxinonenal en mitocondrias de corazón de rata.	155
Figura 52: Niveles de 8-oxo-dGuo en el ADN de hígado de rata.	156
Figura 53: Niveles de 8-oxo-dGuo en el ADN de corazón de rata.	157
Figura 54: Niveles de α -tocoferol en las mitocondrias de hígado de rata.	159
Figura 55: Niveles de α -tocoferol en las mitocondrias de corazón de rata.	160