



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Ciencias de la Salud

Modificación del daño oxidativo en un grupo de ciclistas tras
consumir ácido docosahexaenoico a distintas dosis

Autor:

Carlos J. Contreras Fernández

Director:

Dr. D. F. Javier López Román

Murcia, julio de 2014



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN**

El Dr. D. F. Javier López Román como Director de la Tesis Doctoral titulada “Modificación del daño oxidativo en un grupo de ciclistas tras consumir ácido docosahexaenoico a distintas dosis” realizada por D. Carlos J. Contreras Fernández en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REALES DECRETOS 99/2011, 1393/2007, 56/2005 Y 778/98, EN MURCIA A 21 DE JULIO DE 2014.

Servicio de Doctorado. Vicerrectorado de Investigación
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: doctorado@ucam.edu

AGRADECIMIENTOS

Al hacer esta sección te das cuenta del gran número de personas que, de un modo u otro, hacen posible que un proyecto así llegue a su fin.

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi director, el Dr. F. Javier López Román, ya que fue un honor y un placer haber podido realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Gracias por la confianza que has mostrado en mí desde el primer momento. Gracias por tu dedicación. Gracias por el pasado y por el futuro.

A Lola, compañera y amiga siempre, en lo bueno y en lo malo.

A mis compañeros/as de la Cátedra de Fisiología del Ejercicio, vuestro trabajo es digno de elogio.

A mi familia, los de aquí y los de allí, todos me habéis enseñado mucho, todos me habéis dado demasiado.

A mis padres, gracias a vosotros he tenido la oportunidad de llegar hasta aquí. Vuestro esfuerzo incansable ha hecho mi camino más sencillo. Cada uno de mis logros es, y será, parte vuestra. Os quiero.

A mi esposa, mi señora esposa. Lo supe desde el primer día. Lo bueno sabe mejor a tu lado, lo malo no duele tanto. Y lo mejor está por llegar. Te amo.

“El hombre que no aprovecha las oportunidades de aumentar sus conocimientos, cualquiera que éstos sean, no tiene derecho a lamentarse de su ignorancia”

Alberto Vázquez-Figueroa

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	17
TABLAS Y FIGURAS.....	25
1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	35
1.1 Concepto de estrés oxidativo.....	35
1.1.1 Daño oxidativo al ADN.....	39
1.1.2 Daño oxidativo a proteínas.....	42
1.1.3 Daño oxidativo a lípidos.....	43
1.1.4 Daño oxidativo a glúcidos.....	46
1.2 Estrés oxidativo y ejercicio físico.....	46
1.2.1 Generación de especies reactivas asociado a ejercicio físico.....	46
1.2.2 Tipos de ejercicio físico y estrés oxidativo.....	51
1.2.3 Rendimiento deportivo, salud y estrés oxidativo.....	53
1.3 Antioxidantes y estrés oxidativo.....	61
1.3.1 Antioxidantes endógenos enzimáticos.....	62
1.3.2 Antioxidantes endógenos no enzimáticos.....	65
1.3.3 Antioxidantes exógenos.....	70
1.3.4 Suplementación de antioxidantes en deportistas.....	77
1.4 Ácido graso docosahexaenoico.....	79
1.4.1 Estructura del ácido graso docosahexaenoico.....	79
1.4.2 Fuentes e ingesta.....	80
1.4.3 Conversión.....	90
1.4.4 Biodisponibilidad.....	94
1.4.5 Mecanismos de acción.....	98
1.4.6 Ácido graso docosahexaenoico y estrés oxidativo.....	105

2. OBJETIVOS.....	113
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	117
3.1 Sujetos del estudio.....	117
3.2 Diseño del estudio.....	118
3.3 Lugar de realización del estudio.....	118
3.4 Productos en experimentación.....	119
3.4.1 Producto experimental.....	119
3.4.2 Producto placebo.....	120
3.5 Metodología.....	121
3.6 Variables del estudio.....	129
3.6.1 Variables sociodemográficas.....	129
3.6.2 Variables de la prueba basal.....	129
3.6.3 Evaluación nutricional.....	133
3.6.4 Condiciones de laboratorio durante las pruebas de esfuerzo...	134
3.6.5 Hidratación durante las pruebas de esfuerzo.....	134
3.6.6 Análisis del perfil de ácidos grasos en membrana eritrocitaria.	134
3.6.7 Capacidad antioxidante del ácido graso docosahexaenoico.....	135
3.6.8 Variables hematológicas y bioquímicas de sangre venosa.....	137
3.7 Material. Aparatos e instrumentación.....	138
3.8 Análisis estadístico.....	138
4. RESULTADOS.....	143
4.1 Características demográficas.....	143
4.1.1 Edad.....	143
4.1.2 Actividad física.....	144
4.2 Variables de la prueba basal.....	145
4.2.1 Consumo de oxígeno.....	145

4.3 Condiciones de laboratorio durante las pruebas de esfuerzo.....	146
4.4 Hidratación durante las pruebas de esfuerzo.....	147
4.5 Evaluación nutricional.....	149
4.6 Análisis del perfil de ácidos grasos en membrana eritrocitaria.....	152
4.7 Capacidad antioxidante del ácido graso docosahexaenoico.....	171
4.8 Variables hematológicas y bioquímicas de sangre venosa.....	175
4.8.1 Variables hematológicas.....	175
4.8.2 Variables bioquímicas.....	179
5. DISCUSIÓN.....	191
5.1 Biodisponibilidad del ácido graso docosahexaenoico.....	192
5.2 Ácido graso docosahexaenoico como antioxidante.....	195
5.2.1 Estudios <i>in vitro</i>	196
5.2.2 Modelos animales.....	198
5.2.3 Modelos humanos.....	201
5.2.4 Estudios en deportistas.....	207
5.3 Seguridad del producto experimental.....	210
6. CONCLUSIONES.....	213
7. BIBLIOGRAFÍA.....	217
8. ANEXOS.....	253

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

¹O₂	Oxígeno singlete
4-HNE	4-Hidroxinonenal
8-iso-PGF₂α	8-iso-prostaglandina F2 <i>alfa</i>
8-OHdG	8-hidroxi-2'-dexosiguanosina
α-LA	Ácido α-lipoico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN_M	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADN_N	Ácido desoxirribonucleico nuclear
AG	Ácido graso
AGE	Ácido graso esencial
AGI	Ácido graso insaturado
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AGS	Ácido graso saturado
AL	Ácido linoleico
ALA	Ácido α-linolénico
AMPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
AP1	Proteína activadora 1
ARA	Ácido araquidónico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosón trifosfato
BM	Biogénesis mitocondrial
BR	Bilirrubina
BVR	Biliverdina
BVRr	Biliverdina reductasa
Ca⁺²	Ión calcio

CAT	Catalasa
Cl⁻	Anión cloruro
ClO⁻	Ión hipoclorito
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Enzima ciclooxigenasa
CT	Colesterol
CTe	Cadena de transporte de electrones
Cu⁺¹	Ión cuproso
Cu⁺²	Ión cúprico
Cu/ZnSOD	Superóxido dismutasa cobre/zinc dependiente
DD5	Enzima desaturasa delta 5
DD6	Enzima desaturasa delta 6
DHA	Ácido graso docosahexaenoico
DHLA	Forma reducida de ácido α -lipoico
DPA	Ácido graso docosapentaenoico
E2	Enzima elongasa 2
E5	Enzima elongasa 5
ecSOD	Superóxido dismutasa extracelular
EE	Éster etílico
ELISA	Técnica de inmunoabsorción enzimática
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
EPA	Ácido graso eicosapentaenoico
ER	Especie reactiva
ERK	Kinasa reguladora de señales extracelulares
ERN	Especie reactiva de nitrógeno
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FC	Frecuencia cardíaca

Fe⁺²	Ión ferroso
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
GGT	<i>gamma</i> glutamil transpeptidasa
GOT	Alaninoamino transferasa
GPT	Aspartamoamino transferasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GRX	Glutarredoxina
GSH	Glutación reducido
GSH/GSSG	Índice Glutación reducido/Glutación oxidado
GSSG	Glutación oxidado o glutación disulfuro
GST	Glutación S-transferasa
H⁺	Ión hidrógeno
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HClO	Ácido hipocloroso
HDL	Lipoproteína de alta densidad
Hg	Mercurio
HNO₂	Ácido nitroso
HO	Enzima hemooxigenasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSF1	Factor de transcripción de choque térmico 1
HSP	Proteínas de shock térmico
IA	Ingesta adecuada
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulínico 1
IL-1β	Interleukina 1 <i>beta</i>

IL-2	Interleukina 2
IL-6	Interleukina 6
IL-12	Interleukina 12
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
LA	Forma oxidada de ácido α -lipoico
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LOX	Enzima lipooxigenasa
LPL	Lipoproteín lipasa
lpm	Latidos por minuto
LR	Microdominios <i>lipid rafts</i>
LT	Leucotrieno
LXA₄	Lipoxina A ₄
Mb	Mioglobina
MDA	Malondialdehído
Mg⁺²	Ión magnesio
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
MPX	Enzima mieloperoxidasa
N₂	Nitrógeno
NADP⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NF-κB	Factor de transcripción nuclear <i>kappa B</i>
nNOS	Enzima óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NO•	Radical óxido nítrico
NO₂•	Radical dióxido de nitrógeno
NOS	Enzima óxido nítrico sintasa

NPD1	Nueroprotectina D1
O₂	Oxígeno atmosférico
O₂•⁻	Radical superóxido
O₃	Ozono
OH•	Radical hidroxilo
ONOO•⁻	Radical peroxinitrito
PCB	Bifenoles policlorados
PG	Prostaglandina
PGC-1α	Coactivador transcripcional 1 <i>alfa</i>
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PO₂	Presión parcial de oxígeno
PPAR	Receptor activador de proliferación del peroxisoma
PRX	Enzima peroxirredoxina
Q10	Coenzima Q 10
QM	Quilomicrón
RL	Radical libre
RO•	Radical alcoxilo
ROH	Alcohol
ROO•	Radical peroxilo
ROOH•	Radical hidroperoxilo
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Retículo sarcoplásmico
RV	Resolvina
Se	Selenio
SOD	Superóxido dismutasa
TAG	Triglicérido
TAGr	Triglicérido reesterificado
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNFα	Factor de necrosis tumoral <i>alfa</i>

TRX	Tiorredoxina
TX	Tromboxano
UV	Ultravioleta
UV1	Umbral ventilatorio
UV2	Umbral ventilatorio
VCO₂	Volumen de CO ₂ espirado por minuto
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VE/VCO₂	Equivalente respiratorio de dióxido de carbono
VE/VO₂	Equivalente respiratorio de oxígeno
VO₂	Consumo de oxígeno
VO_{2max}	Consumo máximo/pico de oxígeno
XD	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
Zn	Zinc
Zn⁺²	Ión zinc

TABLAS Y FIGURAS

TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Tabla 1. Vida media de algunas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno....	35
Tabla 2. Pros y contras de marcadores de daño oxidativo.....	38
Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes.....	62
Tabla 4. Contenido de ácido α -linolénico de aceites, semillas y nueces.....	81
Tabla 5. Contenido de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico (g/100 g) en diferentes tipos de pescado.....	83
Tabla 6. Productos enriquecidos/fortificados con ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico.....	89
Figura 1. Peroxidación lipídica.....	44
Figura 2. Lugares y mecanismos propuestos para la generación de especies reactivas en la fibra muscular esquelética.....	48
Figura 3. Sistema xantina deshidrogenasa/oxidasa.....	49
Figura 4. Reacción de Fenton o Haber-Weiss.....	50
Figura 5. Efectos del ejercicio aeróbico y anaeróbico sobre los carbonilos proteicos a nivel plasmático.....	52
Figura 6. Curva de hormesis y efectos del ejercicio físico.....	56
Figura 7. Neutralización del radical superóxido por acción de las enzimas superóxido dismutasa.....	63
Figura 8. Ciclo redox del glutathion.....	66
Figura 9. Esquema de las isoformas redox del coenzima Q 10.....	68
Figura 10. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles.....	71
Figura 11. Estructura química del ácido ascórbico, radical ascorbilo y ácido dihidroascórbico.....	73
Figura 12. Estructura química de los polifenoles.....	75

Figura 13. Estructura química de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6.....	80
Figura 14. Ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 de fuentes vegetales (mg/d) para adultos de edad superior o igual a 20 años.....	86
Figura 15. Ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 marinos (mg/d) para adultos de edad superior o igual a 20 años.....	86
Figura 16. Vías metabólicas de los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3....	92
Figura 17. Mecanismos de acción de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 que pueden influir en la función celular.....	98
Figura 18. Vías de los receptores activadores de proliferación del peroxisoma <i>alfa</i> y <i>gamma</i>	101
Figura 19. Vías de síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico...	102
Figura 20. Resumen de las vías de síntesis de mediadores lipídicos a partir de los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico.....	104

CAPÍTULO III. MATERIA Y MÉTODOS

Tabla 7. Características químicas del producto experimental.....	119
Tabla 8. Características químicas del producto placebo.....	120
Tabla 9. Listado de alimentos prohibidos en el desayuno previo a la prueba.....	125
Tabla 10. Protocolo de recogida de orina para las 24 horas previas a la prueba de esfuerzo.....	127
Tabla 11. Protocolo de recogida de orina para las 24 horas posteriores a la prueba de esfuerzo.....	127
Tabla 12. Protocolo en laboratorio en el día de prueba de esfuerzo.....	128
Figura 21. Producto experimental consumido durante 4 semanas.....	120
Figura 22. Pruebas de esfuerzo realizadas durante el estudio.....	122

Figura 23. Colocación de electrodos electrocardiográficos para realización de prueba de esfuerzo incremental maximal progresiva y deportista con venda tubular de malla elástica.....	124
Figura 24. Mascarilla de respiración con flujómetro acoplado y conexiones con el analizador de gases.....	124
Figura 25. Modelo de cambios en el intercambio de gases durante la realización de una prueba de esfuerzo incremental.....	131
Figura 26. Cálculo de los umbrales ventilatorios según modelo de Skinner y McLellan.....	132
Figura 27. Diagrama de metodología de la técnica de inmunoabsorbancia enzimática.....	136

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Tabla 13. Tiempo (horas/semana) de dedicación a la actividad física en general y al ciclismo en particular para cada uno de los grupos de estudio...	145
Tabla 14. Consumo máximo/pico de oxígeno relativo al peso y consumo de oxígeno en el umbral ventilatorio 2 relativo al peso para cada uno de los grupos de estudio.....	146
Tabla 15. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) del laboratorio durante la realización de cada una de las pruebas de esfuerzo por los distintos grupos de estudio.....	147
Tabla 16. Consumo de agua (ml) de los sujetos en cada de las pruebas de esfuerzo realizadas por los distintos grupos de estudio.....	148
Tabla 17a. Evaluación nutricional: consumo de calorías, glúcidos, lípidos y proteínas.....	150
Tabla 17b. Evaluación nutricional: algunos micronutrientes con capacidad antioxidante.....	150
Tabla 18. Evaluación nutricional: consumo de los distintos tipos de ácidos grasos según los grupo de estudio.....	151

Tabla 19. Frecuencia relativa de los distintos tipos de ácidos grasos que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.....	153
Tabla 20. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados n-3, n-6 y el cociente n-6/n-3 en la membrana del eritrocito, evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.....	154
Tabla 21. Frecuencia relativa de los ácidos docosahexaenoico, eicosapentaenoico, docosapentaenoico y araquidónico en la membrana del eritrocito, evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.....	155
Tabla 22. Cociente ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico y cociente ácidos grasos saturados/ácido docosahexaenoico en la membrana del eritrocito, evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.....	156
Tabla 23. Excreción media de 8-hidroxi-2'-dexosiguanosina en orina de 24 horas en relación al peso del sujeto para cada uno de los grupos de estudio.....	171
Tabla 24a. Media y desviación típica de cada una de las variables hematológicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.....	176
Tabla 24b. Media y desviación típica de cada una de las variables hematológicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.....	178
Tabla 25a. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.....	180
Tabla 25b. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.....	182
Tabla 26a. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiado.....	184

Tabla 26b. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiado.....	186
Figura 28. Distribución de la muestra por edad (años).....	143
Figura 29. Edad media de los distintos grupos de estudio.....	144
Figura 30. Peso (kg) de los sujetos de cada grupo de estudio antes y después de cada una de las pruebas.....	149
Figura 31. Consumo de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en los distintos grupo de estudio.....	151
Figura 32. Frecuencia relativa de los ácidos grasos saturados que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	157
Figura 33. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	158
Figura 34. Frecuencia relativa de los ácidos grasos monoinsaturados que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	159
Figura 35. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	160
Figura 36. Incremento de ácidos grasos poliinsaturados n-3 que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio.....	160
Figura 37. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados n-6 que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	161

Figura 38. Descenso de ácidos grasos poliinsaturados n-6 que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio.....	162
Figura 39. Cociente de las frecuencias relativas de los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3 que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	163
Figura 40. Frecuencia relativa del ácido docosahexaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio..	164
Figura 41. Ascenso de ácido docosahexaenoico que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio.....	164
Figura 42. Frecuencia relativa del ácido docosapentaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	165
Figura 43. Frecuencia relativa del ácido eicosapentaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	166
Figura 44. Ascenso de ácido eicosapentaenoico que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio.....	167
Figura 45. Frecuencia relativa del ácido araquidónico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	168
Figura 46. Frecuencia relativa de ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	169

Figura 47. Frecuencia relativa del ácidos grasos saturados/ácido docosahexaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.....	170
Figura 48. Excreción de 8-hidroxi-2'-dexosiguanosina en orina de 24 horas en relación al peso del sujeto para cada uno de los grupos de estudios evaluados y para cada prueba.....	173
Figura 49. Disminución de la excreción de 8-hidroxi-2'-dexosiguanosina urinaria secundaria a la realización de una prueba de esfuerzo con intensidad constante al 70% del consumo máximo/pico de oxígeno del sujeto, tras el consumo de ácido docosahexaenoico.....	174

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1 CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Paradójicamente, aunque los organismos aerobios necesitan el oxígeno atmosférico (O_2) para la oxidación de los sustratos energéticos, al actuar éste como un aceptor de electrones, el O_2 es una amenaza constante¹. Por ello, a menudo se hace referencia al O_2 como el “gas de Jano”, pues éste muestra efectos beneficiosos pero, también, efectos potencialmente dañinos para los sistemas biológicos².

El daño potencial que supone el O_2 se debe a la formación de radicales libres (RL) derivados del metabolismo aerobio¹.

Los RL son compuestos de vida media baja (Tabla 1) que contienen al menos un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les confiere una elevada reactividad que es debida a la tendencia de los RL a captar un electrón de otras moléculas (oxidación) para estabilizarse³. Por ello, los RL son sustancias potencialmente perjudiciales. Además, cuando reaccionan con otros radicales o moléculas, un RL puede dar lugar a la formación de otros RL⁴.

Tabla 1. Vida media de algunas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno¹.

RADICAL	NOMBRE	VIDA MEDIA
$O_2^{\bullet-}$	Radical superóxido	10^{-5} s
O_3	Ozono	Estable
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	Estable, reducción enzimática
OH^{\bullet}	Radical hidroxilo	10^{-9} s
ROO^{\bullet}	Radical peroxilo	7 s
RO^{\bullet}	Radical alcoxilo	10^{-6} s
1O_2	Oxígeno singlete	10^{-6} s
HClO	Ácido hipocloroso	Estable
NO^{\bullet}	Radical óxido nítrico	5-6 s
$ONOO^{\bullet}$	Radical peroxonitrito	0,05 -1 s
NO_2^{\bullet}	Radical dióxido de nítrico	1-10 s

Algunas moléculas poseen formas de O₂ que también presentan una alta reactividad pero que no cumplen con la definición de RL; al conjunto de estos compuestos oxigenados, RL o no, se les denomina especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO incluyen compuestos que no son RL como ozono (O₃), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido hipocloroso (HClO) y oxígeno singlete (¹O₂), y otros compuestos que sí tienen un electrón desapareado: O₂•, hidroxilo (OH•), peroxilo (ROO•), hidroperoxilo (ROOH•) y alcoxilo (RO•). Asimismo, existen otras especies de O₂ combinadas con nitrógeno (N₂), derivados de reacciones con el óxido nítrico (NO), denominadas especies reactivas de nitrógeno (ERN) y que incluyen, entre otros, a los radicales óxido nítrico (NO•), peroxinitrito (ONOO•) y dióxido de nitrógeno (NO₂•)⁵. Las ERO más comúnmente generadas en sistemas vivos son: O₂•, H₂O₂, OH•, RO•, ROO•, ¹O₂ y O₃⁶.

Por norma general se hace referencia a las ERO y ERN de forma intercambiable y colectiva debido al solapamiento existente en su producción, función y descomposición³.

Nuestro organismo está constantemente bajo el ataque de las ERO/ERN pero gracias a la acción de un complejo sistema de defensas antioxidantes mantiene el equilibrio, u homeostasis, bajo condiciones fisiológicas normales⁵. Sin embargo, cuando este equilibrio se rompe surge el estrés oxidativo⁷.

El concepto de estrés oxidativo fue definido por primera vez, en 1985, por Sies y Cadenas⁸ como “el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, generando un daño potencial”; es decir, el estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la producción de ERO/ERN y la defensa antioxidante endógena del individuo. Por tanto, el estrés oxidativo puede resultar de la producción incrementada de las ERO/ERN, de unos niveles disminuidos de antioxidantes, o por ambas razones⁹.

Las ERO/ERN pueden ser generadas por fuentes exógenas y endógenas; las fuentes exógenas son radiaciones ionizantes (por ejemplo, rayos X), sustancias químicas oxidantes, luz solar ultravioleta (UV)¹⁰, ejercicio extenuante o vigoroso¹¹, tabaco, exposición a O₃, hiperoxia, sustancias contaminantes en el aire⁷ y diversos medicamentos¹². En lo referente a las fuentes endógenas, pueden ser causa de ER la exposición crónica a una infección vírica¹⁰, y la respiración mitocondrial y enzimas productoras de especies reactivas (ER)¹³, entre otras.

La medida directa de producción de ERO/ERN es muy compleja debido a la alta reactividad de estos y a su baja concentración en estado estacionario. Aunque la técnica de resonancia de espín electrónico, también conocida como técnica de resonancia paramagnética electrónica, es un método directo fiable de detección de ER que tienen un electrón desapareado, esta técnica requiere de un equipamiento caro y es compleja de desarrollar, al igual que otras técnicas de medición directa. Por ello, la evaluación de daño oxidativo se suele llevar a cabo, habitualmente, a través de métodos indirectos¹⁴.

Por norma general, la cuantificación de daño oxidativo en humanos se lleva a cabo mediante dos estrategias: evaluación del potencial oxidativo *ex vivo* (por ejemplo, susceptibilidad del plasma o lípidos a oxidarse), o evaluación de la concentración de productos oxidativos en gas expirado, fluidos corporales³, tales como orina, sangre y líquido nasal, y tejido muscular¹⁴.

Con frecuencia, las ERO/ERN reaccionan con moléculas biológicas formando una molécula oxidada. Esta molécula dañada se convierte entonces en una especie de “huella dactilar” que puede ser empleada como marcador de estrés o daño oxidativo¹⁵.

Pero, un marcador debe cumplir los siguientes criterios técnicos para ser considerado un marcador ideal de daño oxidativo en tejidos¹⁶:

- El marcador debe detectar un porcentaje fijo del total del daño oxidativo desarrollado *in vivo*.
- El coeficiente de variación entre ensayos debe ser pequeño, preferentemente inferior al 10%.
- La medida del marcador debe emplear técnicas químicas fiables.
- El nivel del marcador *in vivo* no debe ser influenciado por la dieta.
- El marcador debe ser estable durante el almacenamiento de la muestra (por ejemplo, pérdida del marcador o formación de artefactos durante su almacenamiento).

Desafortunadamente, aunque existen marcadores más fiables que otros, ninguno de los actuales cumple todos los criterios técnicos comentados. Por ello, a la hora de emplear marcadores de daño oxidativo se recomienda tener en cuenta las limitaciones de las medidas indirectas de daño oxidativo¹⁵ (Tabla 2).

Tabla 2. Pros y contras de marcadores de daño oxidativo¹⁵.

ENSAYO	PROS	CONTRAS
Dienos conjugados	Barato Sencillo	Baja validez
Ácido tiobarbitúrico	Barato Simple	Problemas técnicos
Hidroperóxidos lipídico	Barato	Alto error, sobreestimación habitual
4-hidroxinonenal	Fiable	Riesgo de artefacto, en cierto modo complicado
Isoprostanos F ₂	Fiable Sensible (GC-MS)	Caro, complejo (GC-MS)
Carbonilos	Fiable, específico (electroforesis)	Caro
Oxidación de Tioles	Barato Sencillo	Riesgo de artefacto
Aminoácidos oxidados	Sensible Fiable (GC-MS)	Complejo, duradero, caro
8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	Numerosos ensayos disponibles	Alto riesgo de artefacto, semicuantitativo
Ensayo Cometa	Válido (<i>in vivo</i>)	Complejo, no se puede usar biopsia muscular

Aunque la presencia de ER es potencialmente dañina para el organismo debido a su elevada reactividad, se sabe que su presencia no siempre es perjudicial. En este sentido, los ERO/ERN tienen un papel esencial como mensajeros secundarios de diversas vías de señalización extracelular¹⁷ e intracelular¹⁸, jugando un papel importante en la regulación de genes que codifican factores de transcripción, diferenciación y desarrollo⁵. Asimismo, las células inmunes tienen la capacidad de producir ER durante el proceso de estallido respiratorio con el fin de eliminar patógenos¹⁷. Además, las ERO/ERN actúan como estimuladores de la adhesión célula-célula y están envueltas en la regulación de los vasos sanguíneos, en la proliferación de los fibroblastos y en la expresión incrementada de las enzimas antioxidantes, siendo esto último observado cuando los individuos llevan a cabo ejercicio de forma habitual¹⁴. Por último, son esenciales para diversos procesos fisiológicos tales como el envejecimiento y la apoptosis⁵.

Cuando la capacidad endógena antioxidante se ve superada por la producción de ERO/ERN se rompe la homeostasis y estas ER actúan como metabolitos secundarios indeseables, generando daño oxidativo a moléculas tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y glúcidos^{7,19}, siendo la oxidación de las tres primeras los procesos químicos más habituales²⁰. Este daño oxidativo a biomoléculas causa, entre otros, apoptosis o muerte celular⁹ y está relacionado con la etiopatogenia de diversas patologías agudas y crónicas tales como aterosclerosis, hipertensión, hipercolesterolemia, obesidad, cáncer, diabetes mellitus y desórdenes neurodegenerativos, además de envejecimiento¹³ y fatiga muscular²¹.

1.1.1 Daño oxidativo al ADN

El ADN nuclear (ADN_N) es menos susceptible al daño oxidativo que las proteínas y los lípidos debido a su estructura de doble hélice, a la protección de las histonas y otras proteínas de revestimiento²², y a las propiedades de atrapamiento de RL de la cromatina asociada²³. Por el contrario, el ADN mitocondrial (ADN_M) es más susceptible al daño por las ERO debido a su proximidad con el lugar de mayor generación de RL de la cadena de transporte de electrones (CTe) (membrana interna mitocondrial), a la falta de protección de las histonas y a los mínimos mecanismos de reparación existentes. En este sentido, la incidencia de mutaciones génicas en el ADN_M es 5-10 veces superior a la observada en el ADN_N².

El ADN es atacado constantemente por las ERO. Éstas solamente causarán lesión al ADN cuando sean generadas en exceso, cuando la defensa antioxidante celular esté disminuida²⁴ o cuando los procesos de reparación sean dañados y no aseguren la integridad del ADN²².

El daño oxidativo al ADN puede ser debido a fuentes endógenas como inflamación o fuga de electrones desde la mitocondria¹, y exógenas. Las principales fuentes exógenas de daño al ADN son la luz UV y las radiaciones ionizantes²⁵; asimismo, ejercicio, tabaco y factores dietéticos como restricción calórica, consumo de grasas, y vitaminas y minerales antioxidantes están relacionados con el daño al ADN. Además, la edad influye en el daño al ADN a causa de una reducción de los procesos de reparación del ADN dañado²³.

El daño oxidativo al ADN es debido al OH• principalmente²⁴, aunque también son capaces de modificar directamente las bases nitrogenadas del ADN ¹O₂, ROO• y RO•, O₃, NO• y ONOO•^{22,23}.

En sistemas vivos, el OH• es generado por rotura dependiente del ión metálico de H₂O₂. En presencia de ión cúprico (Cu⁺²) o ión ferroso (Fe⁺²), el H₂O₂ se convierte en OH• por la reacción de Fenton. Una vez generado junto al ADN, éste ataca tanto al azúcar desoxirribosa como a las bases nitrogenadas purinas (citosina y tiamina) y pirimidinas (adenina y guanina)²⁴ debido a la presencia en su estructura de N₂ y O₂, altamente susceptibles a la reacción con especies electrófilas²². Por el contrario, el ¹O₂ es selectivo para guanina²⁵.

El daño oxidativo al ADN por acción de los RL genera: roturas de cadena, modificaciones de residuos de desoxirribosa y de bases nitrogenadas, entrecruzamientos entre cadenas de ADN, y entre cadena de ADN y proteínas, aductos cíclicos intra-ADN, y lugares sin bases nitrogenadas²⁵.

El daño oxidativo a la cadena hidrocarbonada de la desoxirribosa, a través de la abstracción de un ión hidrógeno (H⁺), causa fragmentación de una o ambas hebras²².

En el proceso de modificación de las bases nitrogenadas las reacciones se centran, primordialmente, en los C₄ y C₈ de purinas, y en los C₅ y C₆ de pirimidinas. Y, dentro de éstas, la modificación o lesión de guanina es la más habitual²⁶ debido a su bajo potencial de oxidación¹².

Con respecto a los aductos, se han caracterizado unos 20: 8-hidroxi-2'-dexosiguanosina (8-OHdG), timina glicol, timidina glicol, 5-hidroximetiluracilo, uracilo glicol, 8-oxoguanina, etcétera²³. Se estima que en las células de mamíferos existen en torno a 1,5x10⁵ aductos oxidativos por célula²².

El daño oxidativo al ADN seguido de reparación es constante y continuo a nivel celular, ejecutándose en torno a 10¹⁶-10¹⁸ eventos de reparación por célula y día²⁶, produciéndose una retirada de las bases dañadas por parte de enzimas reparadoras²⁴. En este sentido, más de 130 genes están envueltos en los mecanismos de reparación²⁵, y existen 5 vías principales de reparación del ADN, que son (a) reparación por escisión de nucleótido, (b) por escisión de bases, (c) reparación de errores de emparejamiento, y las vías de reparación de rotura de hebra hélice, conocida como reparación recombinativa, (d) reparación por unión

de extremos no homólogos y (e) por recombinación homóloga^{27,28}. Ahora bien, el sistema de reparación de ADN puede verse superado o las enzimas de reparación pueden verse alteradas por la acción de las propias ERO¹⁰, lo que genera una acumulación de bases dañadas con el paso de los años que ha sido asociado a mutaciones, disfunción celular²⁸, envejecimiento y diversos procesos patológicos tales como enfermedades neurodegenerativas y cáncer²⁵.

Los fragmentos de desoxirribosa son potentes mutágenos y bloquean la acción de la ADN polimerasa²³. El daño a histonas genera entrecruzamientos que interfieren en el plegado de la cromatina, la reparación de ADN y la transcripción génica. Las ERO activan la transducción del proceso de señalización celular y modulan la actividad de proteínas y genes de respuesta a estrés, que regulan los genes relacionados con crecimiento y diferenciación celular. Además, las ERO generan la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial ya que el ADN_M codifica las proteínas esenciales envueltas en los procesos de fosforilación oxidativa², lo que sobreestimula la generación de ERO/ERN mitocondriales y favorece el daño al ADN_M, en una secuencia de eventos que finaliza por la inducción de la apoptosis²³.

Las medidas directas *in vivo* representan una combinación del nivel de ataque de ERO, del estado antioxidante del individuo y de la actividad de los mecanismos de reparación de ADN²³.

Las medidas de daño al ADN pueden ser clasificadas en 2 categorías: medida de daño oxidativo al ADN en células en estado estacionario y estimación del daño oxidativo total al ADN, consistente en la detección de subproductos del daño excretados a través de orina¹⁵.

Varias bases nitrogenadas de ADN dañado pueden ser excretadas por la orina al ser muy solubles en agua²³ y medidas por una amplia variedad de métodos. Sin embargo, ya que la orina contiene miles de componentes, la apropiada preparación de la muestra es esencial¹⁵.

Existen 2 métodos principales para la valoración del daño oxidativo al ADN: determinación de 8-OHdG en orina de 24 h y electroforesis en gel de célula simple¹⁵.

La 8-OHdG se genera por acción del OH• sobre la base guanina². Este subproducto, que es un potente mutagénico y un valioso marcador de

carcinogénesis⁷, es la base modificada empleada más frecuentemente como marcador de daño oxidativo al ADN. Tras su aislamiento, ésta puede ser medida mediante diversas técnicas: cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y técnicas inmunoquímicas¹⁵.

La validez de la 8-OHdG como marcador de daño oxidativo al ADN en orina se basa en el hecho de que los niveles de 8-OHdG presumiblemente no son modificados por la dieta, al no ser absorbidos los nucleósidos a nivel intestinal²³. Sin embargo, esta medida es problemática porque la 8-OHdG se puede formar durante el procesamiento de la muestra. Para evitar esto se han desarrollado técnicas que miden el daño dentro de células intactas. En este sentido, hay técnicas de anticuerpo que son útiles para visualizar el daño al ADN en células, pero son medidas semicuantitativas¹⁵.

Con respecto a las técnicas inmunoquímicas, existen diversos kits comercializados. Tras el aislamiento celular, el ADN es purificado y posteriormente digerido a desoxinucleótidos (o desoxirribonucleótidos). La cantidad de 8-OHdG es, entonces, determinada mediante técnica de inmunoabsorción enzimática (ELISA)²³.

En cuanto a la electroforesis en gel de célula simple, este ensayo evita la problemática durante el procesamiento de la muestra en la medición de daño oxidativo. Este ensayo, también conocido como ensayo de Cometa, está basado en la determinación de la migración de ADN en un campo eléctrico, el cual deriva en la formación de imágenes en forma de cometa. En esta técnica se visualiza el daño medido al ADN de células individuales y, dependiendo del pH de electroforesis, puede detectar varias formas de daño al ADN²⁹.

1.1.2 Daño oxidativo a proteínas

Los aminoácidos en forma libre o como constituyentes de estructuras proteicas pueden ser dañados por ER, siendo particularmente vulnerables lisina, arginina, histidina, prolina, treonina²², cisteína y metionina⁷.

El daño oxidativo a proteínas, que puede derivar en pérdida de aminoácidos, fragmentación de la estructura proteica, alteración de la carga eléctrica de proteínas y entrecruzamientos de proteínas⁷, es de gran importancia

debido a las diversas estructuras proteicas afectadas (enzimas, receptores de membrana, proteínas transportadoras y proteínas contráctiles) y a la modificación o pérdida de función de las mismas²².

Las estructuras proteicas pueden sufrir 3 tipos de modificación oxidativa: (a) ataque directo de ER sobre ciertas cadenas laterales del aminoácido (glutamina, treonina, asparragina, lisina, arginina y prolina), (b) modificación de residuos de histidina, cisteína y lisina por productos de la peroxidación lipídica, por ejemplo 4-hidroxinonenal (4-HNE), y (c) reacción con azúcares reductores (glicación)³⁰.

El daño oxidativo a proteínas conlleva un incremento de los niveles de grupos carbonilos (aldehídos y cetonas)¹² y de aminoácidos oxidados. Una vez dañadas, las proteínas son catabolizadas, pero los productos carbonilos no sufren este proceso, lo que induce un bloqueo de la proteólisis y una acumulación de proteínas oxidadas. Como resultado, se ven afectados el recambio proteico, la transcripción genética y la integridad celular. Además, las ERO alteran el sistema lisosomal y los proteosomas, vías esenciales en la degradación proteica¹.

Existen diversas técnicas para determinar el daño oxidativo a proteínas: detección de carbonilos usando técnicas de inmunotransferencia, determinación de conjugados de proteína con 4-HNE, valoración de la oxidación de tioles proteicos y análisis de aminoácidos oxidados¹⁵.

En la actualidad, los grupos carbonilos son considerados el mejor marcador de oxidación de proteínas en muestras biológicas. Una vez formados, ante la imposibilidad de ser catabolizadas, su concentración se mantiene estable, pudiendo ser determinados mediante pruebas espectrofotométricas y de fluorescencia, y técnica ELISA, siendo ésta última la técnica más empleada debido a que requiere cantidades microgramo de proteínas y es capaz de medir varias muestras simultáneamente³⁰.

1.1.3 Daño oxidativo a lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la membrana plasmática son las estructuras lipídicas más susceptibles de ser dañadas por los RL bajo situaciones de estrés oxidativo³¹, proceso denominado peroxidación lipídica³².

La peroxidación lipídica es un proceso que engloba 3 fases (Figura 1): iniciación, propagación y terminación. Las ERO que pueden iniciar este proceso son OH^\bullet , RO^\bullet , ROO^\bullet y ONOO^\bullet , siendo el OH^\bullet el más activo de todos ellos; además, iones de metales como ión cuproso (Cu^{+1}) y Fe^{+2} pueden contribuir a la iniciación⁶.

Los productos finales de la peroxidación lipídica son alcanos exhalados y circulantes (pentanos y hexanos), dienos conjugados, hidroperóxidos lipídicos (LOOH), aldehídos lipídicos e isoprostanos^{3,15}.

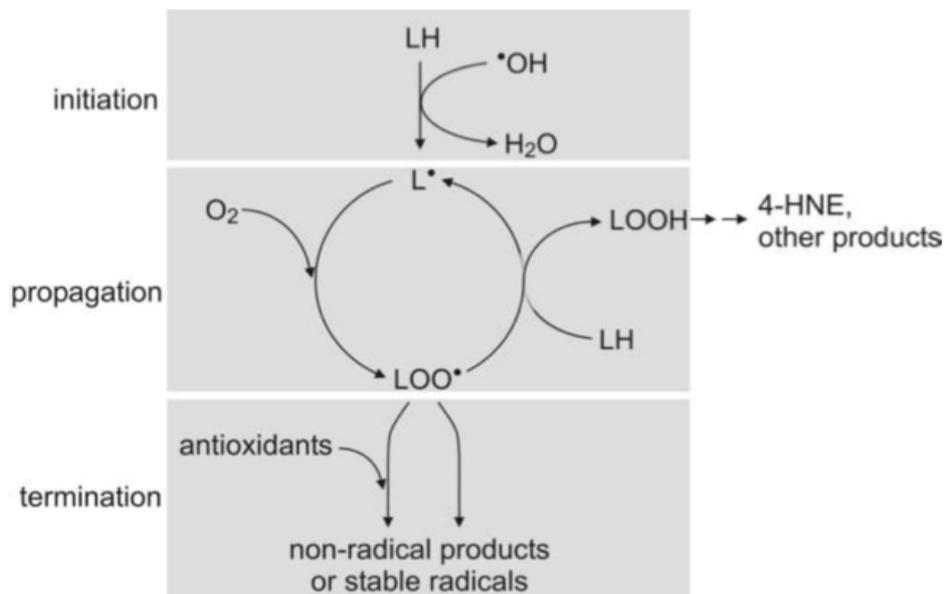


Figura 1. Peroxidación lipídica³³.

Los LOOH acumulados durante la peroxidación lipídica son en sí mismos ERO y pueden generar daño oxidativo a otras biomoléculas. Sin embargo, una fracción considerable de los LOOH son convertidos, de forma no enzimática, a una amplia variedad de productos secundarios, tales como los aldehídos malondialdehído (MDA)⁶ y 4-HNE³³. Éste último, altamente reactivo, puede reaccionar directamente con los fosfolípidos, alterando la integridad y fluidez de membrana⁶, y favoreciendo la activación de la cascada apoptótica², y con el ADN, generando aductos con eteno exocíclico³¹, como los aductos de eteno-2-deoxiguanosina, mutágenos en células humanas³².

Todos estos productos de la peroxidación lipídica pueden ser empleados como marcadores de daño oxidativo a lípidos, sin embargo, muchas de las técnicas empleadas han sido criticadas por su cuestionable precisión y validez³. Aunque existen diversas técnicas para determinar el daño oxidativo a lípidos en muestras biológicas tales como determinación de MDA mediante ensayo de ácido tiobarbitúrico y determinación de conjugados de aldehído (4-HNE)-proteínas mediante métodos basados en anticuerpos (Western Blot y ELISA), los isoprostanos F₂ son considerados el mejor marcador de peroxidación lipídica³⁴.

Los isoprostanos son una serie única de componentes similares a prostaglandinas formadas *in vivo* a través de la peroxidación de ácido araquidónico (ARA) iniciada por los RL de forma no enzimática⁶. Dentro de estos, los isoprostanos F₂ destacan como marcador de peroxidación lipídica. Como resultado del estrés oxidativo, su concentración se ve incrementada en plasma y orina, sin sesgo por ingesta dietética de lípidos³⁴.

El proceso de peroxidación lipídica es inevitable debido a la presencia de algunas ERO en los organismos aerobios y a la presencia de AGPI en las membranas biológicas³³. Cualquier fuente de estrés oxidativo incrementa la peroxidación lipídica y una producción excesiva de productos de la misma está relacionada con la patogénesis de diversas enfermedades⁶, ya que las vías comunes de enfermedades crónicas degenerativas envuelven ERO/ERN y enzimas de respuesta al estrés como lipooxigenasas (LOX) y ciclooxigenasas (COX)³¹.

La peroxidación lipídica está implicada en envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer y Parkinson), arteriosclerosis, diabetes y cáncer^{12,32}, particularmente, en este último caso, bajo condiciones de inflamación crónica³¹.

Asimismo, la peroxidación lipídica ocasiona múltiples disfunciones en procesos celulares: altera la integridad, fluidez y permeabilidad de la membrana⁶, reduce la capacidad de mantener un gradiente de concentración equilibrado e incrementa la inflamación. Como resultado, se produce pérdida de líquido intracelular, disminución del transporte de calcio (Ca⁺²) en retículo sarcoplásmico, alteración de la función mitocondrial, y pérdida de proteínas criptozoicas y enzimas¹.

1.1.4 Daño oxidativo a glúcidos

La oxidación a glúcidos es un proceso químico menos habitual que la oxidación a otras biomoléculas²⁰. Ahora bien, como sucede en el daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN, las ERO/ERN pueden causar daño a glúcidos, especialmente polisacáridos. Estas ER actúan sobre los enlaces glucosídicos generando una fragmentación o despolimerización de los polisacáridos. En este sentido, la fragmentación de la cadena hidrocarbonada de los polisacáridos puede ser causada por las ER O₃, radical hipoclorito (ClO[•]), OH[•], ONOO[•], ¹O₂, NO[•] y ácido nitroso (HNO₂). Además, la despolimerización puede ser debida a la acción de ER derivadas de células (por ejemplo, radical ClO[•] de los neutrófilos) o por acción de ER de forma sincronizada con enzimas; los polisacáridos fragmentados por oxidación de ERO/ERN sirven como sustrato para la rotura enzimática por parte de las glucosidasas, facilitando así la despolimerización⁵.

Como resultado, la despolimerización favorece procesos degenerativos y modificación de funciones de los polisacáridos³⁵.

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y EJERCICIO FÍSICO

1.2.1 Generación de especies reactivas asociado a ejercicio físico

El ejercicio físico se define como cualquier actividad organizada y estructurada que conlleva un incremento de gasto energético y de frecuencia cardíaca, y puede ser clasificado según frecuencia (agudo o crónico), intensidad (aeróbico o anaeróbico) y contracción muscular (concéntrico, excéntrico e isométrico).

La realización de cualquier tipo de ejercicio agudo, ya sea aeróbico, anaeróbico o mixto, conlleva un incremento en la formación de ERO/ERN en individuos sanos^{36,37} y en individuos con patologías³⁸.

Las ERO/ERN se forman principalmente como resultado del metabolismo del O₂³⁹. Las ER generadas inicialmente en el músculo esquelético en reposo y durante el ejercicio son O₂[•] y NO[•]^{40,41}. En reposo, el 2-5% del consumo de oxígeno (VO₂) es convertido a O₂[•], aunque algunos autores indican una conversión

inferior^{1,42}. Sin embargo, durante el ejercicio se produce un aumento del VO_2 de unas 100 veces superior a los valores en reposo como consecuencia de la respiración mitocondrial incrementada, lo que conlleva un aumento de la formación de O_2^\bullet y NO^\bullet ¹⁷.

La mitocondria es el principal lugar de producción de ER en el tejido muscular activo⁴², sobretodo en ejercicio aeróbico agudo⁴³. La formación de ER es consecuencia de la “fuga de electrones” en la CTe en la membrana interna mitocondrial, siendo los complejos I y III los lugares principales de producción mitocondrial de $\text{O}_2^{\bullet-11}$ debido a un acoplamiento inadecuado en la transferencia de electrones entre ambos complejos; su producción también puede tener lugar en retículo sarcoplásmico, túbulos transversos, sarcolema y citosol⁴⁴. El O_2^\bullet es posteriormente reducido a H_2O_2 y OH^\bullet , proceso que requiere metales de transición; la conversión de O_2^\bullet a H_2O_2 se produce por acción de la superóxido dismutasa (SOD). Asimismo, el O_2^\bullet puede reaccionar con el NO^\bullet dando lugar a la formación de $\text{ONOO}^{\bullet-11}$, fuerte agente oxidante que conlleva la depleción de los grupos tioles celulares⁴⁵. Tras su formación, O_2^\bullet , H_2O_2 y OH^\bullet son liberados al espacio intersticial desde las fibras musculares, aunque también pueden ser generados en el espacio extracelular de la membrana plasmática muscular⁴¹.

Con respecto al NO^\bullet , éste se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina usando 3 isoformas diferentes de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). El músculo esquelético expresa normalmente las dos primeras, que requieren un incremento de los niveles de Ca^{+2} para su activación⁴⁶, situación que se produce durante el ejercicio físico⁴⁷; además, la iNOS puede ser expresada en el músculo esquelético durante procesos inflamatorios⁴⁸.

Asimismo, existen otros mecanismos (Figura 2) que contribuyen a la formación de ER durante el ejercicio, entre los que se incluyen: (a) proceso de isquemia-reperfusión o activación de xantina oxidasa (XO); (b) respuesta inflamatoria al ejercicio; (c) activación del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; (d) autooxidación de sustratos; y (f) procesos dependientes de la fosfolipasa A_2 (PLA₂).

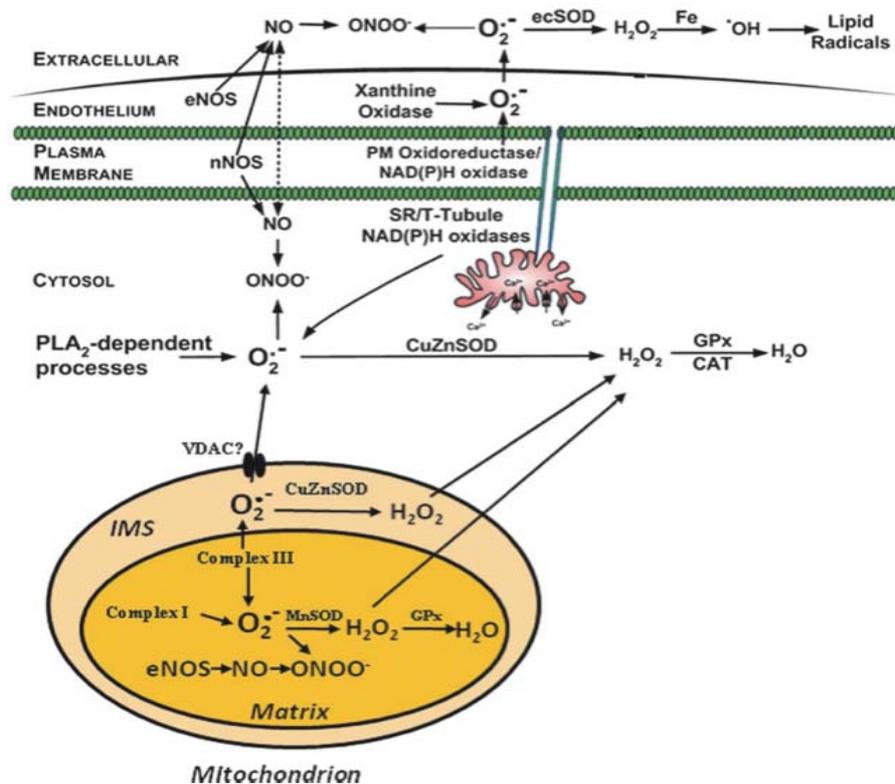


Figura 2. Lugares y mecanismos propuestos para la generación de especies reactivas en la fibra muscular esquelética⁴¹.

Durante el ejercicio físico el flujo sanguíneo es desviado desde diversos órganos y tejidos al músculo activo, lo que conlleva una situación de isquemia en órganos y tejidos; además, una situación de isquemia funcional (hipoxemia) se puede producir en el tejido muscular cuando el ejercicio es de elevada intensidad. Durante la isquemia se produce la conversión de la xantina deshidrogenasa (XD) a XO, enzima que se localiza en las células del endotelio vascular en el músculo esquelético⁴⁹. Tras el cese del ejercicio se produce una reoxigenación (reperfusión) de los tejidos y la XO genera $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 como subproductos de la degradación de hipoxantina a xantina y, posteriormente, a ácido úrico (Figura 3). Este proceso se observa principalmente en ejercicio anaeróbico agudo⁵⁰.

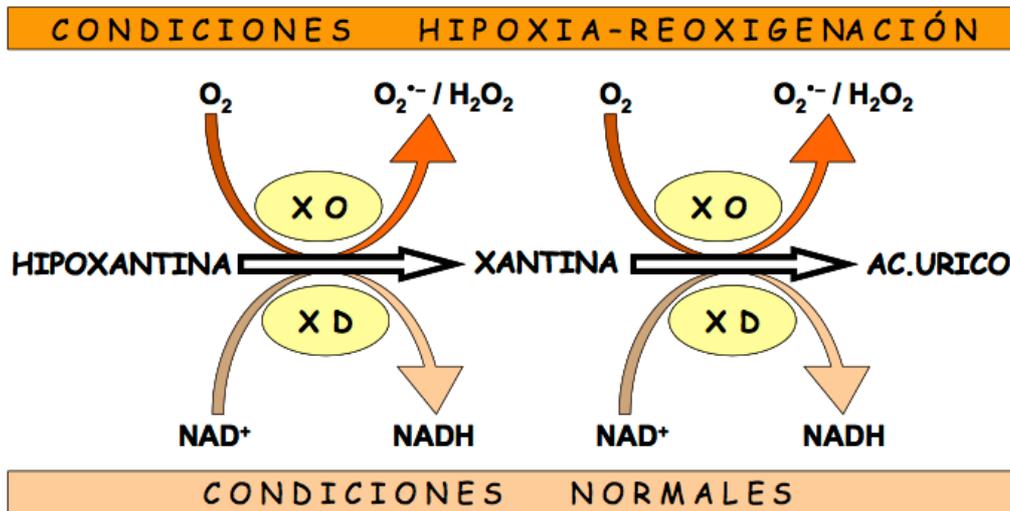


Figura 3. Sistema xantina deshidrogenasa/oxidasa.

Aunque el Fe^{+2} no es fuente de ER, éste juega un papel importante en la producción de los mismos, posibilitando la conversión del H_2O_2 a OH^{\cdot} a través de la reacción de Fenton o Haber-Weiss (Figura 4); este metal de transición es usado como catalizador. Se ha propuesto que la XO puede movilizar Fe^{+2} a partir de la ferritina durante el ejercicio. Por tanto, ya que durante el ejercicio se produce conversión de XD a XO, dicha movilización podría verse incrementada. Además, los altos índices de destrucción de hematíes observados en ejercicios de resistencia con gran impacto pueden incrementar los niveles de Fe^{+2} libre y contribuir a la conversión de H_2O_2 a OH^{\cdot} ⁴. Sin embargo, este proceso no parece tener un rol tan importante en la generación de ER durante el ejercicio ya que el contenido del músculo esquelético humano en enzimas XD y XO es bajo⁴⁴ y el incremento de expresión de XO ocurre predominantemente tras el ejercicio¹⁷.

A consecuencia del desarrollo de ejercicio físico se produce un daño o lesión del tejido muscular. Dicho daño se produce sobretodo en ejercicio anaeróbico agudo, siendo la contracción excéntrica la que induce un daño superior⁵⁰. Tras el daño muscular tiene lugar una respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración del tejido afectado por los neutrófilos y otras células fagocíticas¹⁹. Pero, aunque la respuesta inflamatoria es clave en la recuperación muscular, las ER formadas pueden causar daños secundarios tales como la peroxidación lipídica o daño oxidativo al ADN de células sanguíneas periféricas⁵¹. Tras la

infiltración leucocitaria se produce una explosión respiratoria que implica la formación de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y otras ERO. La enzima mieloperoxidasa (MPX), marcador de activación de neutrófilos *in vivo*²³, contiene Fe^{2+} en su estructura y cataliza la reacción entre H_2O_2 y anión cloruro (Cl^-), dando lugar a la formación de $HClO$, que es un potente oxidante²⁶.

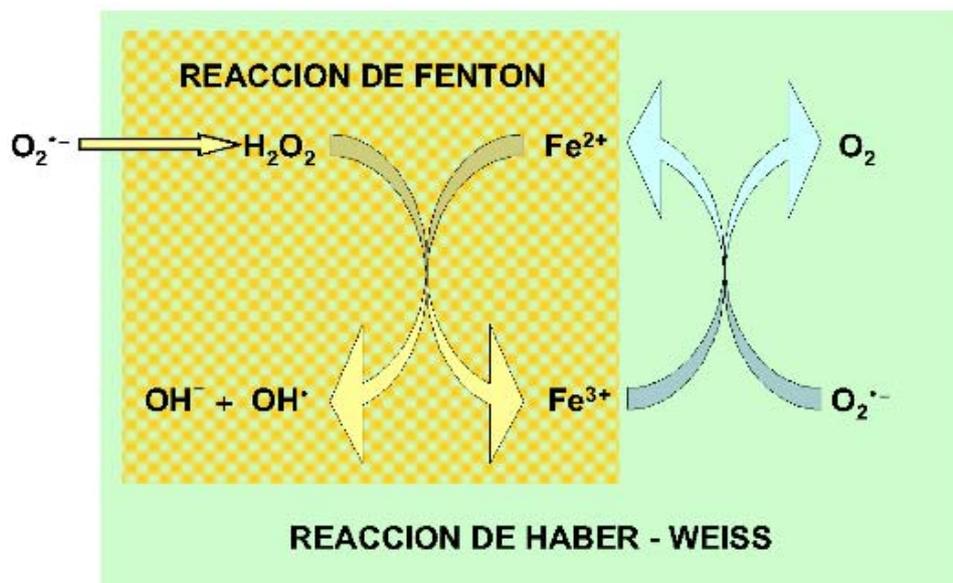


Figura 4. Reacción de Fenton o Haber-Weiss.

A nivel del músculo esquelético, el complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa se localiza en retículo sarcoplásmico, túbulos transversos y sarcolema⁴⁴. Durante la contracción muscular, o en eventos inflamatorios o microbianos, la forma reducida ($NADP^+$) es convertida a la forma oxidada ($NADPH$). Así, el O_2 es reducido y se forman grandes cantidades de $O_2^{\bullet-}$ que pueden ser convertidos a H_2O_2 ⁷. El estímulo para que se produzca dicha conversión durante el ejercicio parece ser la proteólisis causada por las alteraciones en la homeostasis del Ca^{+2} intracelular, el estrés térmico y la oxidación de los grupos tioles⁴.

Durante el ejercicio se produce una elevación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) a nivel plasmático, y su oxidación puede producir $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y otras ER¹⁴. Además, la oxidación de proteínas hemáticas tales como oxihemoglobina y oximioglobina genera $O_2^{\bullet-}$ y, posteriormente, H_2O_2 ; este último

puede reaccionar con metahemoglobina y metamioglobina, dando lugar a la formación de un RL en la proteína globina. Asimismo, el incremento de la presión parcial de O_2 (PO_2) producido a nivel mitocondrial durante el ejercicio favorece la oxidación de la metahemoglobina y la consiguiente formación de O_2^{\bullet} ¹⁷.

Por último, la PLA_2 es una enzima que puede activar el complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa y que hidroliza los fosfolípidos de la membrana para liberar ARA, que es sustrato para sistemas de enzimas generadoras de ERO como las LOX. El incremento de Ca^{+2} intracelular durante el ejercicio conlleva la activación de las formas dependiente e independiente de la PLA_2 , generándose ERO en mitocondria y citosol que son posteriormente liberadas al espacio extracelular⁴².

1.2.2 Tipos de ejercicio físico y estrés oxidativo

La realización de ejercicio físico conlleva un incremento en la formación de ER, pero el estrés oxidativo sólo se produce cuando la generación de ER supera a las defensas antioxidantes. Por tanto, los índices de estrés oxidativo inducido por el ejercicio dependerán de la intensidad y duración del mismo^{11,52}. De este modo, durante ejercicios de baja intensidad y corta duración, las defensas antioxidantes pueden contrarrestar la producción de ER, pero a intensidad y duración mayor estas defensas no son adecuadas y se origina el daño oxidativo a tejidos⁵⁰. En este sentido, se sabe que el ejercicio físico intenso conlleva un incremento en la formación de ER, lo que ha quedado demostrado por los cambios observados en parámetros pro-antioxidantes tales como glutatión y enzimas antioxidantes⁵³, productos de la peroxidación lipídica como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), isoprostanos¹⁹ y LOOH⁴, y productos de la oxidación a proteínas como carbonilos²³, entre otros. Además, el nivel de entrenamiento⁴³ y el tipo de contracción muscular también influye en la formación de ER y, por tanto, en los índices de estrés oxidativo³⁶.

Aunque sólo las cargas agudas de ejercicios con suficiente intensidad y duración pueden producir estrés oxidativo, no todos los ejercicios generan estrés oxidativo de igual forma (Figura 5). Así, el ejercicio aeróbico agudo genera inicialmente más ERO, induciendo alteraciones de la homeostasis redox que pueden perdurar varias horas postejercicio. Por el contrario, el ejercicio

anaeróbico agudo puede ocasionar un estrés oxidativo más prolongado en el tiempo³⁶.

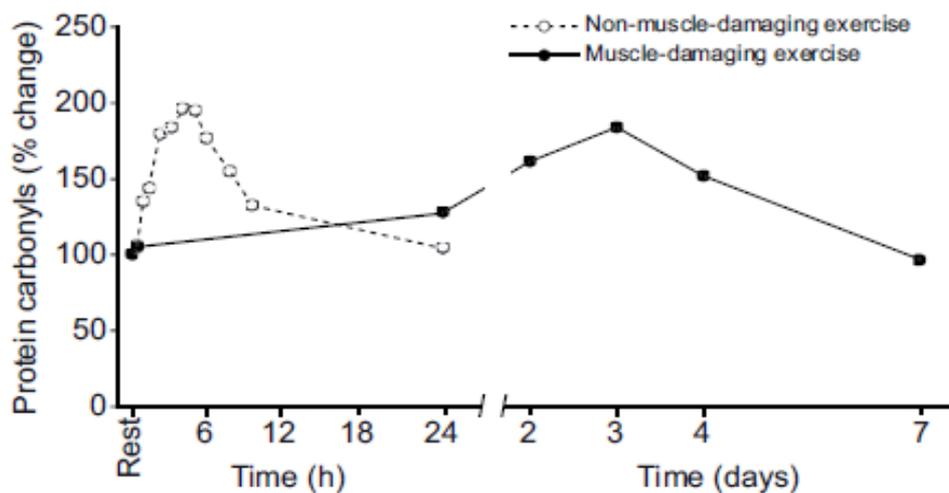


Figura 5. Efectos del ejercicio aeróbico y anaeróbico sobre los carbonilos proteicos a nivel plasmático³⁶.

La CTe mitocondrial es el principal lugar de formación de ER durante el ejercicio aeróbico⁴³. El incremento del flujo de O₂ en el músculo esquelético activo aumenta la fuga de electrones a nivel mitocondrial, lo que incrementa la formación de ER⁵².

El ejercicio anaeróbico agudo tiene la capacidad de generar un incremento en la producción de RL durante y tras el ejercicio. Durante el ejercicio se produce un incremento del VO₂ y de la respiración mitocondrial, pero en menor medida en comparación con cargas de trabajo aeróbico agudo. Tras el ejercicio, como consecuencia de los periodos de isquemia-reperusión derivado de la contracción muscular intensa y del daño muscular inducido, se produce un incremento en la formación de ER vía desencadenamiento de la actividad de las enzimas generadoras de RL e iniciación de la migración de células inflamatorias al área afectada. De forma global, el estrés oxidativo observado durante y tras el ejercicio anaeróbico es mediado por: activación de XO y complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, explosión respiratoria fagocítica, daño a proteínas que contienen Fe⁺², oxidación incrementada de purinas, alteración de la homeostasis de Ca⁺², acidosis y autooxidación de catecolaminas⁴³.

Por último, todas las formas de ejercicio anaeróbico generan daño muscular y, por tanto, estrés oxidativo incrementado. Ahora bien, el daño muscular inducido por contracción excéntrica es superior al inducido por contracción concéntrica⁵⁰. Sin embargo, la contracción concéntrica puede inducir gran daño muscular si la intensidad y/o duración es elevada (por ejemplo, sprints repetidos o ultramaratonés). Asimismo, un ejercicio isométrico corto (por ejemplo, ejercicio con mancuerna al 50% de contracción voluntaria máxima de 84-170 s) es capaz de incrementar la producción de ER e inducir estrés oxidativo³⁶.

1.2.3 Rendimiento deportivo, salud y estrés oxidativo

Aunque el ejercicio agudo es fuente de daño oxidativo, la producción incrementada de ER no tiene necesariamente un impacto negativo sobre la salud y el rendimiento deportivo⁹. Así, bajos niveles de ER son esenciales para una contracción muscular óptima⁴². Sin embargo, la exposición a altas concentraciones de ERO de forma aguda y crónica puede afectar negativamente a la salud y el rendimiento deportivo, respectivamente.

Con respecto al rendimiento deportivo, se sabe que las ER tienen la capacidad de alterar proteínas contráctiles musculares y enzimas mitocondriales requeridas para la generación de adenosín trifosfato (ATP), como la succinato deshidrogenasa y la citocromo oxidasa⁵⁰. Como resultado, se produce alteración de la función contráctil, reducción de la fuerza máxima y desarrollo de fatiga aguda¹⁷.

Referente a la alteración de las proteínas contráctiles musculares, se sabe que altos niveles de exposición a ER influye sobre la función y estructura de los miofilamentos. En este sentido, la miosina y la troponina C son susceptibles a la oxidación, no presentando susceptibilidad redox ni actina ni tropomiosina (constituyentes de los filamentos delgados). Asimismo, altos niveles de exposición alteran las cinéticas de los puentes cruzados de actina-miosina y disminuyen la sensibilidad al Ca^{+2} de los miofilamentos⁵⁴.

En cuanto a la producción energética, parece ser que la generación incrementada de NO^\bullet afecta negativamente a la producción mitocondrial de ATP y, por tanto, a la producción de fuerza a través de la inhibición de enzimas mitocondriales. Además, los derivados de NO^\bullet inhiben la actividad de la

gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y creatina fosfoquinasa (CPK), lo que podría limitar la producción y/o regeneración de ATP⁵⁴.

Por último, la producción incrementada de ER influye sobre la dinámica celular de Ca^{+2} y, por tanto, la contractibilidad muscular. Por un lado, la generación de ER parece tener influencia sobre la liberación de Ca^{+2} por parte del retículo sarcoplásmico a través de la oxidación de los receptores de rianodina (canales de Ca^{+2} intracelulares que median en la liberación de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplásmico hacia el sarcoplasma). Por otro lado, la bomba de $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ ATPasa es susceptible al estrés oxidativo, y el daño a la misma reduce significativamente la captación de Ca^{+2} por parte del miocito⁵⁵.

En lo que respecta a la salud, tanto la inactividad física como la exposición prolongada a altos niveles de ER tienen un impacto negativo. Así, la inactividad física ha sido asociada a un gran número de enfermedades y condiciones patológicas tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, enfermedades neurológicas (Parkinson y enfermedad de Alzheimer), obesidad y atrofia muscular^{4,56-58}. De igual forma, la exposición prolongada a altos niveles de ER y el estrés oxidativo como resultado del ejercicio crónico de alta intensidad y larga duración, y/o sobreentrenamiento, originan maladaptaciones⁵⁹ como atrofia muscular¹⁴, y han sido relacionados con el envejecimiento⁶⁰ y la etiopatogenia de diversas enfermedades³⁸. Así, la mayoría de estudios han vinculado las ERO a estados patológicos tales como cáncer, diabetes mellitus tipo I y retinopatía asociada, diabetes mellitus tipo II (resistencia a la insulina), enfermedades cardiovasculares, obesidad⁶¹, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas⁴.

Por el contrario, el ejercicio de moderada intensidad llevado a cabo de forma regular muestra numerosos efectos beneficiosos⁶². De este modo, el ejercicio moderado regular presenta un efecto preventivo en la carcinogénesis⁶³, favorece el mantenimiento de una correcta función neurológica, gracias a la inducción de neurotrofinas, claves en el proceso de neurogénesis³⁶, y mejora la función cardiovascular, parcialmente por la adaptación mediada por el NO^{\bullet} ⁵⁹.

Concentraciones fisiológicas de ER y su producción controlada puede servir para que se lleven a cabo distintos procesos fisiológicos clave como la regulación de tono vascular, metabolismo energético, contractibilidad cardíaca, función inmune, apoptosis^{9,61}, y procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular¹⁴. Además, la exposición regular a concentraciones moderadas de ER

favorece la aparición de adaptaciones fisiológicas al entrenamiento tanto en personas sanas⁴¹ como en individuos que presentan enfermedades o situaciones patológicas³⁸.

Todos los efectos anteriormente mencionados a nivel de salud son dependientes de la intensidad, duración y frecuencia del ejercicio, y coinciden con la teoría de la hormesis, la cual puede ser aplicada a la exposición regular a concentraciones moderadas de ER inducidas por el ejercicio. Según esta teoría, el organismo responde a la exposición repetida de toxinas, sustancias químicas y radiación, es decir, ante sustancias que favorecen el estrés oxidativo (por ejemplo, el ejercicio físico), con una curva en forma de campana (Figura 6). De este modo, tanto inactividad física como ejercicio vigoroso y/o sobreentrenamiento resultarán en una función fisiológica disminuida y una mayor incidencia de diversas patologías; por el contrario, ante el ejercicio regular y moderado, el organismo responderá con una reacción disminuida y/o una resistencia incrementada⁵⁹ que derivará en una mejora de las funciones fisiológicas y una menor incidencia de patologías³⁸. De este modo, se sabe que la presencia continua de pequeños estímulos (por ejemplo, bajas concentraciones de ER) es capaz de inducir la expresión de enzimas antioxidantes, moléculas de reparación de ADN y enzimas de degradación proteica, resultando en reducciones de la incidencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y retraso de los procesos de envejecimiento⁴⁹.

Existe una creciente evidencia de que la generación de ER durante la realización de ejercicio físico juega un papel clave en las adaptaciones inducidas por el mismo. La homeostasis redox es un componente clave en la función celular y en la expresión génica⁵⁰, y las ER generadas durante y tras el ejercicio aportan un enlace entre el disturbio de la homeostasis y las adaptaciones resultantes¹⁷. Así, y bajo condiciones normales, las cargas de ejercicio son seguidas de períodos de descanso y durante éste se produce la adaptación⁵⁹.

Las ER actúan como segundos mensajeros en diversas vías de señalización celular⁴⁰. Las ER presentan las características principales de los segundos mensajeros intracelulares: a menudo alta reactividad selectiva, corta vida media, distintos mecanismos de producción y están presentes en todas las células¹⁷. Así, diversas vías de señalización celular son iniciadas, o al menos potenciadas, por las ER⁴². Estas vías resultan en cambios en la actividad de diversos factores de

transcripción, alterando/modulando la expresión génica⁴¹, con una regulación al alza tanto del ARN_m como de los niveles de enzimas proteicas⁶⁴. De este modo, la activación de estas vías es esencial para el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula muscular durante episodios repetidos de actividad contráctil⁶⁵.

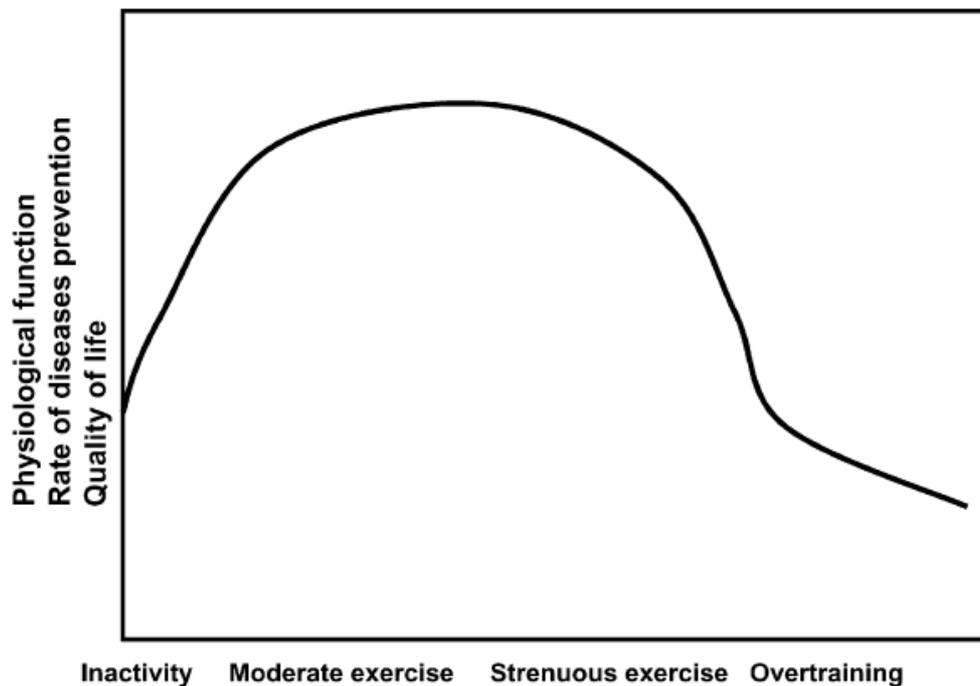


Figura 6. Curva de hormesis y efectos del ejercicio físico⁵⁹.

El músculo esquelético es un tejido maleable que puede experimentar cambios significativos en respuesta a cargas repetidas de ejercicio. Así, un moderado incremento en la producción de ER en el músculo esquelético durante sólo un corto período de tiempo (por ejemplo, minutos) puede activar vías de señalización derivando en adaptación celular y protección contra un futuro estrés. Sin embargo, altos niveles de producción de ERO durante largos períodos de tiempo (por ejemplo, horas) puede resultar en activación crónica de vías de señalización que promueven la proteólisis y, potencialmente, la muerte celular^{45,54}.

La señalización redox por acción de las ER controla la expresión génica a través del estado de fosforilación de los factores de transcripción. En este sentido, las ERO regulan la actividad de diversas quinasas y fosfatasa celulares⁴⁵.

Además, la señalización por las ERO puede ser llevada a cabo por modificaciones dirigidas en residuos específicos de proteínas⁴¹.

La familia de las quinasas dependientes de adenosín monofosfato, conocidas como proteínas quinasas activadas por mitógenos (AMPK), es clave en la señalización celular ya que el control de varias de estas vías se logra mediante la activación o desactivación de proteínas reguladoras a través del proceso de fosforilación. La familia de las AMPK constan de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), AMPK p38, y quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK), siendo todas activadas por el estrés oxidativo inducido por las ER²².

Las AMPK p38 activa el factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) y el coactivador transcripcional 1 *alfa* (PGC-1 α), mientras que la JNK activa factores como la proteína activadora 1 (AP-1). Además, la ERK regula la actividad transcripcional del factor AP-1⁴⁵ y activa al factor NF- κ B⁵⁰.

Las vías de señalización sensible-redox que contribuyen en mayor medida a la adaptación muscular inducida por el ejercicio son las vías de los factores NF- κ B y PGC-1 α . Además, otras vías como la del factor AP-1 y factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1) influyen en las adaptaciones inducidas por el ejercicio.

A nivel músculo esquelético, el NF- κ B es clave para el mantenimiento de la homeostasis celular. Este factor modula la expresión de genes relacionados con procesos celulares (inflamación, crecimiento celular, respuestas a estrés y apoptosis, entre otros) y con diversas adaptaciones inducidas por el ejercicio⁴¹.

Diversas enzimas antioxidantes como la SOD cobre/zinc dependiente (Cu/ZnSOD), la manganeso SOD (MnSOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), al igual que la iNOS, contienen sitios de unión para NF- κ B en el flanco-5' de su región promotora génica (porción de ADN situada al principio del gen que sirve para que las enzimas que realizan la transcripción reconozcan el principio del gen). Por tanto, los genes para estas 4 enzimas son dianas potenciales para la señalización mediada por ERO vía activación de la NF- κ B⁴⁴. En este sentido, se sabe que el ejercicio vigoroso acompañado de daño muscular no induce daño oxidativo al ADN si el ejercicio es realizado por individuos entrenados que han adquirido una capacidad antioxidante potenciada a través del entrenamiento²³. Además, se ha demostrado que los miotubos expuestos a H₂O₂ muestran una regulación al alza del ARN_m para GPx, Cu-ZnSOD, MnSOD y catalasa (CAT), lo

que sugiere que las ERO están envueltas en la regulación adaptativa al alza de la expresión génica de enzimas antioxidantes por el ejercicio⁵⁹. Sin embargo, el efecto del entrenamiento sobre la CAT es controvertido⁶⁴.

El factor NF- κ B también ha sido asociado a la hipertrofia inducida por el ejercicio. La producción de ER es una señal necesaria para el remodelado normal que ocurre en el músculo esquelético en respuesta a cargas repetidas de ejercicio⁴⁴. El daño inducido en el tejido muscular activa la unión del factor NF- κ B al ADN y las proteasas del complejo proteosoma. De este modo, se activa la degradación de las proteínas dañadas y se inicia el proceso de reparación o remodelado. Como resultado, el sarcómero será más fuerte y resistirá mejor el estrés mecánico⁵⁹. Además, las ERO parecen modular la señalización del factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1) y de la interleukina 6 (IL-6), elementos clave en la hipertrofia muscular¹⁴.

Una importante adaptación inducida por el entrenamiento de resistencia es el incremento de la biogénesis mitocondrial (BM), que se produce a través de la vía de señalización AMPK-PGC-1 α ⁴⁷; además del ejercicio de resistencia, los entrenamientos de fuerza e interválicos también podrían conllevar la BM en el músculo esquelético en humanos⁵⁸. La PGC-1 α activa varios factores de transcripción y de receptores nucleares promoviendo la transcripción de sus genes diana, los cuales regulan al alza genes codificados a nivel mitocondrial y nuclear asociados a la síntesis de organelas. Además, regula el metabolismo glucídico y lipídico por la transformación de fibras musculares tipo II a tipo I⁴⁷.

Además, el factor PGC-1 α ha sido relacionado con la adaptación angiogénica del entrenamiento de resistencia. Esta adaptación, esencial en deportistas de resistencia pues incrementa el aporte de O₂ al tejido muscular activo y acelera la recuperación del tejido dañado, es inducida por la regulación al alza del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y de los receptores VEGF 1 y 2, los cuales se ven incrementados tras la actividad muscular. El ejercicio puede producir una isquemia temporal en el tejido muscular, y el factor PGC-1 α , sensor metabólico inducido por la falta de nutrientes y O₂, regula la expresión del VEGF y, por tanto, la angiogénesis en músculo esquelético *in vivo*. Por otro lado, existe un mecanismo de angiogénesis *in vivo*, independiente del VEGF, desencadenado por la hipoxia y consistente en la detección de productos de la peroxidación lipídica por parte de los receptores tipo Toll¹⁴.

Con respecto al factor AP-1, se sabe que su activación es análoga a la activación del NF- κ B. La oxidación inducida por las ERO estimula su activación citosólica pero se requiere un ambiente reducido para su unión al ADN y para la activación de la transcripción. Este factor, junto al NF- κ B, es clave en la regulación al alza de enzimas antioxidantes como la SOD y CAT en respuesta al estrés oxidativo^{54,66}.

Por último, la activación del HSF1 es dependiente de la producción incrementada de ER y/o la presencia de proteínas celulares oxidadas o desplegadas. Este factor regula la expresión génica de proteínas de shock térmico (HSP) como HSP60 y HSP70, entre otras. Durante la realización de ejercicio, la primera respuesta adaptativa que se observa en el músculo esquelético tras el incremento en la actividad de las ERO parece ser una elevación de las enzimas antioxidantes y de las HSP, y el contenido muscular incrementado de estas proteínas ha sido asociado a una protección significativa contra el daño celular posterior⁵⁴.

Pero el entrenamiento de resistencia conlleva más adaptaciones. Primero, el ejercicio regular incrementa/mejora la actividad de las enzimas de reparación del ADN en el músculo esquelético, y en otros órganos vitales como hígado, cerebro y bazo, entre otros³⁶. Esta adaptación en los mecanismos de reparación previene el daño persistente y severo al ADN, con las implicaciones de salud que ello conlleva⁵¹. Segundo, el entrenamiento de resistencia tiene un efecto vasodilatador; el flujo sanguíneo incrementado durante el ejercicio resulta en la activación de la enzima eNOS, que favorece la producción de NO[•]⁴⁸. Tercero, se ha observado una regulación al alza de genes responsables del metabolismo del Fe⁺² y genes de respuesta a la hipoxia¹⁷. Y, cuarto, el entrenamiento también conlleva cambios inmunológicos; así, se ha observado una reducción de la sobreproducción de O₂^{•-} por parte de los neutrófilos, lo que protege a los tejidos adyacentes del daño oxidativo^{4,66}.

El ejercicio moderado y regular también conlleva adaptaciones en individuos de edad avanzada. De forma característica, los individuos de edad avanzada muestran una habilidad reducida a nivel músculo esquelético para responder a un incremento en la generación de ER a causa de una menor capacidad de activación de factores de transcripción y, por tanto, capacidad antioxidante endógeno reducida⁶⁴, lo que conlleva un daño oxidativo a lípidos,

ADN y proteínas superior al observado en individuos jóvenes, tanto en reposo como tras ejercicio vigoroso⁶⁰, y favorece la aparición de diversas patologías asociadas al envejecimiento⁶⁷. El ejercicio regular tiene un efecto “rejuvenecedor” en el contexto del incremento de la actividad de los factores de transcripción, lo que demuestran las múltiples adaptaciones observadas en población de edad avanzada: capilarización incrementada, mayor aporte de O₂ a nivel tisular y mejora de la función neurológica por regulación al alza de neurofinas, e incremento de la actividad del complejo proteosoma (responsable de la degradación de proteínas dañadas), entre otras⁵⁹.

Está claro que la producción de ERO inducida por el ejercicio es una señal clave que modula la expresión génica en el músculo y contribuye a las adaptaciones inducidas por el ejercicio en el músculo esquelético. Algunas ER sirven como señal necesaria para la activación de las AMPK, las cuales a su vez activan factores de transcripción como NF- κ B. Diversas enzimas antioxidantes contienen sitios de unión para NF- κ B en la región promotora génica y, por tanto, cualquier estrategia que reduzca la producción de ERO afectará negativamente a la adaptación de las defensas antioxidantes. Como resultado, por ejemplo, los niveles de MnSOD se verán reducidos⁴⁴ y la susceptibilidad a patologías se verá incrementada³⁸.

En este sentido, diversos estudios han demostrado que la suplementación de antioxidantes en humanos puede retrasar las adaptaciones inducidas por el ejercicio físico al inhibir vías de señalización. Así, la administración de vitamina C previene la expresión de la PGC-1 α , y por tanto la BM en el músculo esquelético, la expresión de varias enzimas antioxidantes en el músculo esquelético y disminuye la sensibilidad a la insulina⁴⁵. La suplementación de vitamina E y C inhibe la inducción del HSP72⁵⁹. Además, se ha observado que la suplementación conjunta de vitamina C (1000 mg) y vitamina E (235 mg de acetato de DL- α -tocoferol, forma sintética de vitamina E) conlleva un menor incremento o reducción de la citocromo c oxidasa subunidad IV mitocondrial y de la PGC-1 α citosólica y una reducción de la expresión génica de AMPK 1, lo que dificulta la BM⁶⁸.

1.3 ANTIOXIDANTES Y ESTRÉS OXIDATIVO

La formación de ER es un proceso natural y continuo, pero debido a su potencial efecto lesivo sobre proteínas, lípidos, ADN y polisacáridos, y por tanto sobre la salud y el rendimiento deportivo, el organismo ha desarrollado una red de mecanismos de defensa de alta eficiencia para contrarrestar los efectos perjudiciales de las ER: los antioxidantes¹¹.

Los antioxidantes fueron definidos, por primera vez, en 1995 por Halliwell y Gutteridge⁶⁹ como “cualquier sustancia que, presente a bajas concentraciones comparado con un sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de ese sustrato”.

De forma típica, los antioxidantes trabajan coordinadamente y protegen a las moléculas biológicas y a los tejidos contra las ER mediante la conversión de éstas en moléculas menos reactivas, proceso conocido como neutralización, o previniendo la conversión de ERO menos reactivas a formas de mayor reactividad, modulando así los índices de estrés oxidativo⁷⁰. Sin embargo, los antioxidantes controlan los niveles de ER sin eliminarlas completamente, ya que éstas son indispensables en diversos procesos bioquímicos como la señalización intracelular, la transcripción génica, la respuesta inmune y la función celular^{71,72}.

Dependiendo de su función, los antioxidantes son clasificados en primarios, secundarios y terciarios (Tabla 3). Los antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas ER, mientras que los secundarios neutralizan los RL. Por último, los antioxidantes terciarios reparan las moléculas dañadas por las ER^{73,74}.

Además, las sustancias antioxidantes pueden ser clasificadas atendiendo a su procedencia en: antioxidantes endógenos y exógenos; los antioxidantes endógenos son sintetizados *in vivo* y se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos desde el punto de vista bioquímico, mientras que los exógenos ingresan en el organismo a través de la dieta.

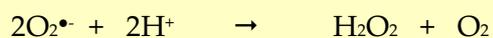
Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes.

PRIMARIOS	Superóxido dismutasas	
	Glutación peroxidadasas	
	Catalasa	
	Proteínas ligadoras de metales	
SECUNDARIOS	Glutación	Ácido α -lipoico
	Vitamina E	Vitamina C
	β -carotenos	Coenzima Q-10
	Ácido úrico	Melatonina
	Bilirrubina	Albúmina
TERCIARIOS	Sistemas proteolíticos intracelulares	
	Enzimas reparadoras del ADN	
	Metionina sulfóxido reductasas	
	Fosfolipasa A ₂ asociada a lipoproteínas	

1.3.1 Antioxidantes endógenos enzimáticos

Los antioxidantes endógenos enzimáticos incluyen las enzimas SOD, GPx y CAT. Éstos, que no se consumen cuando reaccionan, son responsables de la eliminación directa y específica de las ERO¹³ y se localizan en diferentes compartimentos celulares⁷⁵.

La SOD es una oxidoreductasa que conforma la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo, inducido por el O₂[•] y derivados como el ONOO[•], mediante la dismutación del O₂[•] a H₂O₂ y O₂. Posteriormente, el H₂O₂ será catalizado a H₂O por las enzimas GPx, CAT y/o peroxirredoxinas (PRX)^{71,72}.



El mecanismo de dismutación (Figura 7) implica reducción y reoxidación oscilante de un metal de transición (Cu y Mn) en el sitio activo de la SOD. Por tanto, su actividad requiere un metal de transición como cofactor⁷¹.

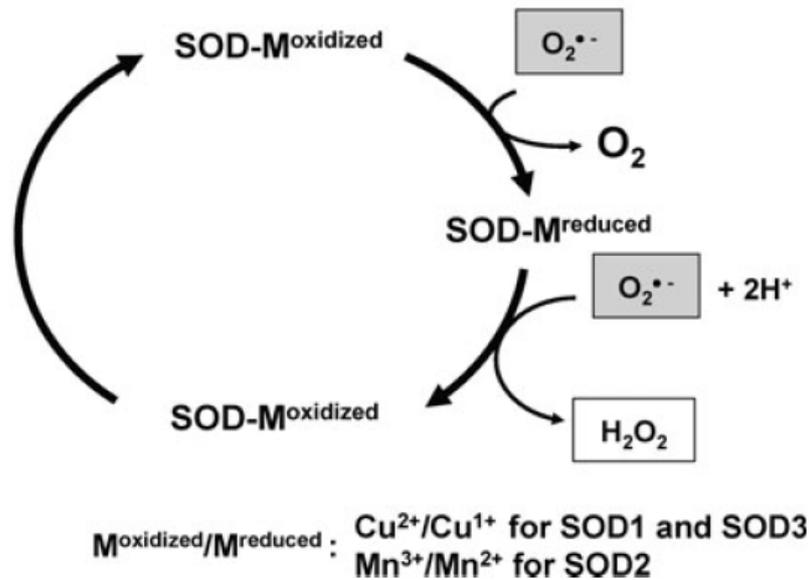


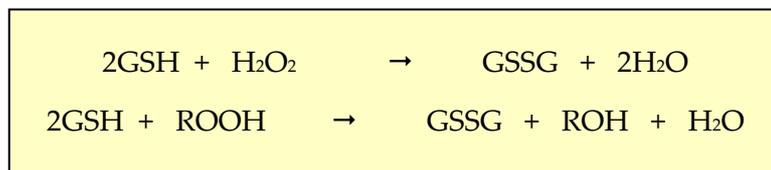
Figura 7. Neutralización del radical superóxido por acción de las enzimas superóxido dismutasa⁷¹.

En células de mamíferos existen 3 isoformas de SOD: SOD1 o Cu/ZnSOD, SOD2 o MnSOD, y SOD3 o SOD extracelular (ecSOD). Estas isoformas presentan diferente localización celular, pero catalizan la misma reacción. Así, la Cu/ZnSOD se localiza principalmente en el citosol y, en menor medida, en el espacio intermembranoso mitocondrial (también se encuentra en núcleo, lisosomas y peroxisomas), mientras que la MnSOD se localiza en la matriz mitocondrial y la ecSOD en la matriz extracelular (vasos sanguíneos, pulmón, riñones, útero y, en menor medida, en corazón)⁷².

La Cu/ZnSOD es la principal SOD intracelular, y su actividad enzimática depende de la presencia de Cu y Zn. Así, la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por Cu/ZnSOD implica procesos de reducción y oxidación cíclica del Cu. De igual forma, la ecSOD requiere la presencia de Cu para desarrollar su acción catalítica, estando íntimamente relacionada su acción al contenido en Cu. Por último, la MnSOD,

principal SOD mitocondrial, requiere la presencia de Mn para llevar a cabo la dismutación de $O_2^{\bullet-71}$.

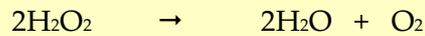
La GPx es una enzima selenio (Se) dependiente que presenta 6 isoformas en células de mamíferos (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5 y GPx6)⁷⁶ que catalizan la reducción de H_2O_2 y hidroperóxidos orgánicos a H_2O , alcohol (ROH) y glutatión oxidado o glutatión disulfuro (GSSG), usando como dador de electrones glutatión reducido (GSH) o, en algunos casos, tioredoxina (TRX) y glutarredoxina (GRX). Cuando la GSH es el dador de electrones, dona un par de H^+ y es convertida a GSSG⁵⁴.



Puesto que la GSH es oxidada por GPx para formar GSSG, las células deben poseer una vía capaz de regenerar GSH. Así, la reducción de GSSG a GSH es lograda por la acción de la glutatión reductasa (GR), que emplea el complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa como agente reductor. Diversos tejidos producen NADPH por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa a través de la vía de las pentosas, pero el músculo esquelético genera NADPH principalmente a través de la vía de la isocitrato deshidrogenasa⁵⁴.

Con respecto a su ubicación, la GPx se localiza en el citosol y en la mitocondria, siendo la GPx1 la isoforma mayoritaria en todos los tipos de células⁷⁷. Aunque su actividad a nivel muscular se reparte por igual entre citosol y mitocondria, la actividad GPx varía según el tipo de fibra muscular. Así, existe mayor actividad GPx en las fibras con alto componente aeróbico (tipo I) que en las fibras de componente anaeróbico (tipo II), las cuales presentan una menor capacidad oxidativa¹⁴.

La CAT es un homotetrámero, dependiente de Fe^{+2} , cuya función principal es catalizar la reducción de H_2O_2 a H_2O y O_2^{72} . Asimismo, aunque comparte sustrato con la GPx, la CAT muestra una afinidad muy inferior para H_2O_2 a bajas concentraciones y comparado con GPx⁵⁴.



La CAT está ampliamente distribuida dentro de las células. A nivel celular, se localiza en citosol y mitocondria⁷⁰, y al igual que la GPx, su actividad varía según el tipo de fibra muscular, encontrándose en mayor concentración en las fibras tipo I¹⁴.

Además de las enzimas antioxidantes endógenas, las células contienen otras enzimas que contribuyen, directa o indirectamente, a la homeostasis redox: enzimas basadas en tioles, como TRX, GRX, PRX^{78,79} y metionina sulfóxido reductasa⁸⁰, melatonina⁸¹, PLA₂ asociada a lipoproteínas⁸², sistemas proteolíticos intracelulares⁸³ y enzimas encargadas de la reparación del ADN^{84,85}.

1.3.2 Antioxidantes endógenos no enzimáticos

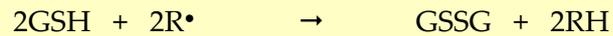
Los antioxidantes endógenos no enzimáticos incluyen: tioles, como glutatión y ácido α -lipoico, coenzima Q 10, ácido úrico, y proteínas fijadoras de metales pesados (Fe^{+2} y Cu^{+2}). Estos están presentes, al igual que los antioxidantes endógenos enzimáticos, en diferentes compartimentos celulares y presentan propiedades antioxidantes distintas que maximizan su efectividad.

El glutatión es el tiol intracelular más abundante y se puede encontrar en su forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG), siendo predominante la primera. Es un tripéptido constituido por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina (L-glutamil-L-cisteinilglicina)⁸⁶.

Su síntesis se lleva a cabo, principalmente, a nivel hepático y una vez formado es transportado a los tejidos a través de la circulación⁵⁴. El proceso de síntesis se lleva a cabo a nivel citoplasmático gracias a la acción conjunta y consecutiva de las enzimas γ -glutamilcisteína sintasa y la sintasa de GSH. Una vez formada, es intercambiada con otros compartimentos intracelulares, incluido la mitocondria⁸⁶.

Como antioxidante, la GSH puede reaccionar directamente con una variedad de RL ($\text{OH}\cdot$ y peróxidos orgánicos), actuando como dador de un H^+ . Además, sirve como sustrato para la eliminación de H_2O_2 e hidroperóxidos

orgánicos por parte de la GPx. Por último, también está envuelta en la reducción de otros antioxidantes como las vitaminas E y C. En este sentido, la GSH reduce los radicales de vitamina E (α -tocoferoxil) que son formados en las reacciones en cadena con $RO\cdot$, $ROO\cdot$ y $ROOH\cdot$. De forma similar, puede reducir el radical vitamina C (radical ascorbil) derivado de la acción de reciclado de la vitamina E⁵⁴.



La oxidación de la GSH es catalizada por la γ -glutamyltranspeptidasa, localizada sobre la cara externa de la membrana celular y en el plasma, que transfiere la porción γ -glutamyl a los aceptores, es decir, a los RL. Debido a esto, la GSH es convertida, vía GPx, a GSSG. La GSSG está formada por 2 moléculas de GSH unidas mediante enlace disulfuro debido a la oxidación de los grupos tioles. Una vez oxidada, la GSSG puede ser reducida, vía GR, a expensas de NADPH⁸⁶ (Figura 8).

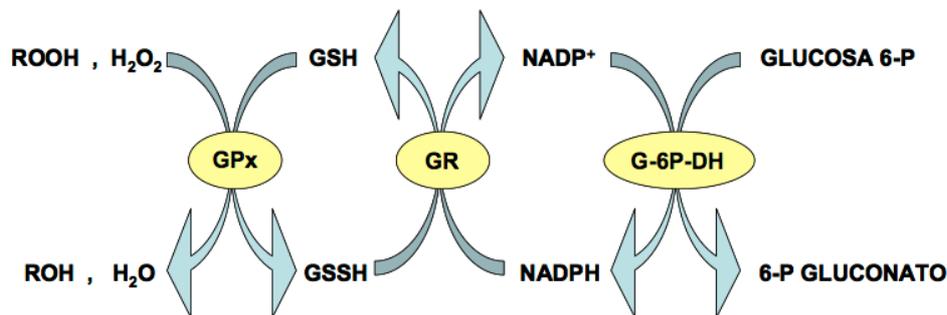


Figura 8. Ciclo redox del glutatión.

En situaciones de elevado estrés oxidativo como el ejercicio se produce una disminución de GSH que contribuye a la rápida disfunción mitocondrial⁷⁰. En esta situación, el NADPH disminuye y se produce una acumulación de GSSG intracelular; la GSSG acumulada formará puentes disulfuro a nivel intracelular o bien será liberada al plasma como proceso de defensa celular¹⁴. Sin embargo, el ejercicio de resistencia de alta intensidad habitual conlleva un incremento de los niveles de GSH debido al aumento de la actividad de las enzimas envueltas en su síntesis⁵⁴.

El índice de GSH y GSSG (GSH/GSSG) es un método ampliamente aceptado de detección de producción de ER y, por consiguiente, de estrés oxidativo. Además, el GSH/GSSG es un útil indicador de riesgo de enfermedad¹⁴.

El ácido α -lipoico (α -LA) es un compuesto organosulfurado que se encuentra de forma natural en la mitocondria y se sintetiza a partir del ácido octanóico⁸⁷. Su síntesis endógena se lleva a cabo a partir de ácidos grasos (AG) y cisteína, pero en muy pequeña cantidad; por tanto, el α -LA debe ser obtenido a través de la dieta⁸⁸. Aunque es acumulado de forma transitoria en muchos tejidos⁸⁷, su acumulación es limitada⁸⁹.

El α -LA actúa como cofactor de la piruvato deshidrogenasa, 2-oxo-glutarato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, entre otras, y por tanto es clave en el metabolismo energético mitocondrial⁸⁷.

El α -LA está presente en el organismo en forma oxidada (LA) o reducida (conocida como ácido dihidrolipoico (DHHLA))⁸⁷. El DHHLA es la forma predominante que inactiva ER, pero la forma oxidada también puede inactivarlas⁸⁸.

Aunque el α -LA presenta efectos antiinflamatorios y antitrombóticos⁸⁹ y actividad antimutagénica y antioncogénica⁸⁸, su principal efecto biológico está asociado con sus propiedades antioxidantes.

Con respecto a su función antioxidante, LA y DHHLA forman una pareja redox con potencial reductor superior a GSH/GSSG, neutralizando diversas ER: LA interactúa con OH^\bullet , HClO y $^1\text{O}_2$, mientras que el DHHLA lo hace con O_2^\bullet y OH^\bullet , previniendo así la oxidación de proteínas mediada por RL. Sin embargo, ninguna es activa contra el H_2O_2 . Asimismo, ambas presentan capacidad para quelar metales tales como Fe^{+2} , Cu^{+2} , e iones hipomanganoso y zinc (Zn^{+2}), y reciclar antioxidantes como GSH, mediante el incremento de expresión de la GR, y vitaminas E y C⁸⁸.

Por último, el α -LA activa diversas quinasas y fosfatasa, modulando así la actividad de factores de transcripción tales como el $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ⁸⁷.

La coenzima Q 10 (Q10) es una molécula liposoluble compuesta de un anillo benzoquinona activo redox, derivado del aminoácido tirosina, conjugado a una cadena isoprenoide de 10 subunidades de isoprenil. Es sintetizada de forma endógena y su ingesta dietética es limitada⁸⁹. La Q10 está presente en todos los

tejidos, por lo que se la denomina ubiquinona, y a nivel celular se localiza principalmente en la membrana interna mitocondrial⁹¹.

La Q10 es componente de la CTe y actúa transfiriendo electrones desde los complejos I y II (succinato coenzima Q reductasa) hasta el complejo III. Además, transfiere protones al espacio intermembranoso mitocondrial contribuyendo a la estabilidad del potencial de membrana y, por tanto, a la síntesis de ATP⁹².

La Q10 presenta 2 isoformas: forma reducida (ubiquinol) y oxidada (ubiquinona), siendo la primera la que muestra capacidad antioxidante⁸⁹. El ubiquinol puede donar uno o 2 electrones para neutralizar las ERO. Así, si dona 2 electrones el ubiquinol se transforma en ubiquinona, y si cede un electrón se transforma en semiquinona; tras su formación, ubiquinona y semiquinona pueden reciclar a ubiquinol mediante oxidación⁹² (Figura 9). De este modo, el ubiquinol previene directamente la progresión de la peroxidación lipídica en membranas celulares e impide la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)⁹³, gracias a su acción neutralizadora de ROO•⁵⁴.

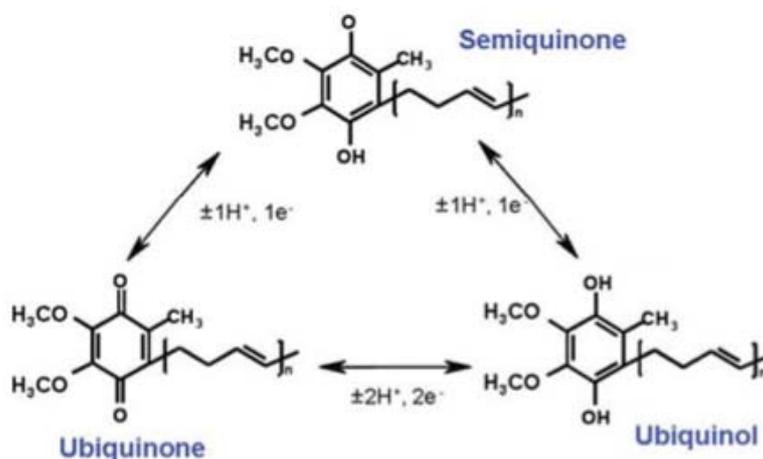


Figura 9. Esquema de las isoformas redox del coenzima Q 10⁹².

Asimismo, la Q10 presenta un efecto estabilizador de los complejos I y II de la CTe, reduciendo la producción de O₂•⁻⁹³, y tiene la capacidad de reciclar antioxidantes como la vitamina E y C⁹².

El ácido úrico es un subproducto del metabolismo de las purinas que, a pH fisiológico, es transformado casi en su totalidad a urato, forma disociada con capacidad antioxidante⁵⁴. Con propiedad antioxidante comparable a la vitamina

C⁹⁴, contribuye a más del 50% de la capacidad antioxidante del plasma⁹⁵ y actúa contra el estrés oxidativo inducido por el ejercicio⁵⁴.

Como antioxidante, el urato actúa como dador de electrones neutralizando ¹O₂, ONOO•, ROO• y OH•, y es capaz de quelar Fe⁺² y Cu⁺². Como resultado, el urato previene la formación de OH• vía reacción de Fenton, la oxidación de ácido ascórbico mediada por Fe⁺², la nitración de proteínas inducida por ONOO• y la peroxidación lipídica, y protege de la oxidación mediada por Cu⁺² a las LDL⁹⁶.

Por ultimo, aunque el Fe⁺² no es fuente de ER, este metal de transición, al igual que el Cu⁺², juega un papel importante en la producción de las ER. Por tanto, cualquier proteína que secuestre estos metales de transición posee capacidad antioxidante al impedir la reacción de Fenton o Heber-Weiss.

La ferritina presenta actividad antioxidante por su capacidad para unirse a Fe⁺² libre. La ferritina induce una rápida oxidación de Fe⁺² en una reacción catalizada por un centro ferroxidasa que consume Fe⁺² y peróxidos, agentes que producen RL tóxicos en la reacción de Fenton⁹⁷. Al igual que la ferritina, la transferrina interactúa con iones férricos pero, en este caso, acepta Fe⁺³ que previamente ha sido generado por la acción de la enzima ferroxidasa ceruloplasmina⁹⁸. Además de catalizar la conversión Fe⁺²-Fe⁺³, la ceruloplasmina es la principal proteína transportadora de Cu⁺² en plasma, en torno al 95% del mismo. Asimismo, neutraliza O₂•^{-98,99}.

La albumina es esencial en el transporte de sustancias y la eliminación de sustancias tóxicas¹⁰⁰, y presenta la capacidad de unirse¹⁰¹ a Fe⁺². De igual forma, hemoproteínas como la hemoglobina (Hb) y mioglobina, tienen capacidad antioxidante debido a su actividad capturadora^{102,103} de Fe⁺².

Entre los productos de degradación del grupo hemo se encuentran la bilirrubina (BR) y la biliverdina (BVR). En humanos, el grupo hemo es degradado por la enzima hemooxigenasa (HO) a BVR, que es entonces reducida a BR por la BVR reductasa (BVRr). La actividad antioxidante de la BR consiste en un ciclo redox en el que ésta es oxidada a BVR, que posteriormente es reciclada a BR por la BVRr. De forma específica, la BR puede neutralizar ROO•, aunque no presenta actividad ante O₂• y H₂O₂¹⁰⁴.

Por último, haptoglobina y hemopexina son proteínas plasmáticas que reducen la formación de ER en caso de hemólisis intravascular. Así, por un lado,

la haptoglobina forma complejos con la Hb de modo que estabiliza y protege el grupo hemo de ésta¹⁰⁵; por otro lado, la hemopexina captura Fe^{2+} con el objetivo de transportarlo al hígado, con la consiguiente prevención del efecto prooxidante del mismo¹⁰⁶.

1.3.3 Antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos contribuyen al mantenimiento de la homeostasis al actuar, principalmente, como cofactores de las enzimas antioxidantes⁷⁰. Los antioxidantes exógenos, cuya fuente principal es la dieta, incluyen: vitamina E, vitamina C, carotenos, polifenoles y diversos oligoelementos tales como Se, Cu y Zn.

La vitamina E hace referencia a un grupo de compuestos fenólicos liposolubles, formado por 8 isómeros, que incluyen 4 tocoferoles (α -, β -, γ - y δ -tocoferol) y 4 tocotrienoles (α -, β -, γ - y δ -tocotrienol) (Figura 10). Aunque todos los isómeros tienen actividad antioxidante¹⁰⁷, el isómero más activo biológicamente es el α -tocoferol, también conocido como RRR- α -tocoferol o d- α -tocoferol⁸⁹, que representa el 90% de la vitamina E en el organismo humano¹⁴.

Aunque varios son los tocoferoles que pueden ser absorbidos, sólo el α -tocoferol se mantiene en plasma y en los tejidos, siendo su vida media en plasma de 48 a 60 h¹⁰⁷. Tras su absorción en el intestino delgado, es transportado a nivel plasmático por las LDL. Una vez en los tejidos, las LDL interactúan con el receptor LDL y son catabolizadas por la lipoproteína lipasa (LPL), produciéndose un intercambio de vitamina E entre las LDL y la membrana plasmática. La vitamina E se localiza en diversos tejidos, incluido el músculo esquelético, y es almacenada en membranas con alto contenido lipídico tales como mitocondria, retículo sarcoplásmico y membrana plasmática. Ahora bien, la mayoría es almacenada en los adipocitos¹⁰⁸.

La principal función de esta vitamina es actuar como antioxidante. Así, la vitamina E es el antioxidante más importante y efectivo en la fase lipídica de la célula, y contribuye a la estabilidad y fluidez de las membranas plasmáticas, y de las lipoproteínas plasmáticas, mediante la prevención de la peroxidación lipídica^{4,108}.

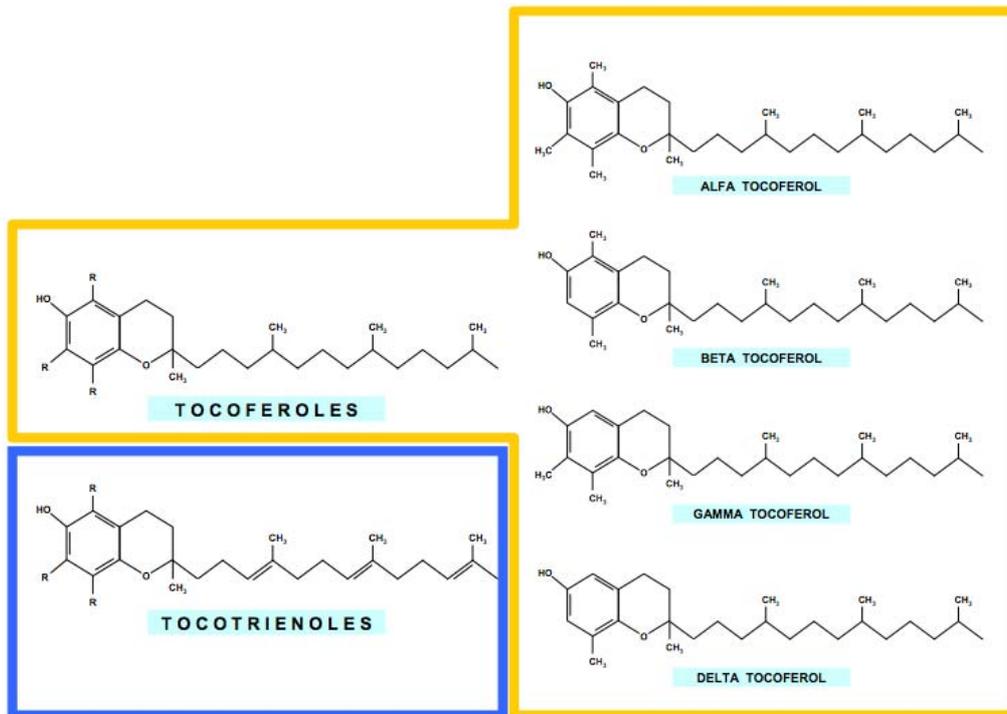


Figura 10. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles.

Como antioxidante, la vitamina E puede neutralizar, gracias a su grupo hidroxilo, las ERO O_2^{\bullet} , OH^{\bullet} , $ROOH^{\bullet}$ y ROO^{\bullet} ¹⁰⁸. Cuando se forma el ROO^{\bullet} , éste reacciona mil veces más rápido con la vitamina E que con los AGPI¹⁰⁷. Al reaccionar con estos RL se origina la forma radical α -tocoferoxil, que puede ser reducida por otros antioxidantes como vitamina C, principalmente, y GSH, ubiquinol, cisteína, retinol y DHLA⁸⁸. Sin embargo, si estos antioxidantes no están presentes, el α -tocoferoxil puede actuar como sustancia oxidante, reiniciando el proceso de estrés oxidativo¹⁰⁷.

Por último, debido a la evidencia de que el ejercicio conlleva un incremento de ER, diversos investigadores han analizado la suplementación de vitamina E, individual o combinada con vitamina C, en deportistas para ver el efecto reductor del estrés oxidativo, y mejorar la función inmune y el rendimiento muscular. Aunque es claro que la vitamina E reduce la peroxidación lipídica, los resultados obtenidos son contradictorios debido a diferencias metodológicas. Asimismo, se ha observado que la suplementación crónica y/o a altas dosis de vitaminas

antioxidantes como la vitamina E puede tener efectos prooxidantes¹⁰⁹ y, consecuentemente, ser perjudiciales para la salud¹¹⁰.

La vitamina C, también denominada ácido ascórbico, es el antioxidante extracelular más abundante, pudiéndose encontrar en plasma y fluidos intersticiales⁴. Esta vitamina no puede ser sintetizada por los humanos debido a la ausencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa a nivel hepático⁸⁹. Tras su ingesta, y debido a su carácter hidrosoluble, el ácido ascórbico es inmediatamente absorbido a nivel intestinal; si su biodisponibilidad es baja se absorbe por transporte activo, mientras que si existe alta concentración plasmática se absorbe por difusión simple. Además, su ingesta en exceso conlleva su degradación en el intestino, causando diarrea osmótica y molestias gastrointestinales, y los riñones pueden modular su conservación o eliminación para mantener el equilibrio orgánico de vitamina C¹⁴. Una vez absorbida, es transportada en plasma en su forma libre, principalmente, aunque puede ser transportada como ácido dehidroascórbico o ligada a albúmina. A nivel celular se localiza en el citosol; está ampliamente distribuida en el organismo, pero a nivel muscular se encuentra en muy baja cantidad (menos de 15 mg/100 g de tejido). Además, se localiza en el citosol de linfocitos en su forma libre¹⁰⁸.

La vitamina C presenta 2 isoformas (Figura 11), una reducida (ácido L-ascórbico o L-ascorbato) y otra oxidada (ácido L-dehidroascórbico), siendo la primera la que muestra actividad antioxidante⁸⁹. El L-ascorbato neutraliza de forma directa $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$, $^1\text{O}_2$, $\text{ROO}\cdot$ y $\text{RO}\cdot$ ⁷⁰; al reaccionar el L-ascorbato se oxida a radical ascorbilo, que es posteriormente reducido a L-ascorbato por la acción de GSH o DHLA, o mediante la acción enzimática de la NADPH ascorbilo reductasa⁸⁸. De forma similar, también regenera antioxidantes como vitamina E, ácido úrico, GSH y β -carotenos¹⁰⁸. Como resultado, la L-ascorbato no sólo protege de forma directa las membranas plasmáticas y las LDL de las ER generadas en fase acuosa, sino que también las protege de forma indirecta mediante la reducción del α -tocoferoxil⁷⁰.

Asimismo, la vitamina C actúa como cofactor de diversas reacciones metabólicas como la síntesis de colágeno, catecolaminas y carnitina, entre otras¹⁰⁹.

Además, existe un gran número de estudios sobre la suplementación de vitamina C en deportistas pero, al igual que en la vitamina E, los resultados son contradictorios⁸⁹.

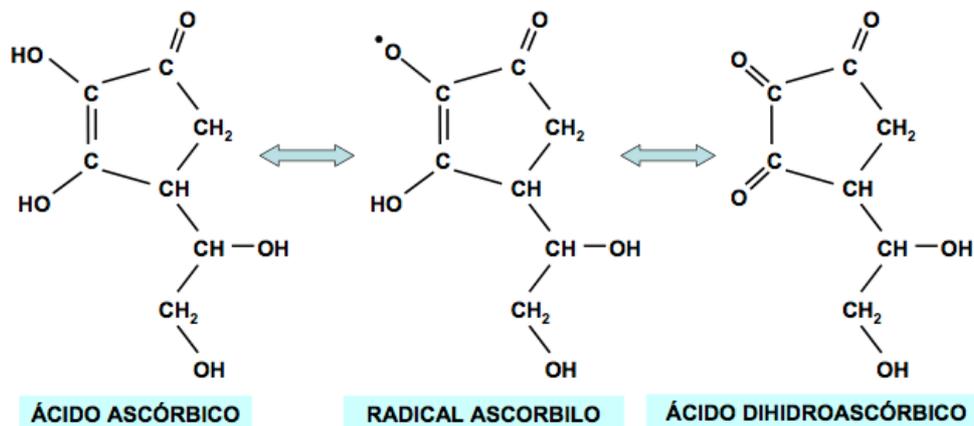


Figura 11. Estructura química del ácido ascórbico, radical ascorbilo y ácido dihidroascórbico.

Por último, se ha observado que la vitamina C presenta un efecto prooxidante en presencia de iones metálicos como el Fe^{+2} y Cu^{+2} , al catalizar la formación de OH^\bullet vía reacción de Fenton²³.

Los carotenoides son una familia de más de 600 compuestos isoprenoides¹¹¹ que presentan una cadena hidrocarbonada de enlaces simples y dobles¹¹². Se dividen en 2 grandes grupos: carotenos (hidrocarburos) y xantofilas (derivados de carotenos que contienen 1 o más átomos de O_2). Estas sustancias liposolubles se encuentran principalmente en vegetales de hoja amarilla y verde oscuro. Los carotenoides más abundantes de la dieta son α y β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina y licopeno⁷⁰. Dentro de estos, el β -caroteno es el más activo y estudiado⁸⁹ y se encuentra en frutas y verduras de color rojo, naranja y amarillo¹¹¹.

Tras su consumo, el β -caroteno es degradado, por la β -caroteno dioxigenasa en la mucosa del intestino delgado, en 2 moléculas de retinil, que posteriormente es reducido a retinol (vitamina A)¹¹¹.

En general, todos los carotenoides presentan actividad antioxidante debido a la presencia de dobles enlaces conjugados en su estructura¹¹². Así, aquellos con 9 o más dobles enlaces son capaces de neutralizar ERO, siendo su poder antioxidante dependiente del número de dobles enlaces conjugados^{23,111}.

Con respecto a su actividad antioxidante, los carotenoides interactúan principalmente con $^1\text{O}_2$, aunque también neutralizan ROO^\bullet , OH^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$ ¹¹².

Como resultado, y debido a su localización en la bicapa lipídica, los carotenoides protegen las membranas y las liproteínas plasmáticas de la peroxidación lipídica¹¹². Además, tienen un efecto positivo sobre el sistema inmune, exhiben efectos antioncogénicos⁸⁹ y modulan la actividad de factores de transcripción⁷⁰.

Por último, aunque los carotenoides obtenidos de la dieta tienen un efecto antioxidante y antiinflamatorio, se ha observado que la suplementación exógena puede tener un efecto prooxidante. Así, la suplementación de β -carotenos incrementa el riesgo de cáncer de pulmón en poblaciones de alto riesgo como fumadores¹¹³. En este sentido, el efecto antioxidante o prooxidante de los carotenoides es dependiente de la PO_2 y de la concentración de carotenoides en el organismo. De este modo, el radical carotenoide puede reaccionar con O_2 a alta PO_2 , dando lugar a la formación del radical ROO^\bullet -carotenoide, que promueve la oxidación de ácidos grasos insaturados (AGI)¹¹².

Los polifenoles son un conjunto de sustancias hidrosolubles que se caracterizan por la presencia de más de un anillo fenólico en su estructura, que consta de estructuras de grupos hidroxil y fenil. Dependiendo del número de anillos fenólicos y de las propiedades de unión de estos, los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Figura 12). A su vez, cada clase de polifenol puede ser subdividido por las interacciones de sus respectivos anillos con carbono, O_2 y moléculas de ácido orgánico, lo que justifica el elevado número de polifenoles que se pueden encontrar en la naturaleza¹¹⁴; así, más de 8000 estructuras fenólicas son conocidas, y casi 4000 flavonoides han sido identificados¹¹⁵. A su vez, los flavonoides, mayor grupo de compuestos fenólicos, se clasifican en: antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonas y flavanoles⁸⁹. Los flavonoides pueden encontrarse en los alimentos en forma libre (aglicona) o conjugada (glucósidos)¹¹⁶.

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química ideal que les confiere capacidad neutralizadora de RL, debido a los grupos hidroxil fenólicos propensos a donar un H_2 o un electrón al RL. De este modo, los polifenoles pueden actuar neutralizando de forma directa las ER, impidiendo la formación de ER mediante inhibición de enzimas (por ejemplo, XO) o quelación de metales de transición, y regulando al alza enzimas antioxidantes endógenas (SOD, GPx y

CAT) a través de la activación de la vía de las quinasas. Asimismo, los polifenoles participan en la reducción de la vitamina E^{115,117}.

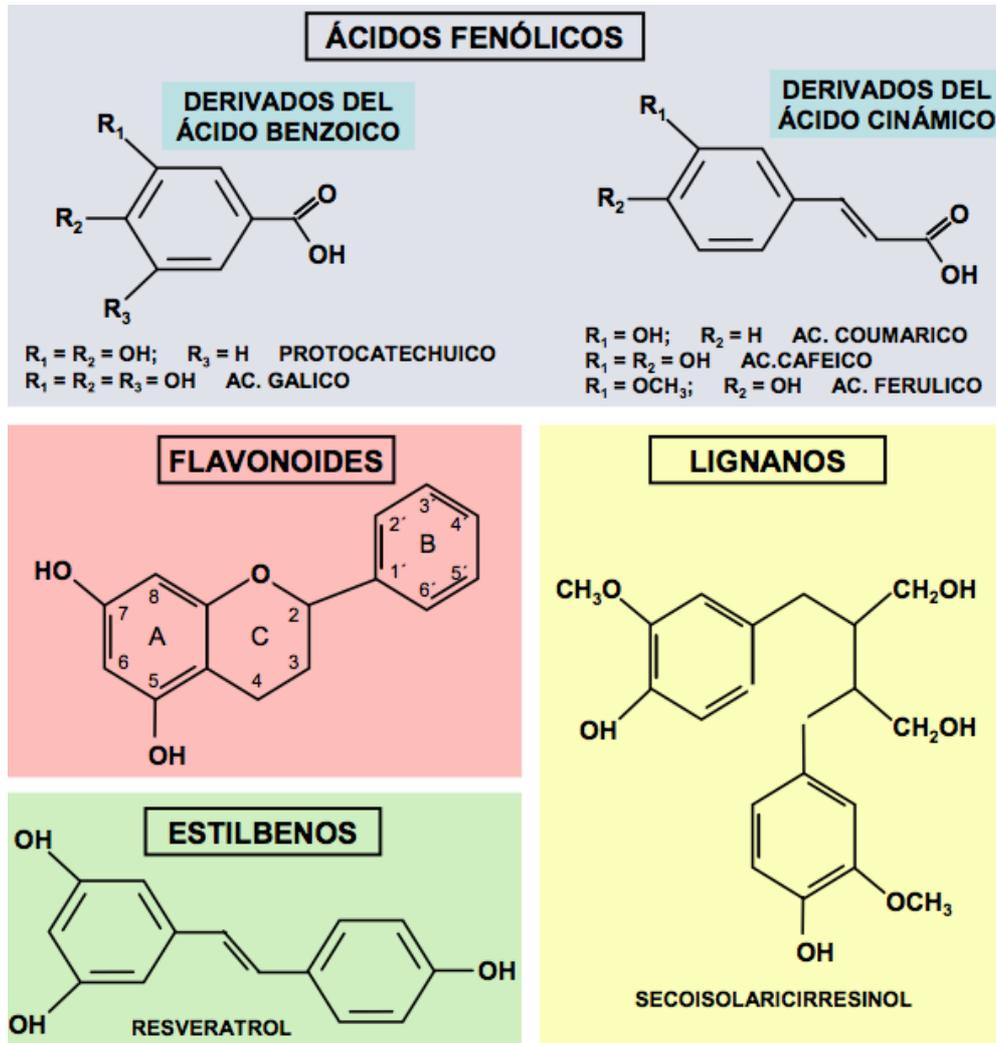


Figura 12. Estructura química de los polifenoles.

Aunque los polifenoles son absorbidos a nivel intestinal, sus concentraciones en plasma son bajas (menos de 1 $\mu\text{mol/L}$), debido, en parte, al rápido metabolismo de los tejidos humanos. Por ello, diversos autores dudan sobre la actividad antioxidante *in vivo* de los polifenoles¹¹⁵. Sin embargo, varios estudios han demostrado el efecto beneficioso del consumo de polifenoles en patologías relacionadas con el estrés oxidativo inducido por las ERO/ERN. Así, el

consumo de polifenoles mejora el metabolismo lipídico, la función neurológica y la plasticidad neuronal, inhibe la oxidación de LDL y la agregación plaquetaria, y reduce la incidencia de cáncer¹¹⁸⁻¹²⁰. Pero, al igual que sucedía con otros antioxidantes exógenos, algunos autores han descrito efectos prooxidantes derivados del consumo de polifenoles. En este sentido, algunos polifenoles pueden iniciar un proceso de autooxidación; el radical fenoxi puede interactuar con O_2 y generar quinonas y $O_2^{\bullet-}$. Además, los metales de transición parecen inducir la actividad prooxidante de los polifenoles¹¹⁷.

Finalmente, existen diversos oligoelementos cuya propiedad antioxidante está ligada a la función antioxidante llevada a cabo por las proteínas de las que forman parte.

En el organismo humano se conocen 25 selenoproteínas, la mayoría enzimas, que presentan en su centro activo Se unido al aminoácido cisteína. Dentro de éstas, 5 GPx (1-4 y 6), las tioredoxinas reductasas y 3 selenoproteínas (P, S y W) tienen actividad antioxidante. Así, la biodisponibilidad de Se, dependiente de su ingesta dietética, es clave en la biosíntesis de dichas proteínas. Por tanto, la deficiencia de Se favorece, de forma indirecta, el estrés oxidativo y, consecuentemente, patologías asociadas al mismo como el cáncer. Asimismo, su biodisponibilidad favorece la activación del factor de transcripción NF- κ B⁷⁶. Sin embargo, este elemento presenta actividad prooxidante al favorecer la formación de $O_2^{\bullet-}$ ²³.

Al igual que sucede con el Se, la deficiencia de Zn conlleva tanto un incremento del estrés oxidativo como patologías asociadas al mismo. La biodisponibilidad de este elemento es dependiente de la ingesta y, aproximadamente, 3000 enzimas requieren Zn como cofactor. Muchas de estas enzimas están envueltas en la defensa contra el estrés oxidativo, entre las cuales se encuentran Cu/ZnSOD, metalotioneinas (proteínas quelantes), enzimas de reparación de ADN, enzimas de señalización intracelular, diversos factores de transcripción y metaloproteinasas de matriz (endopeptidasas que regulan el remodelado tisular). Además, el Zn actúa como segundo mensajero intracelular y es esencial en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular¹²¹.

En condiciones fisiológicas, el Cu existe como Cu^{+1} y Cu^{+2} , y ambos pueden favorecer la formación de OH^{\bullet} vía reacción de Fenton, mediante la reacción del Cu^{+1} con H_2O_2 o vía reducción de Cu^{+2} por $O_2^{\bullet-}$ ¹²². Por ello, aquellas proteínas que

contengan Cu en su estructura, y que por tanto quelen este metal, presentan actividad antioxidante. Dentro de éstas se encuentran: ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, ecSOD y Cu/ZnSOD. La ingesta dietética de Cu puede alterar la función de diversas cuproenzimas. Al contrario que el Zn, clave en la estructura de la Cu/ZnSOD, el Cu es esencial en la actividad de esta enzima. De este modo, una baja biodisponibilidad de Cu alterará la función de ésta, lo que derivará en un incremento del estrés oxidativo y de patologías asociadas¹²³.

1.3.4 Suplementación de antioxidantes en deportistas

Existe una clara evidencia de que el ejercicio conlleva un incremento de la formación de ER, y que la exposición crónica y aguda a altas concentraciones de ER puede afectar, respectivamente, a la salud y al rendimiento deportivo. Con respecto a este último, se sabe que hay una relación directa entre las ER y la alteración de la función contráctil, lo que resulta en una reducción de fuerza muscular y el desarrollo de fatiga, con el consiguiente empeoramiento del rendimiento.

Por ello, la estrategia de potenciar la capacidad endógena mediante el uso de suplementos antioxidantes ha recibido especial atención en los últimos años. El objetivo es reducir el estrés oxidativo y el daño muscular inducido por estos, y mejorar el rendimiento deportivo¹²⁴.

Como resultado, el consumo de estos suplementos entre deportistas no profesionales y de élite se ha visto incrementado. Sin embargo, no existe una evidencia clara de que la suplementación de antioxidantes exógenos en deportistas tenga un efecto beneficioso. Así, algunos autores han informado de efectos perjudiciales derivados de la suplementación con antioxidantes^{23,52,108,112,117}, mientras que otros autores afirman que la suplementación conlleva efectos beneficiosos^{51,53} o que no genera efecto alguno¹¹⁰.

Existe una creciente evidencia de que el uso de suplementos antioxidantes puede tener un efecto perjudicial en individuos entrenados. En primer lugar, los antioxidantes pueden tener un efecto prooxidante, especialmente cuando se consumen en grandes dosis, lo que ha sido demostrado en la suplementación individual de vitamina E¹⁰⁸, carotenoides¹¹², polifenoles¹¹⁷, Se y vitamina C²³, y con la suplementación de mezclas de antioxidantes^{11,52,125}. Y, en segundo lugar, la

producción de ERO inducida por el ejercicio es una señal clave que favorece la alteración de la expresión génica en el músculo, lo que contribuye a las adaptaciones inducidas por el ejercicio⁴⁴. Por ejemplo, la exposición a concentraciones moderadas de ER conlleva una reducción del daño oxidativo al ADN¹²⁶. Así, se ha observado que la suplementación de vitamina C y/o E, dos de los suplementos antioxidantes más empleados, interfiere en las respuestas adaptativas al entrenamiento de resistencia al disminuir la BM, la expresión de enzimas antioxidantes endógenas, la sensibilidad a la insulina y la expresión de HSP^{11,44,45,59,110}. Además, se han obtenido datos similares al emplear alopurinol, inhibidor de la XO⁴⁹ y suplementos de Q10 en forma de ubiquinona¹²⁴.

Sin embargo, existen situaciones en la que el uso de suplementos antioxidantes puede ser útil. En épocas de entrenamiento de sobrecarga, en las que las defensas antioxidantes endógenas se ven superadas por la formación de ER, debido a la no adaptación a dicha intensidad, y en las que la dieta no parece ser suficiente, el consumo de antioxidantes exógenos podría ser interesante⁵¹. Además, su uso es útil en deportistas con deficiencia nutricional de vitaminas y minerales antioxidantes¹¹⁰ o individuos desentrenados, en los que se ha demostrado que el consumo de antioxidantes, de forma individual o con varios elementos, puede reducir el estrés oxidativo per-ejercicio^{53,127}.

Por último, existe poca evidencia de que los antioxidantes más comúnmente empleados (vitamina C, E y β -carotenos) pueden incrementar el rendimiento deportivo¹¹⁰.

Por tanto, debido a los potenciales efectos perjudiciales derivados de la ingesta de suplementos antioxidantes, se deben hacer recomendaciones de consumo meditadas. Así, puesto que algunos deportistas no siguen una dieta equilibrada, lo que favorece la aparición de deficiencias en la ingesta antioxidante¹¹⁰, la mejor recomendación sería seguir una dieta variada y equilibrada, pues a través de ella se logra una ingesta adecuada de vitaminas y minerales antioxidantes⁸⁹.

1.4 ÁCIDO GRASO DOCOSAHEXAENOICO

1.4.1 Estructura del ácido graso docosahexaenoico

Los AG son compuestos orgánicos formados por una cadena hidrocarbonada que presenta un grupo carboxilo en un extremo de la cadena y un grupo metilo en el otro. Estos compuestos pueden ser clasificados dependiendo del número de dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada (grado de insaturación) y número de átomos de carbono. Aquellos AG que no presentan dobles enlaces se denominan AG saturados (AGS), mientras que los que sí cuentan con dobles enlaces en su estructura son llamados AGI. Estos últimos, a su vez, se subdividen en monoinsaturados (AGMI) y AGPI, con uno y 2 o más dobles enlaces, respectivamente. Por último, los AG pueden ser clasificados según el número de átomos de carbono en AG de cadena corta (hasta 6 átomos de carbono), media (8-12), larga (14-18) y muy larga (superior o igual a 20 átomos de carbono)¹²⁸.

Además, los AGI se dividen en 4 series o familias dependiendo del AG a partir del cual son sintetizados, y su nomenclatura hace referencia a la posición del primer doble enlace desde el extremo del grupo metilo¹²⁹:

- Serie n-3 derivada del ácido α -linolénico (ALA; 18:3 n -3) (Figura 13).
- Serie n-6 derivada del ácido linoleico (AL; 18:2 n -6) (Figura 13).
- Serie n-7 derivada del ácido palmitoleico (16:1 n -7).
- Serie n-9 derivada del ácido oleico (18:1 n -9).

Los 2 principales AGPI n-3 son los AG eicosapentaenoico (EPA) (20:5 n -3) y docosahexaenoico (DHA) (22:6 n -3). El DHA, también conocido como ácido cervónico o *c*-4,*c*-7,*c*-10,*c*-13,*c*-16,*c*-19-docosahexaenoico, es el AG más insaturado y de cadena más larga comúnmente encontrado en los sistemas biológicos^{130,131}.

El DHA se encuentra principalmente en los fosfolípidos de las membranas celulares de córtex cerebral, retina, testículos y esperma¹³².

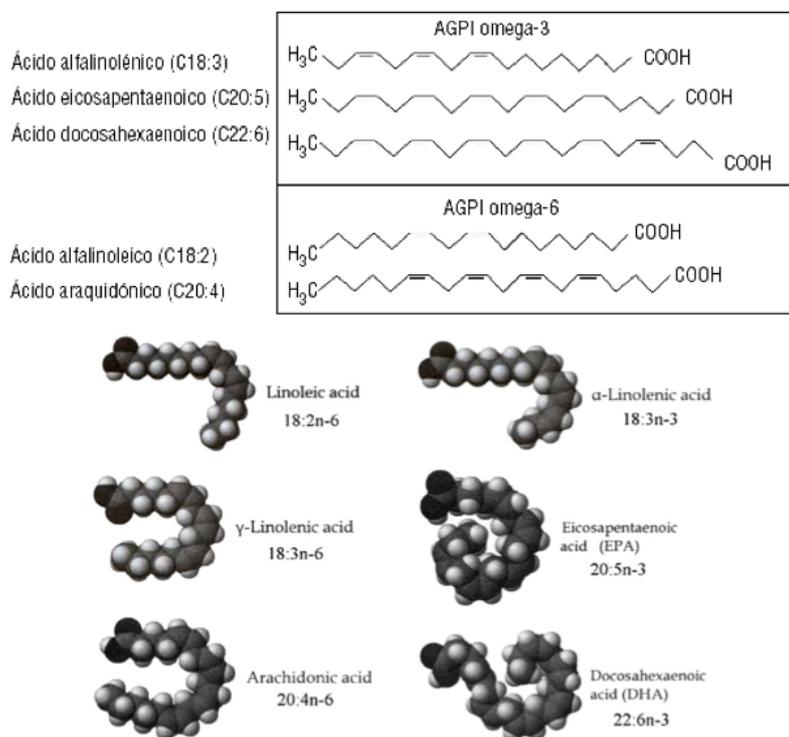


Figura 13. Estructura química de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6.

1.4.2 Fuentes e ingesta

Los AGPI AL y ALA no pueden ser sintetizados en el cuerpo humano¹³³ y son, por tanto, componentes indispensables en la dieta del ser humano^{128,134}.

El AL se encuentra principalmente en aceites vegetales tales como aceite de girasol (63,2%), lino (55,0%), soja (51,5%) y maíz (50,4%)^{135,136}, y su metabolito principal, el ARA, se encuentra en estado preformado en yema de huevo, leche y, de forma destacada, en productos cárnicos, carne roja y pollo¹³⁷. Con respecto a los productos cárnicos, el contenido de AL y ARA en estos depende del tipo de alimentación empleada en el animal; así, la carne de ganado de cría intensiva alimentado con grano presenta un índice n-6/n-3 superior (7,65) al observado cuando se emplea hierba/pasto (1,53), lo que justifica que algunos productos cárnicos pueden ser una fuente significativa de n-3 para algunas poblaciones,

pero desgraciadamente su contenido en AGS es elevado¹³⁸. Con respecto al pescado de piscifactoría, se sabe que 100 g de salmón atlántico contiene 1150 mg de ARA, mientras que 100 g de tilapia y pez gato contienen, respectivamente, 134 y 67 mg, encontrándose cantidad superiores a 300 mg en algunas tilapias de América Central. Además, la tilapia es el pescado que mayor índice ARA:EPA presenta (11:1)¹³⁹.

Aunque se pueden emplear productos de pescado y aceites ricos en AGPI n-3 en la alimentación animal, existe una creciente preocupación en cuanto a la sostenibilidad y coste de los primeros, por lo que se han estudiado otras posibilidades como el aceite de lino. Así, se han observado incrementos de AGPI n-3 en productos cárnicos de animales monogástricos (cerdos, aves y conejos) y rumiantes sin necesidad de elevado tiempo de uso de suplementación (entre 20 y 100 días), clave en la realidad práctica de la industria¹⁴⁰.

El ALA se encuentra en alimentos derivados de plantas: semillas, aceites vegetales y nueces (Tabla 4). Además, las hojas verdes de vegetales contienen una proporción, por lo general, superior al 50% de sus AG como ALA, aunque éstas no son una importante fuente lipídica. Las semillas de lino, y su aceite, contienen un 45-55% de AG como ALA, mientras que los aceite de soja y colza, y las nueces, contienen en torno al 10% de sus AG como ALA. Otros aceites como aceite de maíz y girasol, ricos en AL, contienen baja cantidad de ALA¹⁴¹.

Tabla 4. Contenido de ácido α -linolénico de aceites, semillas y nueces¹⁴².

Fuentes	g ALA/100 g
Semilla de calabaza	0,375
Aceite de oliva	0,757
Nueces negras	1,147
Aceite de soja	9,051
Aceite de colza	9,573
Aceite de nuez	10,397
Semilla de lino	17,279
Nueces de Inglaterra	18,926
Aceite de lino	62,201

Ciertos productos cárnicos son fuente de ALA: carne de ganado (22-32 mg/100 g) y de pollo (25 mg/100 g)¹³⁵. Asimismo, los huevos contienen una pequeña cantidad pero potencialmente significativa de DHA preformado (18 mg por huevo grande) y existen tejidos de mamíferos terrestres como el cerebro y ojo que concentran DHA, pero estos tejidos no son consumidos habitualmente¹⁴³. Como se comentó anteriormente, el ganado y las aves de cría extensiva, y sus productos derivados como carne y huevos, presentan mayores proporciones de DHA que aquellos criados de forma intensiva¹⁴⁴.

Sin embargo, las fuentes principales de los AGPI n-3 (ALA, EPA y DHA) son los organismos marinos: pescado, mariscos y algas. Todos ellos se alimentan, directa o indirectamente, de fitoplancton marino, producto principal de AGPI n-3 en la cadena trófica¹³⁶. Asimismo, los aceites de pescado son una fuente importante de estos AG¹⁴⁴. Por el contrario, los peces no extractivos, alimentados fuera de las fuentes marinas ricas en DHA, presentan una menor proporción de este AG¹⁴⁵.

El pescado es la fuente principal de AGPI n-3 en la dieta humana en la actualidad. Existen diferentes cantidades de AGPI n-3 y diferentes índices EPA:DHA según tipo de pescado, metabolismo, dieta, temperatura del agua y temporada¹⁴¹. Así, los peces de agua dulce contienen proporciones más bajas de AGPI n-3 que los peces marinos (de agua salada); el contenido en AGPI n-3 en peces marinos es 5-10 veces superior¹⁴⁶. Dentro de los peces de agua dulce destacan por su contenido en n-3 la trucha, especialmente la trucha gris, y la lubina¹⁴⁷. Además, los peces grasos de las familias *Scombridae* (caballa, atún, bonito), *Clupeidae* (sardina, arenque, alosa) y *Salmonidae* (salmón plateado, del Atlántico, jorobado, del Pacífico) son las especies con mayor cantidad de EPA y DHA preformados¹³⁶ (Tabla 5).

Los aceites de pescado son obtenidos a partir de carne de pescado graso o hígado de pescado blanco, y por lo general presentan un 30% de su composición lipídica como EPA y DHA¹³³ y, al igual que los pescados, presentan diferentes índices EPA:DHA¹⁴⁸; así, el aceite de hígado de bacalao es más rico en EPA que en DHA, mientras que el aceite de atún es más rico en DHA que EPA¹⁴¹.

Estudios sobre la distribución de posición de los AG en TAG de varios aceites de pescado han mostrado que la mayoría de los AGPI están unidos a la posición sn-2, lo que les confiere una mayor estabilidad contra la oxidación¹³⁶.

Tabla 5. Contenido de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico (g/100 g) en diferentes tipos de pescado¹³⁶.

Nombre Común	C20:5n-3 (EPA)	C22:6n-3 (DHA)
Caballa	1,10	2,56
Salmonete	0,91	1,66
Sardina	0,62	1,12
Salmón	0,50	1,00
Atún	0,24	0,98
Boquerón fresco	0,14	0,80
Besugo	0,12	0,61
Bacalao	0,23	0,47
Merluza	0,10	0,54
Congrio	0,15	0,43
Pez espada	0,15	0,30
Galludo	0,04	0,03

El aceite de krill también es rico en EPA y DHA, y presenta un 45% de su componente lipídico como DHA preformado¹³³. Estructuralmente, el aceite de krill difiere con el aceite de pescado ya que los AGPI presentes en estos se pueden encontrar como TAG y, principalmente, fosfolípidos¹⁴⁸.

Además, algunos peces como pez espada, atún, y perca, entre otros, presentan altos contenidos de metales pesados como mercurio (Hg), y sustancias contaminantes orgánicas tales como dioxinas y bifenoles policlorados (PCB), que tienen un efecto tóxico para la salud¹⁴⁸. Por esta razón, y por la sobreexplotación pesquera, se han propuesto varias alternativas como fuentes de n-3, tales como fitoplancton (microalgas) y plantas transgénicas¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Por último, moluscos y crustáceos presentan una cantidad inferior de DHA en comparación con pescados y sus aceites derivados y aceites de microalgas, pero son una fuente interesante de AGPI n-3. Así, moluscos y crustáceos presentan, respectivamente, un contenido de DHA de 0,71-2,95 g y 0,53-2,07 g por cada 100 g de producto¹⁴³.

Con respecto a los AGPI, se recomienda una ingesta que constituya el 6-11% de la energía total diaria¹⁵². Según la Asociación Dietética Americana y Dietistas de Canadá, las ingestas de AGPI n-6 y n-3 deben aportar un 5-10% y 0.5-2% de la energía total diaria, respectivamente, siendo el rango aceptable para ALA el 0,6-1,2% de la energía total diaria. La Ingesta Adecuada (IA) para AGPI n-6 se cifra en 17 g/d para hombres y 12 g/d en mujeres, mientras que en el caso del ALA se cifra en 1,6 y 1,1 g/d para hombres y mujeres, respectivamente, de edad comprendida entre 19 y 70 años; sin embargo, la IA es un dato observacional y no una recomendación en sí¹²⁸. En veganos se recomienda una ingesta de ALA de 2-4 g/d¹⁵³. Por último, no existe recomendación específica para ARA, siempre y cuando se cumpla el porcentaje recomendado para AL¹⁵⁴.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los hombres adultos y las mujeres adultas no embarazadas o en período de lactancia deben consumir de forma global 0,25 g/d de EPA y DHA, mientras que, en mujeres embarazadas o en período de lactancia, se debe consumir 0,3 g/d para asegurar un estado de salud materno adecuado y un desarrollo óptimo del feto o del lactante¹⁵⁴. Sin embargo, para lograr una salud cardiovascular adecuada, se recomiendan dosis más elevadas. Así, la Asociación Dietética Americana de Canadá y la Asociación de Corazón Americana recomiendan ingestas conjuntas de EPA y DHA cifradas en 0,5-1,0 g/d¹³⁵.

Además, existen recomendaciones específicas según edad. En los 6 primeros meses de vida, el ARA debe corresponder al 0,2-0,3% del total de AG, mientras que el DHA debe corresponder al 1,5%; en esta etapa de la vida el DHA debe ser considerado condicionalmente esencial debido a la alta variabilidad de formación de este AGPI (1-5%). Pasada esta etapa, y hasta el año de edad, el DHA debe ser aportado en cantidades de 10-23 mg/kg de peso; además, AL y ALA aportarán, respectivamente, el 3-4,5% y el 0,4-0,6% de la energía total diaria. Entre los 12 y 24 meses de vida se recomiendan las mismas cantidades recomendadas entre los 6 meses y el año de vida. Pasados los 2 años, se recomienda que los AGPI aporten el 11% de la energía total diaria. Asimismo, la recomendación de consumo global de EPA y DHA es de 100-150 mg/d para niños/as de 2-4 años, 150-200 mg/d para niños/as de 4-6 años, y 200-300 mg/d para niños/as de 6 a 10 años. Sin embargo, a partir de esta edad, los estudios no permiten definir un consumo diario recomendado global de EPA y DHA y, por ello, se recomiendan hábitos que

prevengan enfermedades crónicas como consumir pescado rico en grasa al menos 2 veces a la semana (en torno a 224 g de pescado en total), al igual que en adultos¹⁵⁴. Asimismo, se ha afirmado que la evidencia disponible es insuficiente para formular valores de ingesta cuantitativa para EPA y DHA en niños/as; sin embargo, parece razonable realizar las mismas recomendaciones en niños/as que en adultos, es decir, consumo regular de 2 raciones de pescado graso por semana¹⁵⁵.

La ingesta global mundial de AGPI n-6 corresponde al 5,9% de la energía total diaria, siendo el consumo superior a las recomendaciones sólo en el 52,4% de la población mundial adulta¹⁵⁶.

La ingesta media de AL en la dieta occidental común es de 15 g/d, mientras que la ingesta media de ALA es de 1,5 g/d¹⁵⁷, pudiendo variar entre 0,5 y 2 g/d¹³³; por géneros, el hombre muestra un consumo de AL y ALA superior que las mujeres: 17,84 y 1,77 g/d para hombres, y 13,33 y 1,38 g/d para mujeres¹²⁸. Además, la ingesta media de ARA es de 50-250 mg/d¹⁵⁸.

Existe una gran variabilidad con respecto al consumo de AGPI n-3 de fuentes vegetales, siendo la ingesta media global de 1371 mg/d (Figura 14). Así, el 17,8% de la población adulta mundial presenta un consumo inferior a 500 mg/d, y sólo en 52 de las 187 naciones analizadas la ingesta es superior o igual a 1100 mg/d para una ingesta dietética diaria de 2000 kcal¹⁵⁶.

Con respecto a la ingesta media global de n-3 de origen marino, ésta se cifra en 163 mg/d y presenta una gran variación (Figura 15). Así, el 66,8% de la población adulta mundial presenta un consumo inferior o igual a 100 mg/d, y sólo en 45 de las 187 naciones analizadas la ingesta es superior o igual a 250 mg/d¹⁵⁶.

En España, el 79,2% de la población presenta un consumo inferior al 6% de la recomendación para AGPI; se ha observado que los AGPI aportan el $5,19 \pm 1,4\%$ de la energía total diaria. Con respecto a los AGPI n-3, estos aportan el $1,85 \pm 0,82\%$ de la energía total diaria, con un aporte inferior al 1% en el 85,3% de los individuos. En lo que respecta al EPA y DHA, se ha observado que el consumo conjunto es de $0,55 \pm 0,58$ g/d y que el consumo recomendado de 0,5 g/d no es superado por el 64,6% de la población¹⁵⁹.

El ser humano ha evolucionado consumiendo, aproximadamente, cantidades iguales de ARA y DHA. Sin embargo, la dieta occidental ha sido modificada considerablemente en los últimos 100 años, lo que a nivel evolutivo es un tiempo extraordinariamente corto. En esta etapa, y favorecido por las revoluciones industrial y agrícola, se ha producido un incremento del consumo de grasas dietéticas; se ha incrementado el consumo de AGS y grasas *trans*, con un desplazamiento del índice AL:ALA en favor del primero, debido al incremento del consumo de aceites de semilla, ricos en AL, al consumo de ganado y aves alimentadas a partir de estas semillas y aceites, y de grasas vegetales hidrogenadas, con una reducción concomitante en la ingesta de alimentos con alto contenido en ALA y alimentos con alto contenido en EPA y DHA preformados como el pescado. En el último siglo se ha producido un incremento de la incidencia de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta (enfermedad cardiovascular y, más recientemente, patologías neurodegenerativas) lo que algunos autores han atribuido a una proporción inadecuada de DHA en los fosfolípidos de membrana^{129,137,160}.

La dieta del cazador-recolector se caracterizaba por un relación n-6/n-3 de 1:1¹⁶⁰, sin embargo, en la dieta occidental actual se observan índices de entre 10:1 y 30:1^{129,138,148,157,161}. En España, este índice es de $7,10 \pm 6,63$ a 1¹⁵⁹. En este sentido, se ha observado que individuos jóvenes que llevan a cabo una dieta típica mediterráneo o individuos de Japón, ambas con alto contenido en pescado, muestran un índice 2:1 a nivel sanguíneo, mientras que individuos jóvenes consumidores de "fast food", hábito característico de la dieta occidental, presentan un índice de 25:1¹³⁶.

Una dieta con una relación n-6/n-3 a favor de los AGPI n-6 favorece la formación de eicosanoides proinflamatorios y proagregantes, en contra de los eicosanoides con carácter menos inflamatorio y antiagregante formados a partir de los n-3^{138,157,161}. Junto con otros muchos factores, los altos niveles de AL observados en la dieta occidental son responsables del relativamente reciente incremento en enfermedades crónicas, principalmente aquellas asociadas con inflamación incluyendo cáncer, enfermedad coronaria, artritis y diabetes¹⁶⁰.

Por ello, controlar el consumo de AL y ALA, y sus respectivos metabolitos, favoreciendo la formación de eicosanoides con carácter beneficioso, es de gran interés nutricional^{138,157}. Así, para una salud óptima, se recomienda un índice

n-6/n-3 de 4:1^{138,148}, aunque, según la FAO no existe argumento para una recomendación específica del índice n-6/n-3 si la ingesta de AL y ALA se encuentra en los porcentajes recomendados¹⁵⁴.

En comparación con omnívoros, los hombres vegetarianos y veganos muestran, respectivamente, niveles inferiores de EPA del 28 y 53%, y de DHA del 31 y 59%, sin relación entre el tiempo de seguimiento del tipo de dieta vegetariana o vegana y los porcentajes de EPA y DHA a nivel plasmático. Por ello, se concluye que cuando se excluyen productos animales de la dieta, la síntesis endógena de EPA y DHA resulta en cantidades bajas pero estables a nivel plasmático¹⁶².

El consumo de 2 raciones de pescado a la semana, siendo una de éstas pescado graso, supone un aporte de 0,2 g/d de EPA y DHA¹³³, y el consumo de 2 raciones de pescado graso por semana permite la ingesta de 0,5 g/d¹⁴⁴. Sin embargo, existe una dificultad a la hora de cubrir las recomendaciones de EPA y DHA; desafortunadamente, muchos individuos son resistentes a consumir pescado por razones tales como molestia gastrointestinal, sabor y olor a pescado¹⁶³, seguimiento de dieta vegana y alergias. Por estas razones, han surgido diversas estrategias para lograr cubrir las recomendaciones que incluyen: alimentos (especialmente pescado graso), alimentos fortificados y/o enriquecidos, y empleo de suplementos¹⁵³.

Como alternativa a la ingesta de pescado o al uso de aceites de pescado, se ha examinado la efectividad de la ingesta de n-3 de fuentes vegetales, sin embargo, se ha observado que la conversión de ALA a EPA y DHA en humanos es limitada. Ahora bien, aunque el uso de ALA y metabolitos n-3 no debe desaconsejarse, el consumo de EPA y DHA preformado es mucho más efectivo. Asimismo, la incorporación de n-3 en alimentos comunes se muestra prometedor dado el incremento del DHA plasmático, la modesta reducción de TAG y la falta de efectos adversos observados con la ingesta de alimentos fortificados con AGPI n-3 microencapsulado¹⁶³.

Por esta razón, se ha llevado a cabo un incremento del enriquecimiento o fortificación de algunos alimentos con bajo o nulo contenido en EPA y DHA con aceites de pescado (Tabla 6): productos para untar, lácteos y derivados, pan y productos de panadería, zumos y bebidas no alcohólicas, y huevos, entre otros. Además, como se comentó anteriormente, en la alimentación de animales de

granja se han adicionado AGPI n-3, lo que resulta en un incremento del contenido de estos AG en productos como la carne, leche (de vaca, oveja y cabra) y huevo¹⁶⁴.

Tabla 6. Productos enriquecidos/fortificados con ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico¹⁴⁵.

Producto	Ración	EPA+DHA (mg)	DHA (mg)
Panes y pasta	100 g	8-80	36
Leche	250 ml	10-190	60
Huevos	1 (50g)	86-150	150
Derivados cárnicos	100 g	88-190	135
Aderezo de ensalada	14-31 g	60-700	60-700
Margarina y untables	10-100 g	60-150	60-150
Pizza	1 porción	32	32
Barritas nutritivas	50 g	3-115	115
Zumos	170 ml	100	100

Con respecto al uso de suplementos de AGPI n-3, los suplementos de ALA incrementan el contenido de EPA y DPA en células plasmáticas circulantes, pero no incrementa significativamente el DHA plasmático. El uso de suplementos de ésteres de EPA purificado incrementa tanto EPA como DPA, pero no modifica el DHA plasmático. Además, la suplementación con ácido estearidónico (18:4n-3) incrementa significativamente el contenido de EPA en comparación con ALA, pero tampoco conlleva un incremento considerable del contenido de DHA. Por último, y de forma contraria a los anteriores, el uso de suplementos de DHA preformado conlleva una rápida incorporación de este AG al torrente sanguíneo, con un incremento dosis-dependiente del contenido de DHA en fosfolípidos plasmáticos cuando se suministran varias dosis durante 14 días¹⁶⁵.

Por tanto, es evidente que tanto el enriquecimiento de alimentos de consumo habitual como el uso de concentrados es una herramienta útil desde un punto de vista nutricional. Ambas situaciones suponen una contribución significativa a la ingesta de EPA y DHA preformado, especialmente en aquellos individuos que no consumen o consumen poco pescado, debido a la dificultad que entraña modificar los hábitos alimenticios de una sociedad completa.

1.4.3 Conversión

El organismo humano puede sintetizar la mayoría de los AG *de novo* a partir del acetil coenzima A por acción conjunta de la acetil coenzima A carboxilasa y la sintetasa de AG. Además, dispone de sistemas de elongación (enzimas elongasa) de la cadena de AG que permiten aumentar los átomos de carbono hasta 18 en AGS y hasta 24 en AGI, y sistemas de desaturación (enzimas desaturasa) que posibilitan la introducción de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada. Sin embargo, como consecuencia de la carencia de las enzimas necesarias para sintetizar AL y ALA (desaturasas delta 12 y 15), los dobles enlaces no pueden ser introducidos en posición posterior al C₉ contando desde el grupo metilo^{166,167}. Por tanto, AL y ALA son considerados AG esenciales (AGE) y deben ser aportados a través de la dieta^{128,134}. Por el contrario, los vegetales presentan estas desaturasas y pueden sintetizar estos AGPI a partir del ácido oleico mediante la inserción de dobles enlaces entre el C₁₈ y el extremo metil de la cadena hidrocarbonada¹⁴⁴. Asimismo, algas marinas y peces de agua fría sintetizan AGPI n-3 (EPA y DHA) a partir de ALA gracias a la acción de la desaturasa delta 4^{168,169}; además, estos últimos acumulan AGPI n-3 gracias al consumo de fitoplancton, rico en DHA¹⁴³.

En el organismo humano, ALA y AL son convertidos en sus metabolitos de cadena larga o muy larga (Figura 16) principalmente a nivel hepático, aunque también a nivel cerebral (conversión de ALA a DHA) y coronario (conversión de ALA a EPA)¹⁷⁰. Por tanto, los metabolitos n-3 y n-6 no son formalmente AGE¹³⁴. Dicha conversión engloba la acción de las desaturasas delta 6 (DD6) y 5 (DD5), y de las elongasas 2 (E2) y 5 (E5)¹⁷¹. La vía de conversión del AL en sus metabolitos tiene como resultado principal ARA mientras que, en el caso de la serie n-3, la conversión de ALA dará como resultado, principalmente, EPA y DHA^{165,172}.

La conversión de AL a ARA es una vía relativamente corta en comparación con la conversión de ALA a DHA, ya que consiste en 2 desaturaciones y una elongación de cadena: DD6, E5 y DD5. Sin embargo, ALA es convertido a DHA de forma más lenta a causa de la necesidad de varios pasos adicionales¹⁷³. La conversión de ALA en EPA se lleva a cabo de igual forma que la conversión de AL en ARA, mediante la acción de DD6, E5 y DD5, respectivamente. Sin embargo, tras la síntesis de EPA se produce adición de 2 carbonos para formar

AG docosapentaenoico (DPA) (E2), adición de 2 carbonos posteriormente para producir 24:5 n -3 (ácido tetracosapentaenoico) (E2), desaturación para formar la molécula intermedia 24:6 n -3 (ácido tetracosaheptaenoico) (DD6), y traslocación del 24:6 n -3 desde el retículo endoplasmático a los peroxisomas donde 2 carbonos son eliminados por β -oxidación para formar DHA (vía Sprecher). Por último, EPA y DPA pueden también ser sintetizados a partir de DHA mediante retroconversión debida a la limitada β -oxidación de los peroxisomas^{141,168,171}; salvo la β -oxidación, llevada a cabo en los peroxisomas, todos los pasos de conversión de AL y ALA en sus respectivos metabolitos se producen en retículo endoplasmático¹⁶⁷.

Las enzimas elongasa y desaturasa son compartidas por los AGPI n-3 y n-6; por tanto, la conversión de los precursores “padre” en sus metabolitos está influenciada significativamente por la ingesta dietética de grasas^{129,165}. Así, una dieta con una ingesta excesiva de AL conlleva una reducción de la conversión de ALA a EPA y de la conversión del 24:5 n -3 a 24:6 n -3, lo que inhibe la formación de DHA, y reduce la incorporación de EPA y DHA a las membranas tisulares por competición para la esterificación en la posición sn-2 de los fosfolípidos¹⁶¹. Por el contrario, cuando la ingesta de ALA se incrementa, y como consecuencia de la mayor afinidad del DD6 por éste, la conversión de AL en *gamma*-linolénico se reduce; así, para inhibir en un 50% la formación de este AG se requiere solamente una décima parte de ALA en comparación con AL¹⁷⁵. Por tanto, los niveles tisulares de AGPI n-3 y n-6 pueden ser regulados simplemente modificando el contenido de AL y ALA en la dieta¹⁷⁶. Aunque existe controversia, parece ser que la conversión de ALA en sus metabolitos es más dependiente de la ingesta total de AL y ALA que del índice AL:ALA¹⁵⁷. En este sentido, se ha observado que cuando se reduce la ingesta de AL, en una situación de ingesta de AGPI de relación 7:1 en favor de AL, se produce un incremento de la proporción de ALA que es convertido a EPA y de la cantidad absoluta de DHA sintetizado¹⁷⁷. Ahora bien, se sabe que una dieta muy rica en ALA, aunque incrementa la síntesis de EPA, puede reducir la síntesis de DHA debido a la inhibición de la desaturación (DD6) del 24:5 n -3¹⁷².

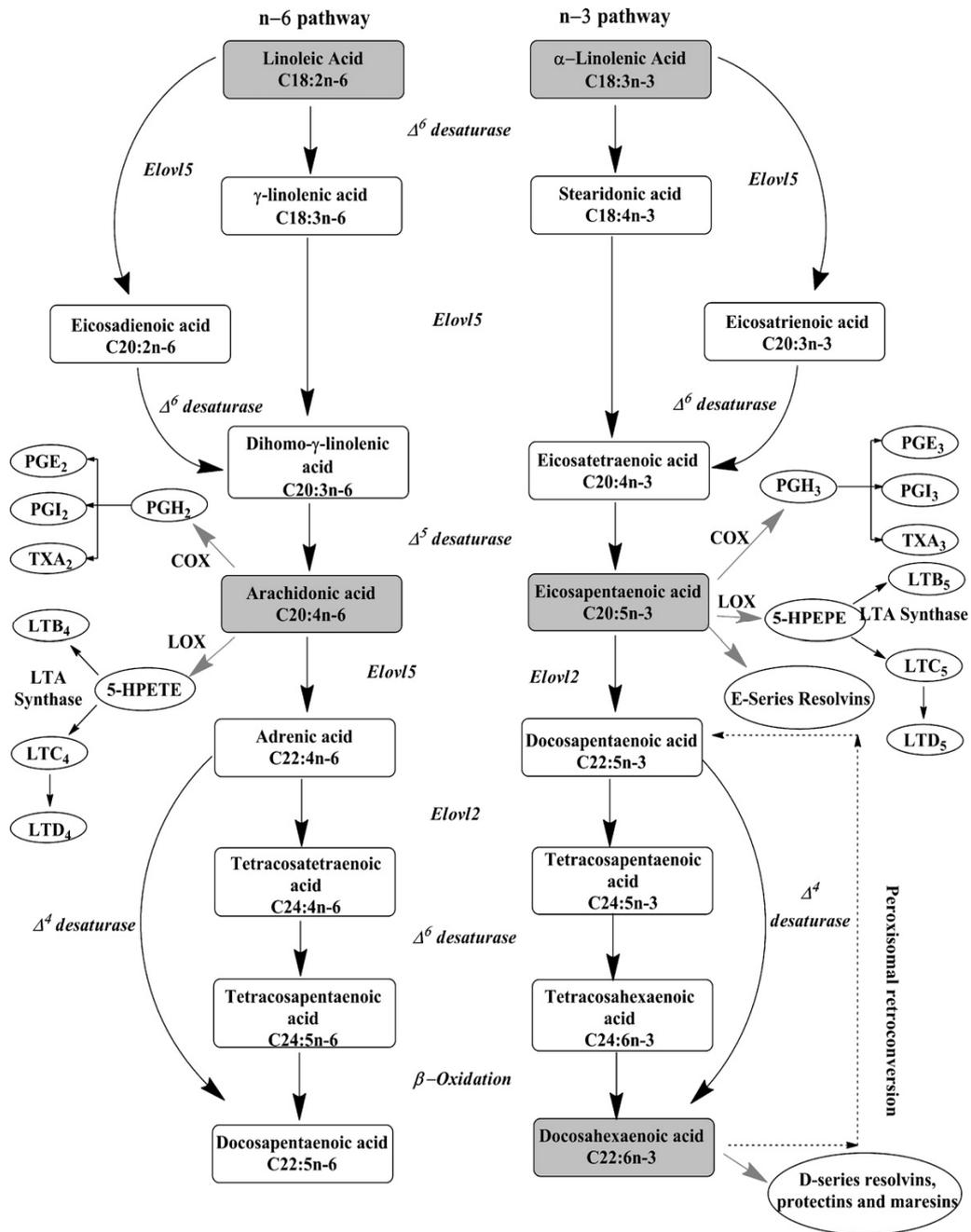


Figura 16. Vías metabólicas de los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3¹⁷⁴.

Además, los pasos finales en la vía de conversión de ALA a DHA son parcialmente controlados por la concentración de DHA preformado en la dieta, de modo que si la ingesta de DHA es elevada los índices de conversión se reducen, pero cuando la ingesta es baja la conversión se ve incrementada para compensar el déficit¹⁶⁷. Esta reducción de conversión se debe a la inhibición de la elongación de EPA a DPA y no a la inhibición de la desaturación del ALA a 18:4n-3¹⁷⁸. En este sentido, se sabe que el consumo de DHA y EPA puede reducir la conversión de DPA a DHA en un 70%¹⁶⁸; también se ha sugerido que los vegetarianos o no vegetarianos que no consumen pescado presentan una conversión incrementada en comparación a los no vegetarianos que sí consumen pescado de forma habitual al haberse observado que los primeros presentan un mayor índice precursor-producto (ALA:EPA+DHA)¹⁷⁹.

Por último, la actividad de las enzimas desaturasas y elongasas puede ser inhibida por factores como AGS, colesterol (CT), AG *trans*, alcohol, adrenalina y glucocorticoides. Asimismo, elementos como Zn⁺² y magnesio (Mg⁺²) son necesarios para el normal funcionamiento de las desaturasas¹⁷³.

Existe una clara evidencia de que la síntesis de EPA y, especialmente DHA, a partir de ALA está extremadamente limitada en humanos^{168,179,180}. Así, la conversión para EPA y DHA a partir de ALA es, respectivamente, inferior al 5-6% y 0,1%, pudiendo ser estos porcentajes inferiores en individuos que presentan variantes genéticas del complejo génico desaturasas como, por ejemplo, el Síndrome Zellweger¹³⁴.

Sin embargo, existe una diferencia de género en la conversión de ALA en sus metabolitos n-3. Así, tras el consumo de 700 mg de ALA (isótopos estables de ALA etiquetado), en hombres se observó una conversión del 7,9% para EPA, 8,1% para DPA y 0% para DHA¹⁸¹, mientras que en mujeres no embarazadas se observó una conversión del 21,1% para EPA, 5,9% para DPA y 9,2% para DHA, siendo mayores los resultados en mujeres que consumían píldora anticonceptiva¹⁸². La capacidad incrementada de conversión en mujeres se debe a la regulación al alza por acción de los estrógenos¹⁷³. Además, esta mayor conversión también se debe, en parte, al menor índice de utilización del ALA para β -oxidación^{183,184}. También existe una reducción en la conversión de ALA relacionado con la edad debido a la reducción de la DD6¹²⁹, aunque esta situación puede ser paliada mediante terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas¹⁷⁰.

Los períodos fetal y perinatal son momentos críticos en el desarrollo del individuo. Así, el aporte de AG en estas etapas es esencial para un desarrollo óptimo de cerebro y retina¹⁶⁷, y se sabe que las perturbaciones nutricionales en estos períodos conllevan efectos negativos de larga duración sobre la salud cardiovascular y metabólica de los individuos¹⁷². El feto humano en desarrollo asimila al menos 400 mg de DHA por semana durante el último trimestre, aunque este dato sólo hace referencia a los requerimientos de cerebro, tejido adiposo e hígado, por lo que la demanda global para DHA probablemente es sustancialmente mayor. Ya que las actividades de las desaturasas en el hígado humano en desarrollo es menor que en adultos, el alcance de la cantidad para satisfacer las necesidades de DHA de fetos y neonatos debe ser mayor. Por consiguiente, la asimilación de DHA por parte del feto tiene que ser cubierta principalmente por el aporte de DHA a partir de la madre¹⁸⁵ que, a su vez, depende de la capacidad para sintetizar estos metabolitos a partir del ALA dietético, de la ingesta de EPA y DHA preformado, y de las reservas tisulares de la madre¹⁸².

Tanto en el embarazo como tras el nacimiento, el DHA en cantidad suficiente es esencial porque éste es el AG estructural predominante en el sistema nervioso central y retina, y su disponibilidad es crucial para el desarrollo del cerebro¹⁵³. Así, por esta razón, y porque su producción podría ser inadecuada en ciertas condiciones (por ejemplo, períodos de crecimiento), algunos autores consideran al DHA como un nutriente condicionalmente esencial, aun pudiendo ser sintetizado de forma endógena¹⁸⁴. En este sentido, se sabe que el consumo de 10,7 g de ALA por día por parte de la mujer lactante incrementa la concentración de ALA en plasma, eritrocito y leche materna. Sin embargo, el consumo incrementado de ALA no altera la concentración de DHA en la leche materna¹⁸⁵.

1.4.4 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se define como la fracción de un nutriente que es absorbido y transportado a la circulación sistémica (biodisponibilidad a corto plazo) o al lugar de actividad fisiológica (biodisponibilidad a largo plazo)¹⁸⁶.

Con respecto a la biodisponibilidad a corto plazo, se sabe que el proceso global de digestión y absorción de lípidos se caracteriza por ser altamente eficaz,

siendo absorbidos el 95% o más de los lípidos ingeridos¹⁸⁷. En este sentido, ácido oleico, AL y ALA presentan un grado de absorción similar, siendo la absorción de éste último del 96% de la dosis administrada de 750 mg durante 5 días¹⁸⁵.

A nivel intestino delgado, la absorción de AG es equivalente para los AG derivados de triglicéridos (TAG) y fosfolípidos¹⁸⁸. La velocidad de absorción varía según el número de átomos de carbono; la absorción de AG de cadena media es más rápida, en comparación con AG de 14 átomos de carbono o más, al poder ser disueltos en la fase acuosa y, por tanto, absorbidos, unidos a albúmina y transportados al hígado directamente vía porta¹⁸⁹.

Una vez absorbidos al enterocito, los AG de 12 o menos átomos de carbono son directamente transferidos a sangre y linfa, mientras que los AG con 14 átomos de carbono o más son re-esterificados en TAG y formarán, junto a ésteres de CT, fosfolípidos y apolipoproteínas, los quilomicrones (QM) en el enterocito. Tras su formación, los QM serán liberados a la linfa y, posteriormente, al torrente sanguíneo vía conducto torácico evitando el paso por el hígado¹⁸⁷.

Con respecto a los AGPI n-3, se ha observado que su biodisponibilidad a corto plazo depende de diversos factores: enlace químico, ingesta concomitante de alimentos, presencia de otros componentes en los alimentos, edad, variaciones individuales y forma galénica.

De todos estos factores, el tipo de enlace químico es el que influye en mayor medida sobre la biodisponibilidad de AGPI n-3¹⁹⁰. En este sentido, la mayor biodisponibilidad se observa en TAG re-esterificados (TAGr), seguidos de TAG naturales, AG libres y AG en forma de éster etílico (EE); así, para un consumo de 3,3 g EPA+DHA durante 2 semanas, la biodisponibilidad de EPA+DHA en TAGr es un 124% en comparación con TAG naturales (aceite de pescado natural), mientras que la de los AG libres y AG en forma de EE es un 86 y 73%, respectivamente, al comparar con los TAG naturales¹⁹¹.

En cuanto a los TAGr, su mayor biodisponibilidad en comparación con los TAG naturales se debe probablemente a la posición del AG en el TAG; en TAG naturales los AG de cadena larga se localizan en posición sn-2. Por el contrario, los TAGr contienen mayores cantidades de AG de cadena larga en las posiciones sn-1 y sn-3, lo que facilita la acción de las lipasas pancreáticas. Además, se ha sugerido que la mayor biodisponibilidad de los TAGr se debe a la presencia de

monoglicéridos y diglicéridos que facilitan la formación de micelas y, por tanto, la absorción de AG de cadena larga al enterocito¹⁸⁶. Sin embargo, el índice de absorción de los AG en posición sn-2 es mayor que en posición sn-1 y 3 debido a que los monoglicéridos son absorbidos más rápidamente que los AG libres¹⁸⁷.

El término re-esterificación se emplea en productos elaborados a partir de aceites de pescado. En este proceso, en torno al 30% del contenido de TAG es transferido a EE y, posteriormente, concentrado molecularmente para retirar la cadena corta y los AGS, incrementando así el contenido de EPA y DHA hasta, aproximadamente, un 60%. Finalmente, los AG en EE son reconvertidos enzimáticamente a TAG¹⁹¹.

Por último, se ha sugerido que la biodisponibilidad de los TAGr es inferior a los suplementos que presentan los AG en forma de fosfolípidos como, por ejemplo, el aceite de krill¹⁸⁸. Sin embargo, existen pocos estudios al respecto y los estudios llevados a cabo muestran resultados contradictorios¹⁸⁶.

Con respecto a la influencia de la ingesta concomitante de alimentos y a la presencia de ciertos componentes de estos, diversas sustancias como fibras dietéticas y proteínas pueden alterar la biodisponibilidad de AGPI n-3. Además, otros componentes tales como cationes multivalentes (Ca^{+2} y Mg^{+2}) pueden formar un complejo con AG libres, reduciendo así su biodisponibilidad¹⁸⁷. Por el contrario, la presencia de grasas en la ingesta que acompaña a la toma de un suplemento de AGPI n-3 mejora la digestión y absorción de estos n-3 debido a la mayor estimulación de la liberación de las lipasas pancreáticas¹⁸⁶.

En referencia a la edad, se ha observado una mayor incorporación de DHA a los lípidos plasmáticos en individuos mayores (70-78 años), en comparación con individuos jóvenes (22-26 años). Por el contrario, la incorporación de EPA fue similar para ambas edades¹⁹². Con respecto al contenido en la membrana de eritrocitos, se ha observado que el contenido de EPA y DHA está directamente relacionado con la edad, siendo mayor el contenido de estos en individuos de edad avanzada¹⁹³.

En cuanto a las variaciones individuales, la absorción de los AG es un proceso que engloba varios pasos y es regulado, principalmente, por la presencia de proteínas de unión de AG en la membrana apical de los enterocitos, lo que indica que la absorción es regulada por múltiples genes a nivel enterocito. Por

tanto, su eficiencia puede estar determinada por factores que influyen en estos transportadores de membrana¹⁹⁴.

En lo que respecta a la forma galénica, se ha observado que diversas técnicas tales como preemulsificación, microencapsulación y empleo de suplementos encapsulados pueden modificar la biodisponibilidad a corto plazo.

La emulsificación es un paso importante en la digestión y absorción de grasas, por tanto, el proceso de preemulsificación puede mejorar ambos procesos. Así, se ha demostrado que la preemulsificación acelera la absorción de EPA y DHA¹⁹⁵ debido a la formación de gotas de lípidos más pequeñas, lo que disminuye el tiempo de vaciado gástrico y facilita la acción de las lipasas pancreáticas. Sin embargo, este proceso sólo mejora la absorción de EPA, no afectando a la absorción del DHA¹⁹⁶.

La microencapsulación es un proceso clave al reducir la oxidación del aceite de pescado empleado para fortificar productos alimentarios; los AGPI de los aceites de pescado pueden ser oxidados en presencia de luz y O₂, dando lugar a la formación de aldehídos que derivan en un olor y sabor desagradable¹⁹⁷. Además, este proceso mejora la biodisponibilidad ya que el aceite microencapsulado presenta una rotura más sencilla de gotas de aceite por acción de las lipasas¹⁸⁶.

Por último, se ha observado que, comparado con el uso de aceite de pescado emulsionado, el empleo de cápsula en suplementos de aceites de pescado reduce significativamente la concentración de EPA y DHA en plasma a las 2 h de la ingesta. Sin embargo, a las 26 h no se observaron diferencias de concentración para DHA¹⁹⁶, lo que sugiere que la biodisponibilidad global del DHA no se ve influenciada por el empleo de cápsula en los suplementos de AGPI n-3.

Existen diversos marcadores que indican la biodisponibilidad a corto plazo: EPA en fosfolípidos plasmáticos, y DHA en TAG y fosfolípidos plasmáticos, entre otros¹⁹⁸. Aunque la biodisponibilidad a corto plazo es útil para evaluar la velocidad y cantidad de AGPI n-3 absorbidos, no lo es para evaluar la cantidad de n-3 depositados en los tejidos diana. En este sentido, el mejor marcador de biodisponibilidad a largo plazo es el contenido de DHA en la membrana de los eritrocitos, correlacionando adecuadamente con las concentraciones de AG de cadena larga n-3 en la membrana celular de tejido miocárdico, hepático y renal¹⁸⁶.

Así, éste es un buen marcador a distintas dosis y es efectivo en adultos, niños, adolescentes, y mujeres embarazadas y lactantes¹⁹⁸.

Sin embargo, existen diferentes elementos que pueden afectar la llegada de EPA y DHA a la membrana de los eritrocitos: proteínas ligadoras de AG (por ejemplo la proteína vinculante de ácidos grasos 2), enzimas de metabolización (coenzima A ligasa 4 de ácidos grasos) y transportadores de membrana (CD36). Asimismo, polimorfismos en el gen COX-2 se asocia a menores niveles de DHA en eritrocitos¹⁹⁹.

1.4.5 Mecanismos de acción

Existen 4 mecanismos interrelacionados por los cuales los AGPI n-3 influyen, directa o indirectamente, en el comportamiento celular¹⁴¹ (Figura 17):

- Generación de cambios en la composición de los fosfolípidos de la membrana celular.
- Influencia sobre receptores o sensores intracelulares, o de membrana, de AG.
- Modulación de concentraciones de metabolitos.
- Influencia sobre factores como la oxidación de la LDL y el estrés oxidativo.

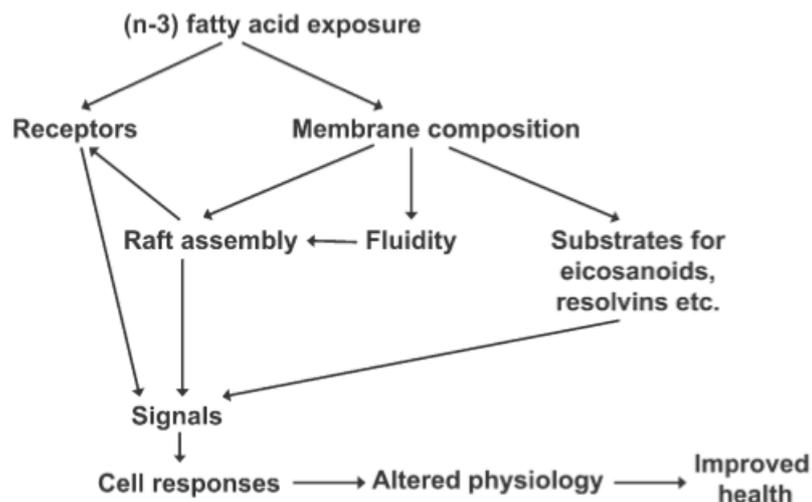


Figura 17. Mecanismos de acción de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 que pueden influir en la función celular¹⁴¹.

La composición de los fosfolípidos de la membrana celular es determinada por la ingesta de AG. Así, ARA, ácido dihomo-*gamma*-linolénico, EPA y DHA son incorporados en posición sn-2 de los fosfolípidos²⁰⁰, por competición¹³², e influyen en las propiedades biofísicas de membrana tales como fluidez, elasticidad, permeabilidad y formación de microdominios denominados *lipid rafts* (LR)^{188,201}, y en la función de los constituyentes de membrana como receptores, transportadores, canales iónicos y enzimas de señalización¹⁸⁰.

En comparación con otros AGPI, el DHA mejora la fluidez de membrana por su número de insaturaciones y por la capacidad para adquirir una estructura ligeramente helicoidal¹⁴⁴. EPA y DHA incrementan la permeabilidad de la membrana pero el DHA genera un incremento superior por su mayor longitud de cadena, número de insaturaciones, y capacidad para reducir el contenido de CT en la membrana celular^{180,201}, lo que se asocia a mayor flexibilidad de las membranas en presencia de DHA y, por tanto, menor sensibilidad al estrés mecánico¹⁴⁴.

Los LR son microdominios, constituidos por esfingolípidos, CT y fosfolípidos que contienen AGS, distribuidos a lo largo de la membrana celular; además, se localizan en organelas intracelulares como aparato de Golgi y mitocondria²⁰². Los LR proporcionan un ambiente lipídico más ordenado que la membrana en sí, debido a interacciones entre CT, esfingolípidos y AGS que contienen los fosfolípidos²⁰³, y su contenido en CT influye en la rigidez de la membrana celular²⁰¹. En este sentido, los AGPI n-3, y el DHA de forma destacada, modifican no sólo la composición de los fosfolípidos de membrana, sino también la composición de los fosfolípidos de los LR, lo que genera membranas menos rígidas al favorecer dominios con menor contenido en CT debido a la baja afinidad del DHA con éste²⁰³. Además, actúan como plataformas de señalización en respuesta a un estímulo¹⁴¹. De este modo, cuando una molécula se une a su receptor, se producen uniones dirigidas por interacciones lípido-lípido y lípido-proteína que conlleva la mejora de la función de las proteínas de la membrana celular²⁰².

Además, los fosfolípidos de la membrana son fuente de AGPI no esterificados liberados que pueden actuar como ligandos para diversos factores de transcripción y como precursores para la síntesis de distintos mediadores lipídicos.

Los AGPI n-3 pueden actuar como segundos mensajeros o como sustitutos de los segundos mensajeros de las vías de transducción de señal (fosfolípidos de inositol: diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato; adenosín monofosfato cíclico)¹³². De forma específica, el DHA puede interactuar directamente con diversos factores de transcripción y receptores celulares específicos, lo que le confiere una capacidad de regulación potencial sobre un gran número de genes²⁰⁴.

Como ligandos de factores de transcripción, los n-3 actúan sobre los receptores activadores de proliferación del peroxisoma (PPAR), PPAR α y PPAR γ , el receptor hepático X *alfa*, el factor nuclear hepático 4, el factor de transcripción insulínico 1, y el NF- κ B²⁰⁵. De este modo, estos AG alteran la actividad de los factores de transcripción y, por tanto, modifican la expresión génica²⁰⁶.

En cuanto a los PPAR, se ha sugerido que EPA y DHA muestran un papel agonista en esta vía¹⁸⁰ (Figura 18). Con respecto a su acción biológica, el PPAR- α regula genes implicados en la homeostasis de las lipoproteínas de alta densidad y QM, y varias enzimas implicadas en lipogénesis y oxidación de AG; y el PPAR- γ juega un rol central en la diferenciación de adipocitos y sensibilidad a la insulina, y regula genes relacionados con el almacenamiento y metabolismo lipídico¹⁹⁹.

Además, los AGPI n-3, principalmente el DHA²⁰¹, inhiben la activación del NF- κ B a través de diversas vías. El NF- κ B modula genes implicados en las vías de señalización inflamatoria e incrementa la expresión de diversas citocinas tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y diversas IL (1 β , 2, 6, y 12), moléculas de adhesión (molécula de adhesión celular vascular 1), y enzimas efectoras inducibles como iNOS, COX 2 y PLA₂¹⁴¹.

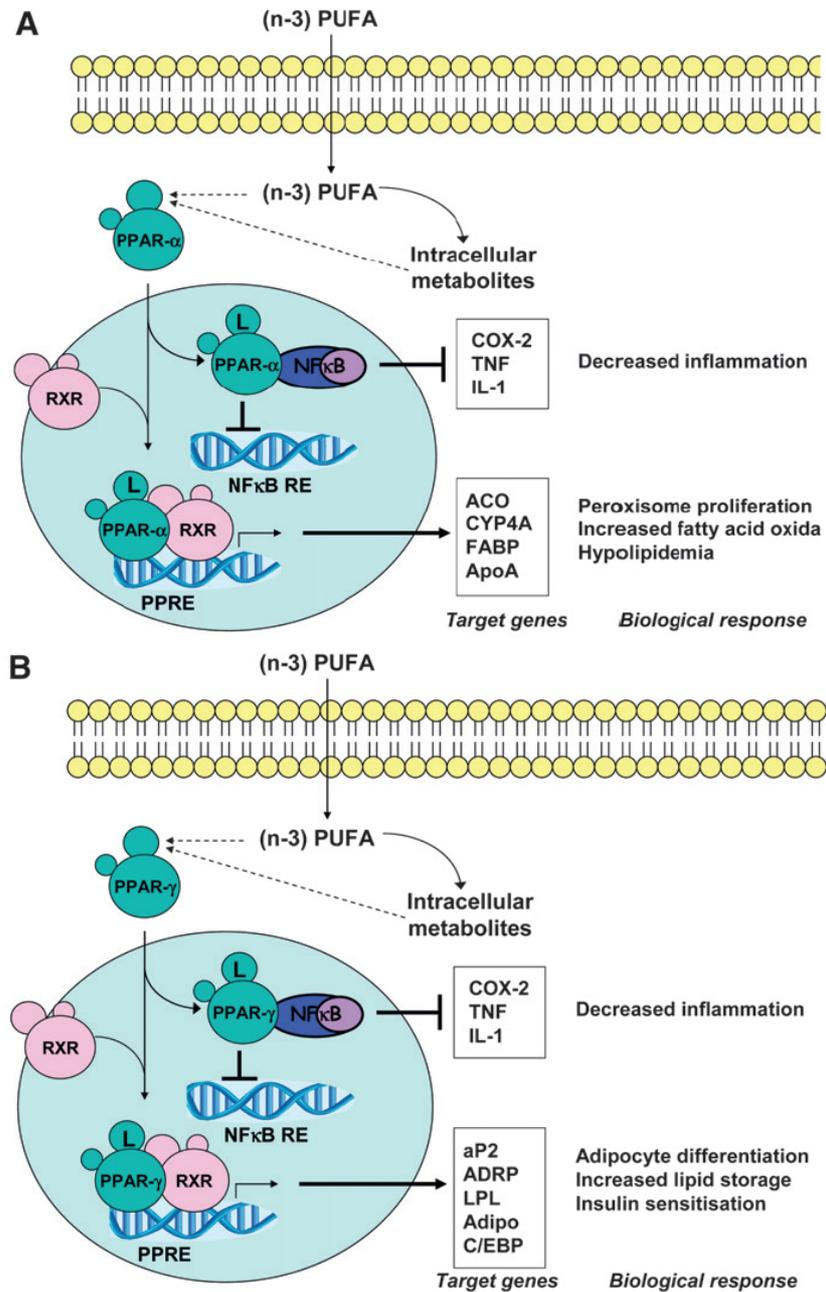


Figura 18. Vías de los receptores activadores de proliferación del peroxisoma *alfa* y *gamma*¹⁴¹.

Acil-CoA oxidasa (ACO), Adiponectina (Adipo), Proteína relacionada con la diferenciación de adipocito (ADRP); Apolipoproteína A (ApoA), Proteínas CCAAT potenciador de unión (C/EBP), Citocromo P450 4A (CYP4A), Proteína ligadora de AG (FABP), Ligando (L), LPL, Receptor de ácido retinoico (RXR).

Con respecto a la síntesis de mediadores lipídicos, los AGPI n-6 y n-3 compiten como sustratos de enzimas que controlan la formación de diversos mediadores lipídicos, tales como eicosanoides y docosanoides, los cuales regulan la iniciación, magnitud y duración de las respuestas inflamatorias. Así, varios mediadores producidos a partir de los AGPI n-6 tienen funciones proinflamatorias, mientras que aquellos derivados de los AGPI n-3, y algunos derivados de los AGPI n-6, presentan funciones menos inflamatorias o propiedades resolutorias del proceso inflamatorio²⁰⁰.

Los eicosanoides derivan de AGPI n-3 y n-6 de 20 átomos de carbono, mientras que los docosanoides derivan de AGPI n-3 y n-6 de 22 átomos de carbono²⁰⁷.

Los eicosanoides producidos a partir del ARA (Figura 19) incluyen varias prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) y lipoxinas (LX). Su síntesis depende inicialmente de la acción de la PLA₂, la cual libera el ARA esterificado de los fosfolípidos de membrana al ser activada por el estímulo inflamatorio²⁰⁸. Una vez liberado, el ARA puede ser metabolizado por las vías enzimáticas de oxidación COX, LOX o epoxigenasa (por ejemplo, citocromo P450), lo que determinará la clase de eicosanoide generado²⁰⁰, siendo las dos primeras las vías principales de síntesis de eicosanoides¹⁴⁴.

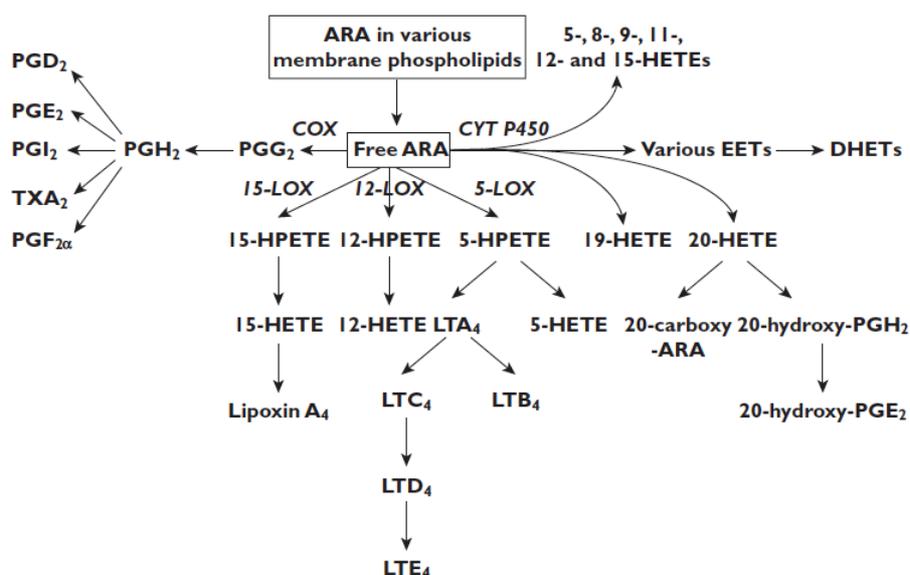


Figura 19. Vías de síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico²⁰⁸.

Las enzimas COX (isoformas 1 y 2) catalizan la formación de PG y TX, mientras que la enzima LOX 5 cataliza la formación de LT; además, las enzimas LOX 12 y LOX 15 participan en la síntesis de otros mediadores lipídicos, al igual que la citocromo P450²⁰⁸ (Figura 19). Como resultado del metabolismo del ARA, se forman PG de serie 2 y LT de serie 4, con marcado carácter proinflamatorio¹⁸⁰, y TX de serie 2 con carácter protrombótico¹⁴⁴. Sin embargo, con respecto a otros mediadores generados, se sabe que la lipoxina A₄ (LXA₄) tiene efecto resolutorio de inflamación; además, la PGE₂ presenta una actividad proinflamatoria pero también tiene un efecto resolutorio del proceso inflamatorio²⁰⁰.

Sin embargo, aunque el ARA es el precursor más habitual de eicosanoides debido al elevado consumo de AGPI n-6 en la dieta occidental²⁰⁶, existen otros importantes mediadores producidos a partir de la oxidación enzimática de AGPI n-3.

El EPA puede reducir la producción de eicosanoides derivados de ARA por competición con éste AG para la incorporación a los fosfolípidos de membrana, lo que reduce su liberación por acción de la PLA₂, o por inhibición de vías enzimáticas de oxidación. De forma global, el EPA desplaza la producción de eicosanoides derivados del ARA, reduciendo la síntesis de PG y TX de serie 2, y síntesis de LT de serie 4, e incrementado la producción de PG y TX de serie 3, y LT de serie 5²⁰⁹. Así, y como resultado de la reducción de la producción de PGE₂ y sus metabolitos, LTB₄ y TXA₂, se reduce la vasoconstricción, agregación plaquetaria, quimiotaxis y adherencia de leucocitos; además, el incremento en la síntesis de TXA₃, PGI₃ y LTB₅ inhibe la agregación plaquetaria y vasoconstricción, y promueve la vasodilatación. Asimismo, esta modificación en la síntesis de PG y LT, en favor de las series 3 y 5, respectivamente, resulta en un estado menos inflamatorio y reduce, por tanto, la susceptibilidad a desarrollar problemas inflamatorios crónicos y enfermedades relacionadas¹⁸⁰.

En los últimos años se han descrito otras familias de mediadores lipídicos producidos a partir de EPA y DHA conocidos como docosanoides (Figura 20), y que incluyen a 2 grupos de sustancias cuya síntesis implica las vías de COX y LOX¹⁴¹.

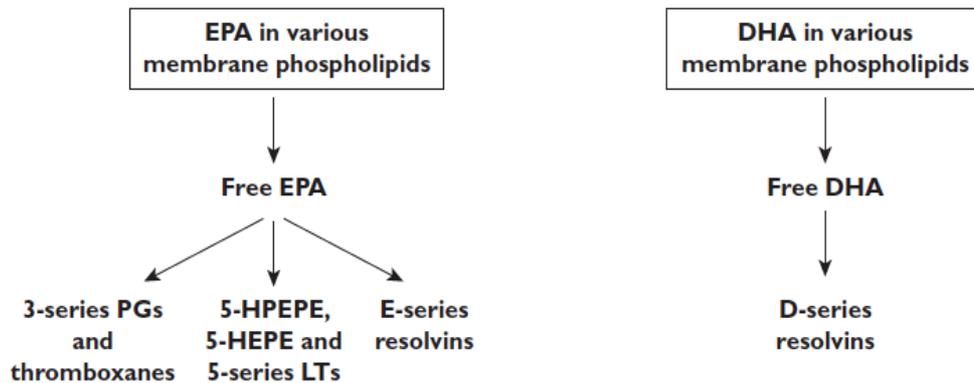


Figura 20. Resumen de las vías de síntesis de mediadores lipídicos a partir de los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico²⁰⁸.

El metabolismo de EPA y DHA da lugar a productos de resolución de inflamación denominados resolvinas. Así, a partir del EPA se generan resolvinas de serie E (E1 y E2) y, a partir del DHA se producen resolvinas de serie D (D1-D4)^{144,174}. Estos mediadores actúan como sustancias resolutivas de inflamación y suprimen la producción de distintas IL y del TNF α por parte de las células T, funcionando por tanto como agentes antiinflamatorios endógenos y como moduladores del sistema inmune¹⁴¹. Los mecanismos antiinflamatorios se deben a la regulación a la baja del NF- κ B por acción del TNF α ¹³².

Adicionalmente, el metabolismo del DHA genera otros mediadores lipídicos de macrófagos, denominados protectinas, o neuroprotectinas D1 (NPD1) cuando son sintetizados por tejidos neurales. Estos mediadores, al igual que las resolvinas, inducen acciones resolutivas en la respuesta inflamatoria y presentan una función neuroprotectora²¹⁰. Así, la NPD1 inhibe la inflamación mediada por citocinas y la apoptosis inducida por el estrés oxidativo²¹¹.

Por último, los AGPI n-3 han sido relacionados con la oxidación de la LDL. Durante la inflamación vascular, las moléculas de LDL acumuladas en el espacio sub-endotelial pueden sufrir modificación oxidativa, resultando en la formación de la LDL oxidada²¹², molécula más aterogénica que la LDL no modificada²¹³. La molécula de LDL contiene fosfolípidos que, a su vez, contienen un AGPI en posición sn-2, lo que hace especialmente susceptible a la oxidación a la molécula LDL. Este proceso de oxidación se produce vía enzimática y no enzimática; la vía

enzimática incluye la acción de COX y LOX, y la MPX, mientras que la no enzimática es mediada por ER que son generados, por ejemplo, por las nicotinamidas adenina dinucleótido fosfato oxidasas²¹⁴.

De forma indirecta, el DHA ha mostrado un efecto modulador a la baja de la expresión de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4, lo que deriva en una reducción de O_2^{\bullet} , en células endoteliales aórticas humanas²¹⁵, situación también observada en estudios en animales²¹⁶. Además, en humanos se ha observado que el DHA tiene un efecto directo antioxidante sobre la LDL²¹⁷ que podría ser debido al efecto neutralizador de EPA y DHA sobre el O_2^{\bullet} ²¹⁸.

1.4.6 Ácido graso docosahexaenoico y estrés oxidativo

Diversas razones han llevado a gobiernos y a asociaciones profesionales y no gubernamentales a recomendar el incremento del consumo de AGPI n-3, principalmente EPA y DHA. En primer lugar, su consumo a partir de fuentes de origen vegetal (Figura 14) y marino (Figura 15) es inadecuado en un alto porcentaje de la población mundial¹⁵⁶. Segundo, la síntesis endógena de EPA y DHA a partir del ALA es limitada en humanos^{168,179,180}. Y, por último, estos AG presentan múltiples mecanismos de acción que influyen positivamente en el comportamiento celular¹⁴¹ y, por tanto, en la salud humana; los AGPI n-3 juegan un papel esencial en la función cerebral, y en su normal crecimiento y desarrollo, reducen la inflamación y patologías asociadas, lo que disminuye el riesgo de enfermedad coronaria y cardiovascular, artritis reumatoide, diabetes, cáncer, arritmias y síndrome metabólico^{174,219,220}, entre otras.

Aunque el consumo de 2 raciones de pescado graso a la semana permite la ingesta de 0,5 g/d de EPA y DHA¹⁴⁴, que es la dosis recomendada para la prevención primaria de enfermedad cardíaca²²¹, muchos individuos son resistentes a consumir pescado por molestia gastrointestinal asociada, sabor y olor a pescado¹⁶³, seguimiento de dieta vegana y alergias¹⁵³. Por ello, en los últimos años han surgido estrategias basadas en el uso de aceites de pescado, como el enriquecimiento o fortificación de algunos alimentos, o la modificación de la alimentación de los animales de granja para incrementar el consumo de estos AGPI n-3¹⁶⁴. Además, actualmente se pueden encontrar en el mercado una gran variedad de suplementos de AGPI n-3 obtenidos a partir de diferentes

fuentes¹³³, los cuales contienen cantidades insignificantes de Hg y niveles de PCB por debajo de los límites de detección¹⁴².

Sin embargo, incrementar el consumo de AGPI n-3 presenta un riesgo asociado: la susceptibilidad de los AGPI a la oxidación. Así, los AGPI, incluyendo los n-3, son las moléculas celulares más sensibles al daño oxidativo generado por el O₂ y las ER²²² debido a la abstracción de H₂ del grupo metileno localizado entre los dobles enlaces²²⁰; la sensibilidad a la peroxidación lipídica es directamente proporcional al número de dobles enlaces²²³⁻²²⁴ y, dentro de los AGPI, el DHA es el AG más susceptible a la peroxidación lipídica^{218,220}. Esta es la base de numerosos ensayos realizados sobre cultivos de células tumorales, en los que se ha comprobado el efecto citotóxico del DHA.

La peroxidación lipídica es considerada el mecanismo principal para la citotoxicidad inducida por los AGPI observada en estudios *in vitro* en células tumorales. En este sentido, la acumulación de subproductos de la peroxidación lipídica causan daño oxidativo y conllevan, finalmente, la apoptosis de la célula tumoral²²⁵.

De forma característica, cuando una célula normal se vuelve cancerígena exhibe altos niveles de ERO endógenas debido, principalmente, a la aceleración del metabolismo, que es un elemento necesario para mantener un alto índice de proliferación celular. Sin embargo, altos niveles de ERO implican que las células tumorales necesitan defenderse del daño oxidativo para sobrevivir y proliferar. En este sentido, las células tumorales son capaces de mantener elevados los niveles de GSH y altos niveles de enzimas antioxidantes endógenos como la Cu/ZnSOD, además de incrementar la obtención de energía mediante la glucólisis e inhibir la respiración mitocondrial, conocido como efecto Warburg, con la consiguiente reducción de síntesis de ER, lo que constituye por tanto un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo y permite la proliferación de la célula tumoral²²⁰. En este sentido, diversos estudios *in vitro* en líneas de células tumorales han observado un efecto citotóxico al tratar dichas células con DHA por varios efectos que conllevan un incremento del estrés oxidativo²²⁵⁻²²⁷.

El DHA también reduce la resistencia a los fármacos anticancerosos y mejora la eficacia del tratamiento sin efectos adversos aparentes¹³¹. Así, al incrementar el índice de insaturación de la membrana, el DHA incrementa el número de dianas para las ERO generadas por dichos fármacos²²⁸. Asimismo, el

empleo de DHA en tratamiento de radioterapia incrementa la sensibilidad de las células tumorales a la irradiación, sin incremento de sensibilidad en células normales²²⁹. Por último, en estudios *in vivo* el efecto es similar²³⁰.

Los resultados en células tumorales son concluyentes, sin embargo, se ha sugerido que el incremento de peroxidación lipídica podría suponer un peligro potencial en células normales²²⁴.

Numerosos estudios *in vitro* en células normales han sido llevados a cabo para evaluar la relación del DHA con el estrés oxidativo. Así, a dosis fisiológicas, que oscilan a nivel plasmático entre 100 y 300 μM , con gran proporción del DHA unido a transportadores y sólo el 0,5-3% encontrado en forma libre²³¹, los resultados obtenidos son contradictorios^{218,224,232-234}.

De igual modo, y aunque desde el punto de vista teórico existe una correlación entre el número de insaturaciones y el grado de peroxidación lipídica, los resultados exhibidos tampoco son concluyentes en estudios de modelos animales²³⁵⁻²³⁸.

Con respecto a los estudios en humanos, los datos disponibles tampoco son concluyentes. Así, se ha informado de efecto prooxidante^{239,240}, ausencia de modificación sobre marcadores de estrés oxidativo²⁴¹⁻²⁴³ y efecto antioxidante²⁴⁴⁻²⁴⁶.

Un número limitado de autores han evaluado el efecto de la suplementación con AGPI n-3 en el estrés oxidativo basal e inducido por el ejercicio, y los resultados obtenidos también son ambiguos²⁴⁷⁻²⁵⁵. La ambigüedad de los resultados obtenidos puede ser debida a las diferencias en los protocolos de estudio, en la duración y las dosis de suplementación, en los momentos de valoración, en los marcadores de estrés oxidativo empleados y en el nivel de estado de forma de los sujetos a estudio.

Para nuestro conocimiento, sólo un estudio ha evaluado la relación de la suplementación de AGPI n-3 y el daño oxidativo al ADN en situación basal y como consecuencia de la realización de ejercicio físico²⁵⁵, sin embargo, se analizó el daño al ADN de linfocitos, se empleó un protocolo de ejercicio excéntrico y el producto experimental presentaba mayor contenido de EPA que DHA. Además, los estudios que han centrado su atención en el efecto del DHA²⁵²⁻²⁵⁴ no llevaron a cabo una valoración del daño oxidativo al ADN ni desarrollaron su protocolo en condiciones de laboratorio.

Nuestro grupo de investigación evaluó anteriormente el efecto del consumo diario de 2,1 g de DHA y 0,3 g de EPA, en forma de TAGr, durante 3 meses en ciclistas, en el estrés oxidativo basal e inducido por el ejercicio sobre lípidos a nivel plasmático (MDA) y ADN (8-OHdG en orina). Con respecto a los datos basales de MDA, se observó ausencia de modificación tras 2 semanas de consumo y descenso no significativo tras 3 meses. Los datos basales de 8-OHdG (en relación al peso y a la excreción de creatinina) mostraron concentraciones ligeramente superiores, pero sin significación estadística, en ambos momentos. Para determinar la influencia del consumo de 2,1 g de DHA y 0,3 g de EPA sobre el daño oxidativo generado durante el ejercicio, los sujetos a estudio fueron sometidos a una prueba de esfuerzo de alta intensidad (70% VO_{2max}) y larga duración (90 min) en condiciones de laboratorio como protocolo inductor de estrés oxidativo. En cuanto a los niveles de MDA postejercicio no se produjo modificación de los niveles de MDA tras 2 semanas de consumo al comparar los niveles con el momento preejercicio, y se observó una disminución no significativa tras 3 meses de ingesta. Con respecto a la concentración de 8-OHdG en orina se obtuvieron varios resultados: primero, la excreción urinaria de 8-OHdG en relación al peso del ciclista resultante de la prueba de esfuerzo se incrementó significativamente en la prueba basal, sin embargo, tras 2 semanas y 3 meses de consumo dicho incremento no fue significativo; segundo, los resultados obtenidos en relación a la excreción de creatinina fueron iguales, es decir, en la prueba basal se produjo un incremento significativo de 8-OHdG pero, tras 2 semanas y 3 meses de consumo dicho incremento se redujo, aunque no de forma significativa; tercero, en lo que respecta a los niveles de 8-OHdG en la micción posterior a las pruebas de esfuerzo se observó que los niveles de la variable eran estadísticamente inferiores tras 2 semanas y 3 meses de consumo. Por último, también se observó un incremento significativo de la capacidad antioxidante total del plasma tras 3 meses de consumo previo al esfuerzo²⁵⁶.

En este trabajo hemos empleado un producto experimental (aceite de pescado) con alto contenido en DHA y baja concentración de EPA y hemos seleccionado una población de individuos sanos, físicamente activos y practicantes de ciclismo de forma no profesional, a los que hemos suplementado su alimentación habitual con distintas dosis de DHA y EPA durante 4 semanas. Posteriormente, hemos analizado el daño oxidativo al ADN basal e inducido por

una prueba de esfuerzo de alta intensidad (70% $\text{VO}_{2\text{max}}$) y larga duración (90 min) en condiciones de laboratorio, y lo hemos comparado con el daño oxidativo generado por una prueba de esfuerzo realizada antes de la suplementación, y con el daño oxidativo basal observado antes de ambas pruebas de esfuerzo. La observación del daño oxidativo basal y del daño oxidativo inducido por una prueba de esfuerzo de alta intensidad y larga duración demostrará la capacidad antioxidante del DHA a distintas dosis.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Desde un punto de vista teórico incrementar el consumo de AGPI n-3 podría actuar como inductor de daño oxidativo y, por tanto, como generador de estrés oxidativo²²⁴. Sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo sobre la influencia de los AGPI n-3 en humanos no son concluyentes.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el consumo diario de 2,4 g de AGPI n-3 (2,1 g de DHA y 0,3 g de EPA) durante 3 meses es capaz de reducir el estrés oxidativo generado por una prueba de esfuerzo de elevada intensidad y larga duración en ciclistas no profesionales²⁵⁶. En este estudio evaluamos la capacidad antioxidante del DHA en función de la dosis ingerida durante 4 semanas en ciclistas.

Por tanto, los objetivos de la presente tesis son:

- Objetivo general:
 - Evaluar la capacidad antioxidante del DHA consumido a distintas dosis durante 4 semanas en ciclistas.
- Objetivos secundarios:
 - Analizar la modificación del daño oxidativo al ADN que se genera durante la realización de una prueba de esfuerzo de elevada intensidad y larga duración tras el consumo de DHA a distintas dosis.
 - Determinar la modificación del daño oxidativo al ADN en el estado basal que produce la ingesta de DHA a distintas dosis.
 - Evaluar los cambios producidos en el perfil de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos tras el consumo de DHA a distintas dosis.
 - Valorar las modificaciones hematológicas y bioquímicas del consumo de DHA a distintas dosis.

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 SUJETOS DEL ESTUDIO

Se seleccionaron inicialmente, de forma azarosa, a 59 ciclistas varones no profesionales, de los cuales 54 individuos cumplieron los criterios de selección del estudio. La edad media de los sujetos a estudios fue de $38,6 \pm 9,8$ años, su consumo máximo/pico de oxígeno (VO_{2max}) medio relativo al peso fue de $45,8 \pm 6,8$ ml/min·kg y realizaban $9,1 \pm 4,6$ h de actividad física general a la semana, con $7,6 \pm 3,7$ h de ciclismo en particular.

La población a estudio se estratificó en 5 grupos en función del consumo diario de DHA durante 4 semanas:

- Grupo 1: placebo.
- Grupo 2: 350 mg.
- Grupo 3: 1050 mg.
- Grupo 4: 1750 mg.
- Grupo 5: 2450 mg.

Previo al estudio, cada uno de los sujetos fue sometido a revisión médico-deportiva consistente en anamnesis, exploración física de todos los sistemas y aparatos (con especial observación en aparato respiratorio, cardíaco y osteomuscular), y electrocardiograma basal. Cada deportista fue informado de forma oral y por escrito de la metodología del estudio así como de los posibles efectos indeseables que podían aparecer como consecuencia de las distintas determinaciones que se iban a realizar (pruebas de esfuerzo y extracciones sanguíneas) (Anexo 1 y 2). De la misma forma, los sujetos fueron informados de la voluntariedad del proyecto tanto en lo referido a su participación como en lo referente al abandono en cualquier momento del mismo. Asimismo, todos fueron conocedores de las características del producto que iban a ingerir durante 4 semanas y de los posibles efectos indeseables que podían aparecer durante su consumo. Todos ellos firmaron un consentimiento informado de participación en el proyecto (Anexo 3) y otro para cada una de las pruebas de esfuerzo realizadas (Anexo 1).

El protocolo del estudio, el formulario de consentimiento informado y la información a los sujetos fueron evaluados y aprobados por el comité ético de la Universidad Católica de Murcia.

Este ensayo clínico se diseñó, implementó y realizó de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Durante todas las fases de este estudio se garantizó el estricto cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre de Protección de Datos Personales.

Criterios de selección

Los sujetos participantes en el estudio debían estar sanos, presentar una edad igual o superior a los 18 años y no sufrir ningún tipo de padecimiento crónico. Ninguno era consumidor habitual de tratamientos farmacológicos que pudieran influir en las respuestas fisiológicas o bioquímicas a analizar en el presente estudio. Ninguno de ellos debía haber consumido en el mes anterior al inicio del estudio, ni durante la realización del mismo, alimento funcional enriquecido con AGPI n-3. Además, ninguno debía ser fumador ni consumidor habitual de bebidas alcohólicas. En caso de que algún individuo presentase alguna de las contraindicaciones absolutas o relativas dictaminadas por el Colegio Americano de Medicina Deportiva²⁵⁷ (Anexo 4) durante la realización de la primera prueba de esfuerzo fue debidamente informado y excluido del presente estudio. Por último, también fueron excluidos aquellos sujetos que habían sido sometidos a radiaciones ionizantes por motivos accidentales, diagnósticos o terapéuticos durante la realización del proyecto o en el mes anterior al mismo.

3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental. Ensayo clínico controlado, aleatorizado y abierto con 5 ramas a estudio en función de la dosis ingerida de DHA.

3.3 LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO

Las pruebas de esfuerzo se realizaron en el Laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Universidad Católica de Murcia. El centro cuenta con las

instalaciones, el aparataje y el personal sanitario necesario para la correcta ejecución de las mismas.

Las determinaciones de variables bioquímicas se procesaron en 3 laboratorios distintos:

- Laboratorios de Nutrición Humana de la Universidad Católica de Murcia.
- Laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.
- Laboratorios Munuera, S. L.

3.4 PRODUCTOS EN EXPERIMENTACIÓN

3.4.1 Producto experimental

El producto experimental es un aceite de pescado con DHA en la posición sn-2 del TAGr. Las características químicas del producto experimental utilizado en este estudio se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Características químicas del producto experimental.

	Unidad	Límites
Valor ácido	mg KOH/g	3,0 max.
Contenido antioxidante	g/100 g	1,0-1,1
Densidad a 20 °C	kg/l	0,930-0,940
DHA (22:6n-3)	g/100 g	70 min.
DPA (22:5n-3)	g/100 g	8 max.
EPA (C20:5n-3)	g/100 g	10 max.
Total ácidos grasos n-3	g/100 g	85 min.
Valor peróxido	meq O ₂ /kg	5,0 max.
Residuo de ignición	g/100 g	0,10 max.

Se realizó un análisis químico para cuantificar de forma específica el contenido del producto experimental (Figura 21). El análisis químico mostró que una cápsula del producto experimental contenía un 88% de AGPI n-3 (440 mg). Del total de AGPI n-3, cada cápsula contenía 350 mg DHA, 50 mg EPA y 40 mg DPA. Además, cada cápsula contenía 5 mg vitamina E.



Figura 21. Producto experimental consumido durante 4 semanas.

3.4.2 Producto placebo

El producto placebo empleado fue aceite de girasol encapsulado y fue idéntico en apariencia. Las características químicas del producto placebo se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Características químicas del producto placebo.

	Unidad	Límites
Valor ácido	mg KOH/g	0,5 max.
Ácido palmítico (C16:0)	%	4,0-9,0
Ácido esteárico (C18:0)	%	1,0-7,0
Ácido oleico (c18:1n-9)	%	14,0-40,0
Ácido linoleico (C18:2)	%	48,0-74,0
Valor peróxido	meq O ₂ /kg	10,0 max.

3.5 METODOLOGÍA

Cada sujeto realizó 3 pruebas de esfuerzo ergométricas (Figura 22). En cada prueba los sujetos debían acudir con ropa y calzado adecuados, con su bicicleta habitual, tras un ayuno de 120 min, y sin haber realizado esfuerzo físico o psíquico intenso en las 48 h previas a las pruebas de esfuerzo²⁵⁸. Todas las pruebas fueron desarrolladas por la mañana.

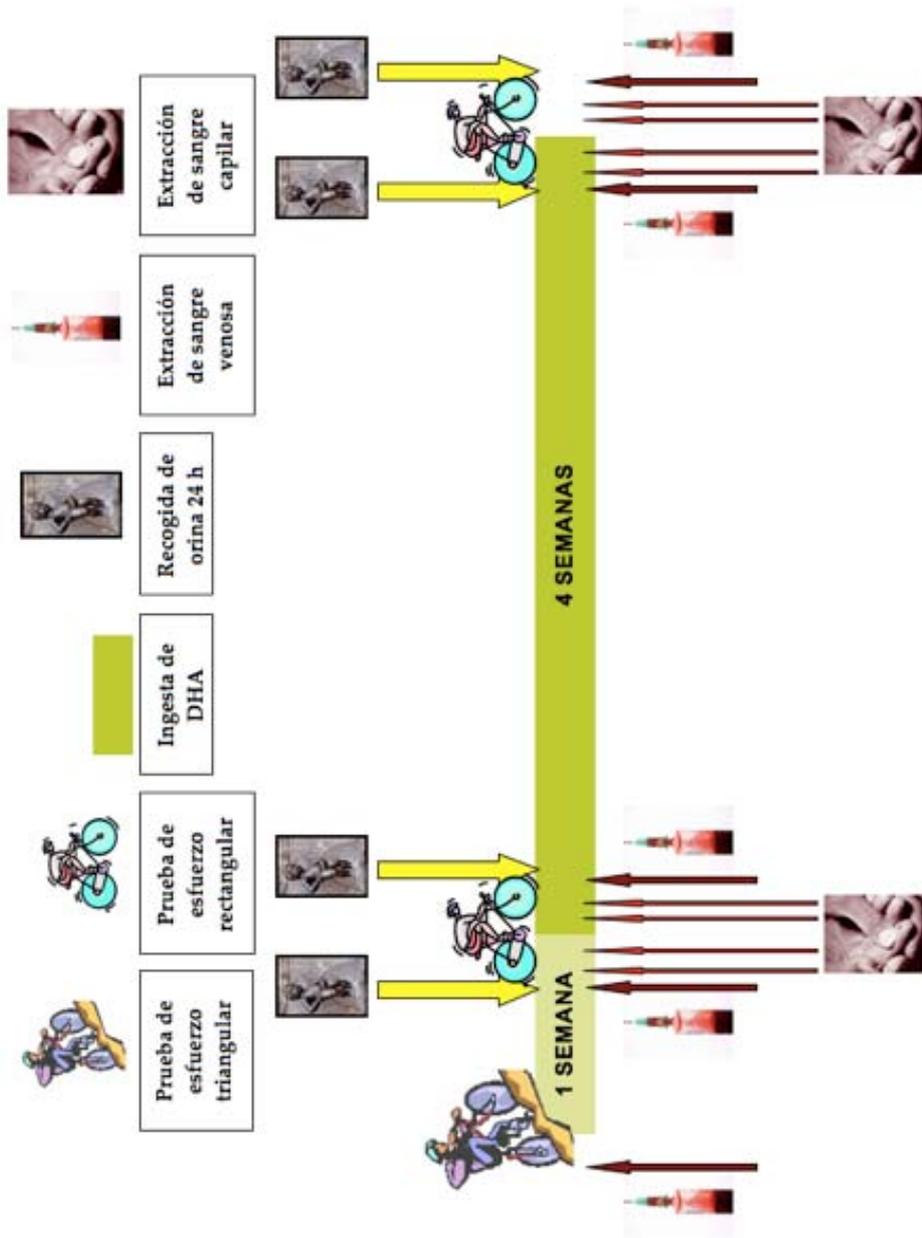


Figura 22. Pruebas de esfuerzo realizadas durante el estudio.

Primera Prueba: Prueba basal.

Prueba de esfuerzo incremental maximal progresiva realizada en rodillo de bicicleta con resistencia electromagnética sobre el cual se estabilizaba la bicicleta del sujeto, con una carga de inicio que simulaba una velocidad de 12 km/h e incrementos de carga de 2 km/h cada minuto, manteniendo una pendiente constante del 2%. Los sujetos emplearon desarrollo libre. Previo a la prueba, el ciclista fue monitorizado electrocardiográficamente, es decir, se situaron electrodos adhesivos en las distintas posiciones precordiales clásicas (V₁: cuarto espacio intercostal derecho, junto al esternón; V₂: cuarto espacio intercostal izquierdo, junto al esternón; V₃: en lugar equidistante entre V₂ y V₄; V₄: quinto espacio intercostal izquierdo en la línea claviclar media; V₅: quinto espacio intercostal izquierdo en la línea axilar anterior; V₆: quinto espacio intercostal izquierdo en la línea axilar media), mientras que los electrodos de las extremidades superiores e inferiores se situaron, respectivamente, en el segundo espacio intercostal de la línea claviclar media de ambos lados y en ambos hipocondrios. Los electrodos se conectaban mediante un cable al transductor de señal y amplificador; la señal de salida era conducida hacia un ordenador y procesada por un programa especializado con el que se vigilaba en tiempo real la actividad eléctrica cardíaca durante toda la prueba. El conjunto de cables y electrodos era sujetado al cuerpo del deportista mediante una venda tubular de malla elástica (Figura 23).

Asimismo, el ciclista era preparado antes de la prueba para el análisis de los gases respiratorios (respiración a respiración, circuito abierto) durante la realización de la prueba. Para ello, se colocaba una mascarilla de respiración que cubría nariz y boca, con un sistema de sujeción que impedía fugas a través de la unión mascarilla-piel. Acoplada a ella se instalaba el flujómetro del que partían diversos tubos y cables que conducían las señales al analizador de gases. Los resultados de dicho procedimiento aparecían en el monitor a tiempo real (Figura 24).



Figura 23. Colocación de electrodos electrocardiográficos para realización de prueba de esfuerzo incremental maximal progresiva y deportista con venda tubular de malla elástica.



Figura 24. Mascarilla de respiración con flujómetro acoplado y conexiones con el analizador de gases.

El ciclista era informado de las características de la prueba antes de su inicio y de la importancia de conseguir el mayor tiempo de prueba posible.

Los parámetros evaluados durante la realización de esta prueba fueron:

1. Variables ergoespirométricas analizadas al final de la prueba (estado maximal):
 - VO_{2max} relativo.
2. Variables ergoespirométricas analizadas en el umbral ventilatorio 2 (UV2):
 - VO_2 relativo.

Segunda Prueba: Prueba 1.

Esta prueba tuvo lugar una semana después de la primera. Todas las pruebas se desarrollaron por la mañana y se indicó a los sujetos a estudios que productos con propiedades antioxidantes no podían consumir en el desayuno de ese día (Tabla 9).

Tabla 9. Listado de alimentos prohibidos en el desayuno previo a la prueba.

Frutas	Verduras	Granos	Aceites	Carnes	Bebidas
Fresas	Pimiento	Café	A. Vegetales	Pescado	Vino tinto
Frambuesas	Zanahoria	Té verde			
Cerezas	Tomate	Cacao			
Uvas	Lechuga	Cereales			
Kiwis	Espinacas	Maíz			
Arándanos	Cebolla	Pipas			
Ciruelas	Ajo	Nueces			
Naranja		Soja y derivados			
Limón		Gérmenes de trigo			
Papaya					
Manzanas					
Piña					
Aguacate					

En este test, el ciclista realizó una prueba de esfuerzo en rodillo de bicicleta con resistencia electromagnética, sobre el cual se colocó la bicicleta del deportista, con carga máxima mantenida equivalente a una frecuencia cardíaca (FC) correspondiente al 70% de su VO_{2max} calculado en la prueba basal. Si esta FC se

encontraba por encima de la FC correspondiente al UV2, el ciclista realizó la prueba 5 lpm por debajo de la FC correspondiente a dicho umbral. La duración de la prueba fue de 90 min y el consumo de agua durante la misma fue *ad libitum*. Se realizó extracción sanguínea de la vena antecubital del brazo 10 min antes de la prueba y 10 min después de finalizarla; se extrajeron 12 ml de sangre en cada una de ellas distribuyéndose de la siguiente manera:

- Tubo de extracción de sangre con anticoagulante EDTA tripotásico. Se distribuyeron 10 ml en 3 tubos:
 - Tubo 1: Análisis hematológico. La muestra, tras la extracción, fue llevada al laboratorio para su análisis inmediato.
 - Tubos 2 y 3: Tras la extracción sanguínea los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a -80 °C y la fase celular se congelaba a -20 °C para su posterior análisis de laboratorio.
- Tubos separadores de suero con acelerante y gel. Un tubo con 2 ml que tras reposo de 20 min se centrifugaba a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido se llevó al laboratorio para análisis inmediato de parámetros bioquímicos de sangre venosa.

El sujeto fue pesado inmediatamente antes y después de la prueba.

Una vez finalizada la prueba, el líquido consumido fue contabilizado.

Además, el deportista realizó recogida de orina de 24 h en el día anterior a la prueba y en el día de realización de la misma siguiendo el protocolo establecido. La recogida de orina del día de la prueba comenzó tras la finalización de la prueba de esfuerzo. Para obtener esta muestra, el ciclista debió seguir el protocolo establecido en las tablas 10 y 11. Si la muestra era incompleta (alguna micción no recolectada), ésta era desechada del estudio. Tras contabilizar el volumen total de orina excretado durante las 24 h anteriores y posteriores a la prueba se obtuvo una muestra de 15 ml de cada una de ellas y se congeló a -80 °C para su posterior análisis.

Tabla 10. Protocolo de recogida de orina para las 24 horas previas a la prueba de esfuerzo.

RECOGIDA DE ORINA 24 HORAS PREVIAS A LA PRUEBA	
1.	En los días anteriores a la prueba de esfuerzo se le suministrará al deportista dos frascos de recogida de orina de 2 litros de capacidad.
2.	El día _____, a las ___ : ___ horas, al levantarse por la mañana, orinará en el váter (anote la fecha y la hora).
3.	Desde ese momento orinará siempre en un orinal o un recipiente limpio y seco (no lo limpie con lejía ni detergente). Echará después la orina en el frasco que le suministramos y lo guardará en la nevera, bien cerrado (dentro de una bolsa).
4.	Al día siguiente y a la misma hora que el día anterior, orinará en el orinal o el recipiente y echará también la orina en el frasco.
5.	Llevará el/los frascos al laboratorio donde realizará ese mismo día la prueba de esfuerzo.

Tabla 11. Protocolo de recogida de orina para las 24 horas posteriores a la prueba de esfuerzo.

RECOGIDA DE ORINA 24 HORAS POSTERIORES A LA PRUEBA	
1.	El día de la prueba de esfuerzo se le suministrará al deportista dos frascos de recogida de orina de 2 litros de capacidad.
2.	El día _____, a las ___ : ___ horas, se realizará micción previa a la prueba de esfuerzo rectangular en el váter (anote la fecha y la hora).
3.	Desde ese momento y por tanto desde el instante posterior a la prueba de esfuerzo rectangular, orinará siempre en un orinal o un recipiente limpio y seco (no lo limpie con lejía ni detergente). Echará después la orina en el frasco que le suministramos y lo guardará en la nevera, bien cerrado (dentro de una bolsa).
4.	Al día siguiente y a la misma hora en la que el día anterior realizó micción previa a la prueba de esfuerzo, orinará en el orinal o el recipiente y echará también la orina en el frasco.
5.	Llevará el/los frascos al laboratorio donde realizó el día anterior la prueba de esfuerzo.

Los parámetros evaluados durante la realización de esta prueba fueron:

- Parámetros para evaluar la hidratación intraprueba:
 - Peso de los sujetos.
 - Consumo de agua intraprueba.

- Capacidad antioxidante total del DHA.
- Análisis del perfil de AG en la membrana del eritrocito.
- Variables hematológicas de sangre venosa: hemograma y bioquímica.

Tras la recogida de muestra urinaria 24 h posterior a la prueba de esfuerzo, cada sujeto comenzó el consumo de DHA (Figura 21) en la dosis establecida en función del grupo asignado. Todos los sujetos mantuvieron este consumo durante 4 semanas.

El protocolo que siguieron los ciclistas en el laboratorio de pruebas funcionales el día que realiza la prueba de esfuerzo se resume en la tabla 12.

Tabla 12. Protocolo en laboratorio en el día de prueba de esfuerzo.

Minuto	Acción
0	Recogida de orina 24 h
5	Extracción sanguínea venosa
10	Encuesta nutricional sobre desayuno
15	Micción y apunte de hora
24	Pesada del deportista
25	Inicio de prueba de esfuerzo
115	Fin de prueba de esfuerzo
116	Cuantificación de consumo hídrico
120	Pesada del deportista
125	Micción y guardado de orina
135	Extracción sanguínea venosa
145	Entrega de recipientes de recogida de orina

Tercera Prueba: Prueba 2.

Se realizó tras 4 semanas de consumo de DHA. Esta prueba se realizó siguiendo la misma metodología que la segunda prueba, y las determinaciones de las distintas variables fueron exactamente iguales que la segunda prueba de esfuerzo. Previo a esta prueba se recordó al sujeto el desayuno que había ingerido el día de la prueba 1 con la finalidad de que el día de esta prueba consumiese los mismos alimentos.

3.6 VARIABLES A ESTUDIO

3.6.1 Variables sociodemográficas

La edad y los datos referidos al número de horas semanales de actividad física en general, y ciclismo en particular, de los sujetos a estudio fueron obtenidos mediante un cuestionario.

3.6.2 Variables de la prueba basal

Los parámetros evaluados durante la realización de esta prueba fueron:

1. Variables ergoespirométricas analizadas al final de la prueba (estado maximal):
 - VO_{2max} absoluto y relativo: máximo VO_2 medido en ml/min o ml/min·kg detectado en la prueba o valor máximo de dicha variable a partir del cual no se produce incremento del mismo aunque se incremente la intensidad del esfuerzo^{259,260}. El VO_{2max} proporciona información importante de la capacidad del sistema energético a largo plazo, y como tal, es uno de los factores más importantes que determinan la capacidad del individuo para mantener un ejercicio prolongado. Muchos estudios han identificado el VO_{2max} como un importante determinante del éxito en deportes de resistencia, siendo el parámetro fisiológico más utilizado para evaluar la capacidad

de resistencia en ciclistas, corredores, remeros o esquiadores de fondo. Aunque las correlaciones con atletas de élite son relativamente pequeñas, algunas investigaciones todavía sugieren que este parámetro es un determinante fiable de la capacidad de rendimiento en los esquiadores de fondo de élite²⁶¹.

2. Variables ergoespirométricas analizadas en el UV2. El metabolismo aeróbico exige un adecuado aporte de O_2 para la síntesis de ATP a partir de adenosín monofosfato. Cuando el aporte de O_2 no es suficiente para atender el aumento de la demanda, se estimula la glucólisis anaerobia (incremento de ácido láctico y disminución de pH)²⁶². El exceso de H^+ se tamponan con el sistema bicarbonato. El incremento en la producción de CO_2 produce un aumento no lineal de la ventilación, del volumen espiratorio por minuto y del volumen de CO_2 espirado por minuto (VCO_2)^{263,264}. La situación metabólica de aumento exponencial del ácido láctico, la disminución de pH, el aumento del volumen espirado por minuto y del VCO_2 por encima del incremento lineal permite sostener el concepto de una zona de transición metabólica que se ha llamado de forma diferente a lo largo de los años²⁶⁵ y que se conoce de forma genérica como umbral anaeróbico.

En 1980, se propuso un modelo trifásico que describe la transición del metabolismo aeróbico al anaeróbico durante los ejercicios incrementales (Figura 25 y 26)²⁶⁶. Los cambios ventilatorios que ocurren durante un ejercicio incremental son:

- Umbral ventilatorio 1 (UV1). Primer aumento no lineal de la ventilación, también evaluado como un aumento del equivalente respiratorio de O_2 (VE/VO_2), sin un aumento concomitante del equivalente respiratorio de CO_2 (VE/VCO_2).
- UV2. Segundo aumento no lineal de la ventilación que coincide con un incremento del VE/VCO_2 .

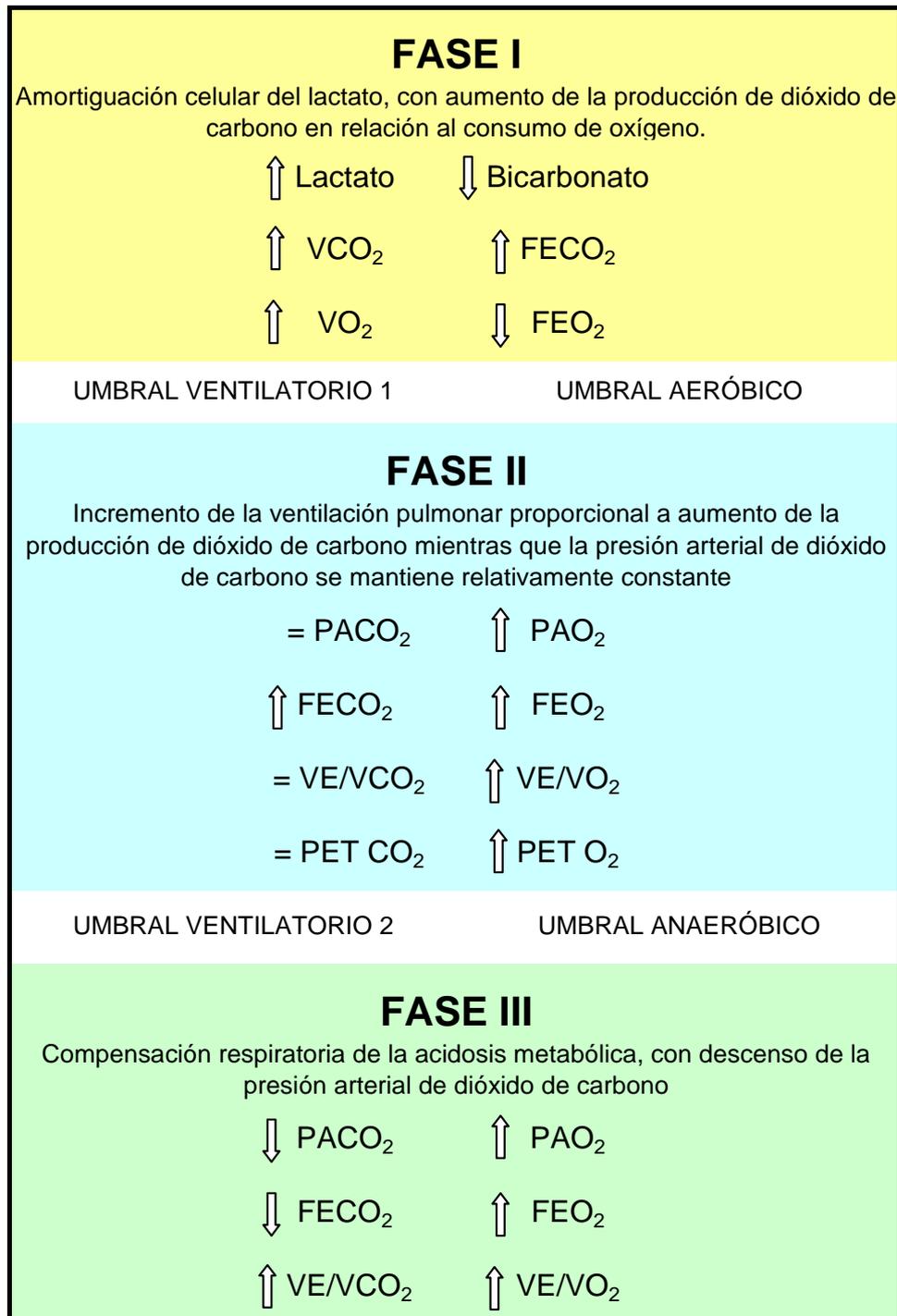


Figura 25. Modelo de cambios en el intercambio de gases durante la realización de una prueba de esfuerzo incremental²⁶⁶.

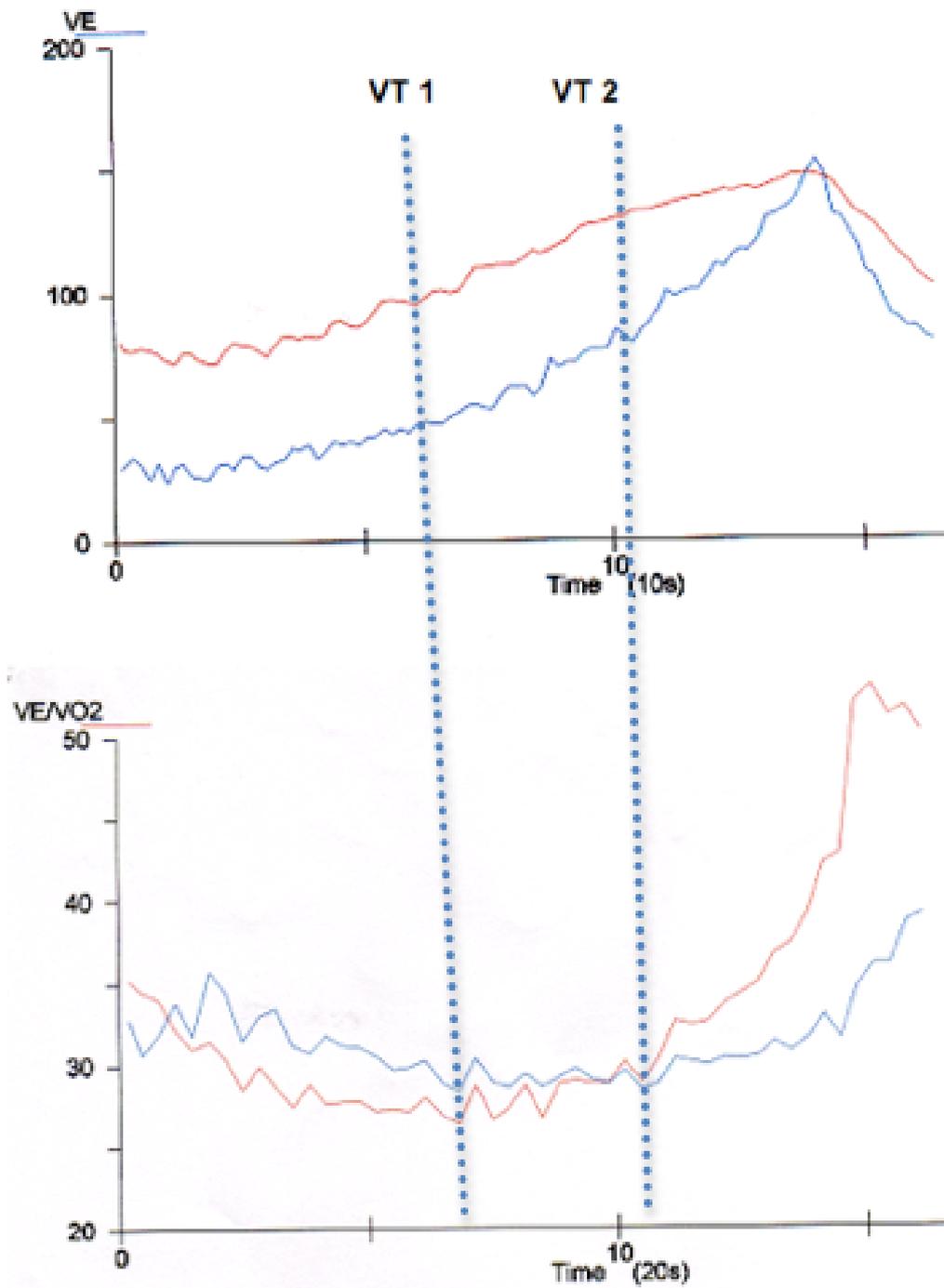


Figura 26. Cálculo de los umbrales ventilatorios según modelo de Skinner y McLellan²⁶⁶.

Las variables ergoespirométricas estudiadas en el UV2 fueron:

- VO_2 . El VO_{2max} es una variable poco sensible para detectar cambios en la capacidad de resistencia en sujetos de alto nivel o con un amplio historial de entrenamiento²⁶⁷. La mayoría de autores reconocen que el VO_2 o la intensidad de esfuerzo en el umbral anaeróbico es el factor con mayor valor predictivo de la marca en competiciones de resistencia. El entrenamiento puede mejorar los valores de VO_{2max} ya que ésta comporta un incremento de la capacidad de resistencia. Sin embargo, esta mejora es significativa en sujetos no entrenados sometidos a un programa de ejercicios aeróbicos y no lo es en sujetos o deportistas activos. Por tanto, las variables ergoespirométricas correspondientes al UV2 son las más sensibles a cambios derivados del entrenamiento de resistencia aeróbica por lo que son ampliamente utilizadas en la valoración funcional del deportista²⁶¹.

3.6.3 Evaluación nutricional

El análisis de la alimentación de los sujetos a estudio fue realizado mediante un método retrospectivo de encuesta nutricional "Recuento 24 horas". Los datos se recogieron durante un periodo de 3 días (2 laborables y uno no laborable) (Anexo 5). En esta encuesta se reflejó la ingesta total cualitativa y cuantitativa de los alimentos ingeridos. Para obtener una descripción adecuada de los alimentos y bebidas consumidas se entregó junto con la encuesta nutricional un guión con las pautas a seguir para rellenarla correctamente (Anexo 6).

Una vez completadas, las encuestas fueron recogidas, revisadas y valoradas mediante el programa informático AyD versión 4.5, obteniendo así una clara muestra de la alimentación habitual de cada sujeto. Las variables nutricionales analizadas fueron: consumo energético (kcal), g de glúcidos, proteínas y lípidos, y mg de vitamina C, E y Zn. Con respecto a los lípidos se realizó análisis específico del consumo en g de AGS, AGMI y AGPI. Por último, dentro de los AGPI se determinaron los g de AGPI n-6 y n-3.

3.6.4 Condiciones de laboratorio durante las pruebas de esfuerzo

Se analizaron las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa al inicio de cada prueba de esfuerzo realizada en el laboratorio.

3.6.5 Hidratación durante las pruebas de esfuerzo

Los parámetros empleados para evaluar la hidratación intraprueba fueron:

- Peso corporal de los sujetos: se pesó al sujeto inmediatamente antes y después de la prueba de esfuerzo; para ello se colocó al sujeto en el centro de la báscula en posición antropométrica y de espaldas al registro de la medida, sin que el cuerpo estuviese en contacto con nada que tuviera a su alrededor.
- Consumo de agua. Al inicio de la prueba se le suministró al sujeto un bidón con 500 ml de agua mineral sin gas medida con probeta graduada al ml. Cuando el sujeto ingería la totalidad de la bebida se le volvía a suministrar otro bidón con la misma cantidad de agua y medida de igual modo; el sujeto recibió tantos bidones completos de agua como solicitó. Al finalizar la prueba se contabilizaron los bidones suministrados restándole el agua que quedaba en el último bidón tras medirla con probeta graduada.

3.6.6 Análisis del perfil de ácidos grasos en membrana eritrocitaria

El perfil de AG en la membrana de eritrocitos fue analizado de la siguiente forma: la fase celular (eritrocitos) obtenida por centrifugación de los tubos con EDTA se lavó con suero salino isotónico y se purgó con N₂ gaseoso para su conservación a -80 °C hasta su posterior análisis. Los lípidos eritrocitarios se extrajeron utilizando el método de Bligh y Dyer²⁶⁸ y los AG fueron metilados por el procedimiento del fluoruro de boro/metanol de Morrison y Smith²⁶⁹. Los esterres metílicos de los AG se analizaron por cromatografía de gases con columna capilar con detector de llama ionizada²⁷⁰. Este estudio se realizó en la sangre obtenida previamente a las pruebas de esfuerzo.

Los AG analizados fueron:

- AGS: análisis global.
- AGMI: análisis global.
- AGPI n-6: análisis específico de ARA.
- AGPI n-3: análisis específico de EPA, DPA y DHA.

3.6.7 Capacidad antioxidante del ácido graso docosaheptaenoico

La capacidad antioxidante del DHA se evaluó mediante técnica de inmunoabsorción enzimática (ELISA) de la 8-OHdG excretada en la orina, en relación al peso del sujeto.

Aunque se han identificado más de 20 lesiones de bases del ADN distintas, solamente una pequeña cantidad de ellas han sido estudiadas y la 8-OHdG es la más ampliamente considerada²⁷¹. La 8-OHdG aparece en el ADN como consecuencia del ataque por RL y puede ser extraída por enzimas reparadoras (8-oxoguanina glicosilasa y endonucleasa apurínica). Si no se produce dicha reparación, durante la replicación del ADN se inducirá un cambio de base (guanina por timina). La 8-OHdG escindida es, entonces, excretada por la orina²⁷². No obstante, no toda la 8-OHdG excretada en orina proviene del daño oxidativo al ADN y su posterior reparación, sino que existen otros factores que pueden modificar dicha excreción como la dieta y la muerte celular. En ausencia de estos factores de confusión, la medida urinaria de este metabolito debe ser atribuida enteramente a la reparación del ADN dañado²⁷³, por lo que se considera la 8-OHdG como un buen indicador de daño oxidativo al ADN.

Con respecto a la técnica empleada, las muestras urinarias se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se usó para medir la 8-OHdG con un Kit de ELISA llamado 8-OH-dG Check (Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Japan). La especificidad del anticuerpo monoclonal N45.1 que se usa en este kit fue confirmada en estudios previos^{274,275}. El diagrama de la metodología para el ELISA²⁷⁶ se muestra en la figura 27.

Todas las muestras se procesaron por duplicado y se aceptaron los valores que presentaban un coeficiente de variación intraensayo menor del 15%.

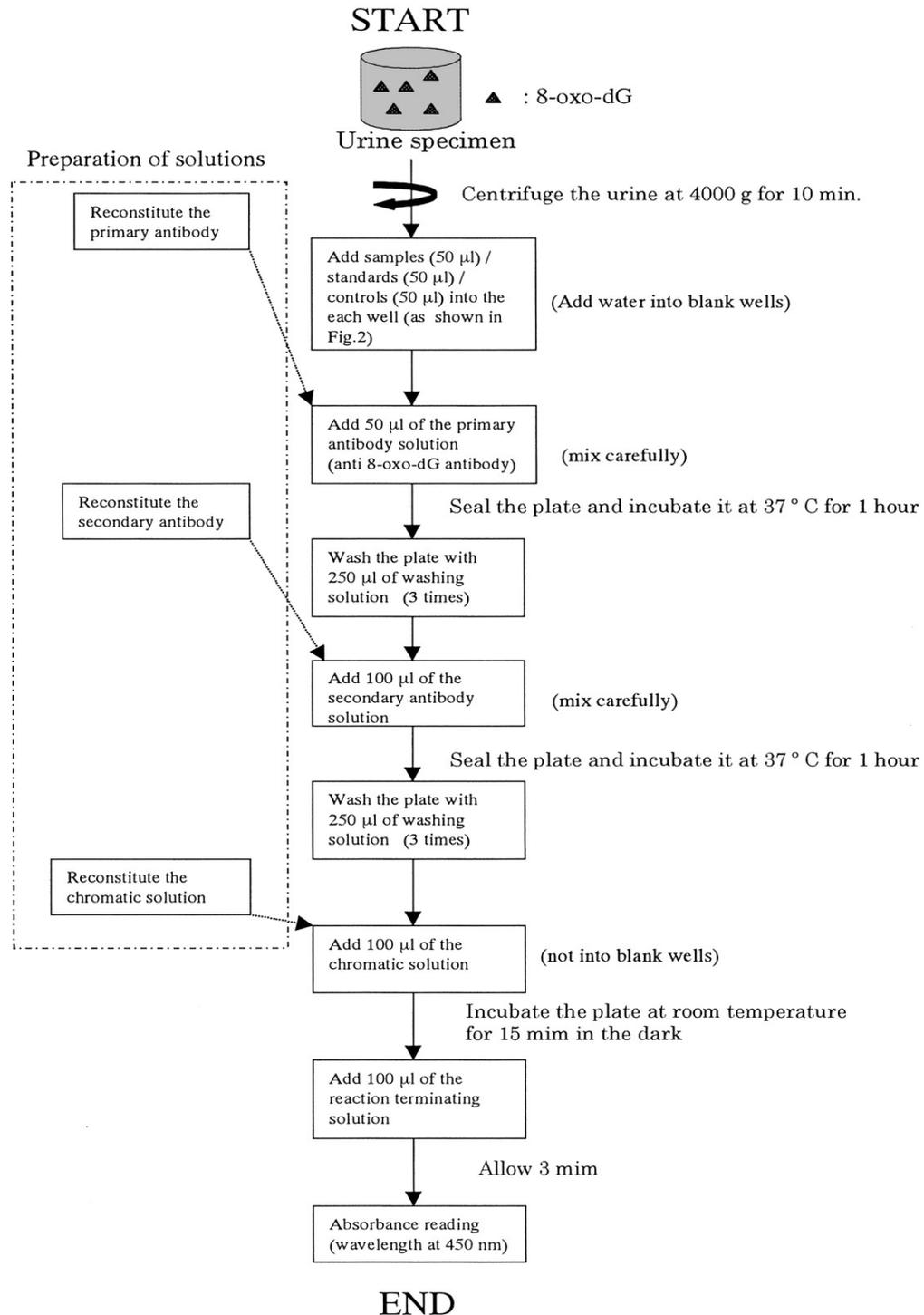


Figura 27. Diagrama de metodología de la técnica de inmunoabsorbancia enzimática²⁷⁶.

3.6.8 Variables hematológicas y bioquímicas de sangre venosa

Los parámetros sanguíneos fueron:

- Variables hematológicas (hemograma): realizado mediante analizador hematológico Horiba ABX Pentra 80 que utiliza citometría de flujo para cuantificar las distintas variables. Los parámetros estudiados fueron:
 - Número de eritrocitos.
 - Concentración de hemoglobina.
 - Hematocrito.
 - Volumen corpuscular medio.
 - Hemoglobina corpuscular media.
 - Número de leucocitos totales.
 - Número de plaquetas.
- Variables bioquímicas: realizado mediante analizador de química clínica ILAB 600 (Instrumentation Laboratory). Los parámetros estudiados fueron:
 - Glucemia.
 - Ferritina.
 - Creatinina.
 - Ácido úrico.
 - Aspartatoamino transferasa (GPT).
 - Alaninoamino transferasa (GOT).
 - *Gamma* glutamil transpeptidasa (GGT).
 - Lactato deshidrogenasa (LDH).
 - Creatina fosfoquinasa (CPK).
 - Sodio.
 - Potasio.
 - CT total.

- CT-HDL.
- CT-LDL.
- TAG.

3.7 MATERIAL. APARATOS E INSTRUMENTACIÓN

- Rodillo de bicicleta con resistencia electromagnética Technogym Spin trainer.
- Rodillo de bicicleta con resistencia electromagnética Tacx Flow T1684.
- Analizador de gases respiratorios Sensormedics MVmax 29C.
- Analizador hematológico Horiba ABX Pentra 80.
- Analizador de química clínica ILAB 600.
- Analizador portátil de lactato sanguíneo YSI Sport 1500L.
- Espectrofotómetro de placas Biotek Synergy MT.
- Espectrofotómetro marca VARIAN modelo CARY 50 BIO.
- Equipo para cromatografía de gases marca Shimadzu GC-MS.
- Báscula marca SECA.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente se realizó análisis descriptivo de todas las variables en estudio, tanto de las condiciones basales de cada una de ellas como de su evolución. Este análisis se realizó para cada uno de los grupos.

Las variables cuantitativas se han descrito mediante la media y la desviación estándar.

Las variables cualitativas se han presentado en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas, tanto para los grupos formados, como para la muestra global.

Para realizar análisis inferencial de la capacidad antioxidante del DHA y variables hematológicas y bioquímicas sanguíneas se ha realizado ANOVA para medidas repetidas con tres factores a estudio: dos factores intrasujeto (prueba:

prueba 1 (prueba previa al consumo de producto), prueba 2 (prueba posterior al consumo del producto); tiempo: antes de la prueba, después de la prueba)) y un factor intersujeto (dosis: placebo, 350 mg, 1050 mg, 1750 mg y 2450 mg).

Para realizar análisis inferencial del análisis de AG en membrana de eritrocitos, hidratación durante las pruebas de esfuerzo y condiciones de laboratorio durante las pruebas de esfuerzo se ha realizado ANOVA para medidas repetidas con dos factores a estudio: un factor intrasujeto (prueba: prueba 1 (prueba previa al consumo de producto), prueba 2 (prueba posterior al consumo del producto)) y un factor intersujeto (dosis: placebo, 350 mg, 1050 mg, 1750 mg y 2450 mg).

Para realizar análisis inferencial de las variables obtenidas en la evaluación nutricional se ha realizado ANOVA de un factor (dosis: placebo, 350 mg, 1050 mg, 1750 mg y 2450 mg).

Para el análisis de pares se ha realizado test de Bonferroni.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado será de 0,05.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v 21.0.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 54 sujetos que cumplieron los criterios de selección del estudio. La distribución de los sujetos en función del grupo de tratamiento fue la siguiente: 13 sujetos (placebo), 10 sujetos (350 mg/d de DHA), 11 sujetos (1050 mg/d de DHA), 12 sujetos (1750 mg/d de DHA) y 8 sujetos (2450 mg/d de DHA).

4.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

4.1.1 Edad

La edad media (DE) de la población de estudio fue de 38,6 (9,8) años, observándose un amplio rango de edades de la muestra analizada (20-60 años), lo que permite extrapolar los resultados a la inmensa mayoría de la población adulta (Figura 28).

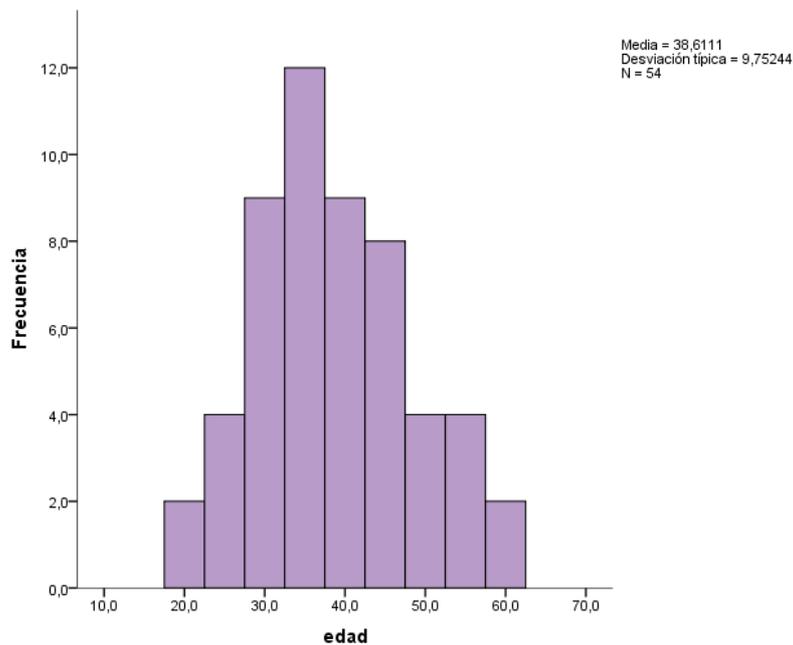


Figura 28. Distribución de la muestra por edad (años).

La edad media de los sujetos en función del grupo de tratamiento fue similar en los distintos grupos de estudio, oscilando entre 38,4 y 40,9 años, por lo que se descarta esta variable como implicada en la modificación del daño oxidativo al ADN (Figura 29).

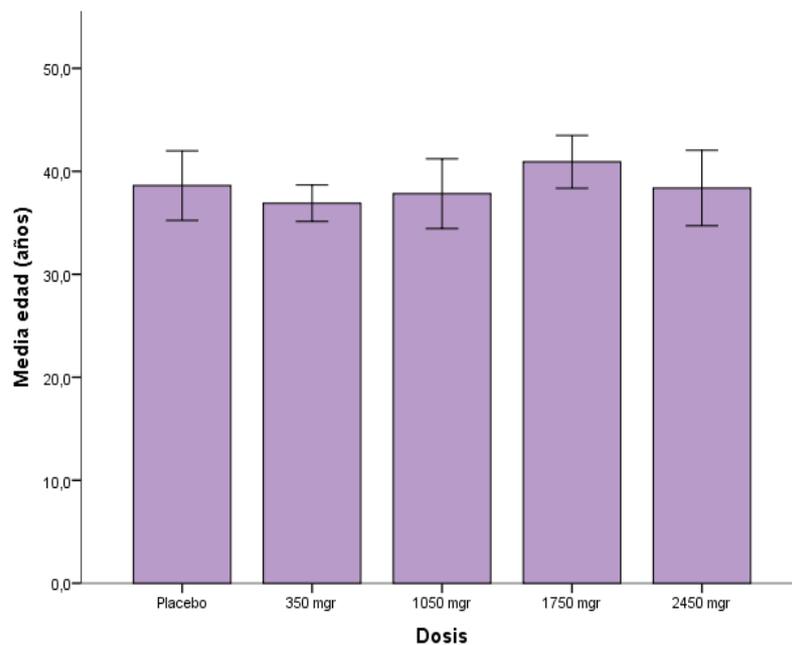


Figura 29. Edad media de los distintos grupos de estudio. Valores medios \pm EEM

4.1.2 Actividad física

Los diferentes grupos de estudio no mostraron diferencias significativas en el número medio de horas totales dedicadas al deporte ni en el número de horas dedicadas a ciclismo ($p=0,961$ y $p=0,518$, respectivamente) (Tabla 13).

Tabla 13. Tiempo (horas/semana) de dedicación a la actividad física en general y al ciclismo en particular para cada uno de los grupos de estudio.

Dosis		Total h/semana	Ciclismo h/semana
Placebo	Media	8,3	6,3
	DE	7,3	3,8
350 mg	Media	9,7	8,5
	DE	2,0	2,5
1050 mg	Media	9,1	6,9
	DE	2,7	2,2
1750 mg	Media	9,2	8,5
	DE	5,1	5,3
2450 mg	Media	9,6	8,0
	DE	3,5	3,9
Total	Media	9,1	7,6
	DE	4,6	3,7

4.2 VARIABLES DE LA PRUEBA BASAL

4.2.1 Consumo de oxígeno

Al realizar comparaciones del VO_{2max} relativo al peso como del VO_2 en el UV2 relativo al peso entre los grupos de estudio no se observaron diferencias significativas ($p=0,536$ para VO_{2max} relativo; $p=0,846$ para UV2 relativo), por lo que se descarta que el estado deportivo de los sujetos (VO_2) haya influido en el estado antioxidativo generado tras la ingesta de DHA (Tabla 14).

Tabla 14. Consumo máximo/pico de oxígeno relativo al peso y consumo de oxígeno en el umbral ventilatorio 2 relativo al peso para cada uno de los grupos de estudio.

Dosis		VO _{2max} ml/min·kg	VO ₂ en UV2 ml/min·kg
Placebo	Media	45,1	34,2
	DE	5,6	5,2
350 mg	Media	48,2	36,2
	DE	5,2	4,8
1050	Media	45,0	34,9
	DE	5,7	5,7
1750	Media	47,2	35,9
	DE	9,7	6,2
2450	Media	43,1	36,4
	DE	6,9	5,1
Total	Media	45,8	35,4
	DE	6,8	5,3

4.3 CONDICIONES DE LABORATORIO DURANTE LAS PRUEBAS DE ESFUERZO

Se valoró la temperatura y humedad relativa como indicadores de las condiciones ambientales en las pruebas de esfuerzo (antes y después del consumo de DHA). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambas pruebas en el tiempo ($p=0,985$ para la humedad y $p=0,265$ para la temperatura) lo que muestra que los sujetos realizaron ambas pruebas de esfuerzo en las mismas condiciones ambientales. Asimismo, tampoco se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio ($p=0,967$ para la humedad y $p=0,863$ para la temperatura) (Tabla 15). Por tanto, las condiciones ambientales son homogéneas en el tiempo y en los grupos, con lo que estas variables no influirán en la valoración del daño oxidativo.

Tabla 15. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) del laboratorio durante la realización de cada una de las pruebas de esfuerzo por los distintos grupos de estudio.

Dosis	Prueba		Humedad relativa	Temperatura
			%	°C
Placebo	Prueba 1	Media	48,7	20,9
		DE	5,7	1,1
	Prueba 2	Media	51,5	20,6
		DE	11,2	1,0
350 mg	Prueba 1	Media	52,1	20,7
		DE	6,4	1,8
	Prueba 2	Media	49,2	21,3
		DE	13,8	0,8
1050 mg	Prueba 1	Media	50,3	20,8
		DE	7,8	1,1
	Prueba 2	Media	53,6	21,3
		DE	11,3	0,8
1750 mg	Prueba 1	Media	52,2	20,4
		DE	6,1	1,7
	Prueba 2	Media	51,5	21,0
		DE	15,3	0,4
2450 mg	Prueba 1	Media	52,5	20,9
		DE	6,9	1,5
	Prueba 2	Media	50,1	20,8
		DE	13,0	1,0

4.4 HIDRATACIÓN DURANTE LAS PRUEBAS DE ESFUERZO

No se apreciaron diferencias significativas en el consumo hídrico por parte del sujeto durante la realización de las 2 pruebas de esfuerzo ($p=0,454$), pero sí se observaron diferencias significativas en función de la dosis ($p<0,018$) (Tabla 16), es decir, los individuos que ingirieron la dosis de 1750 mg consumieron más agua que los que ingirieron dosis de 2450 mg.

Tabla 16. Consumo de agua (ml) de los sujetos en cada de las pruebas de esfuerzo realizadas por los distintos grupos de estudio.

Dosis	Prueba		Consumo de agua ml
Placebo	Prueba 1	Media	1043,8
		DE	756,5
	Prueba 2	Media	948,1
		DE	599,5
350 mg	Prueba 1	Media	590,0
		DE	307,1
	Prueba 2	Media	791,0
		DE	535,4
1050 mg	Prueba 1	Media	601,8
		DE	358,7
	Prueba 2	Media	680,0
		DE	417,4
1750 mg	Prueba 1	Media	967,1
		DE	550,2
	Prueba 2	Media	1214,2
		DE	642,5
2450 mg	Prueba 1	Media	568,8
		DE	243,4
	Prueba 2	Media	400,0
		DE	181,3

Asimismo, durante la realización de las pruebas de esfuerzo se observa que los sujetos sufrieron una pérdida de peso consecuencia de la sudoración y del bajo consumo de agua durante la misma ($p < 0,001$). Esta pérdida de peso fue estadísticamente significativa para todos los grupos ($p < 0,002$) y se observó en las 2 pruebas, con una disminución media del peso corporal del 0,9% (Figura 30).

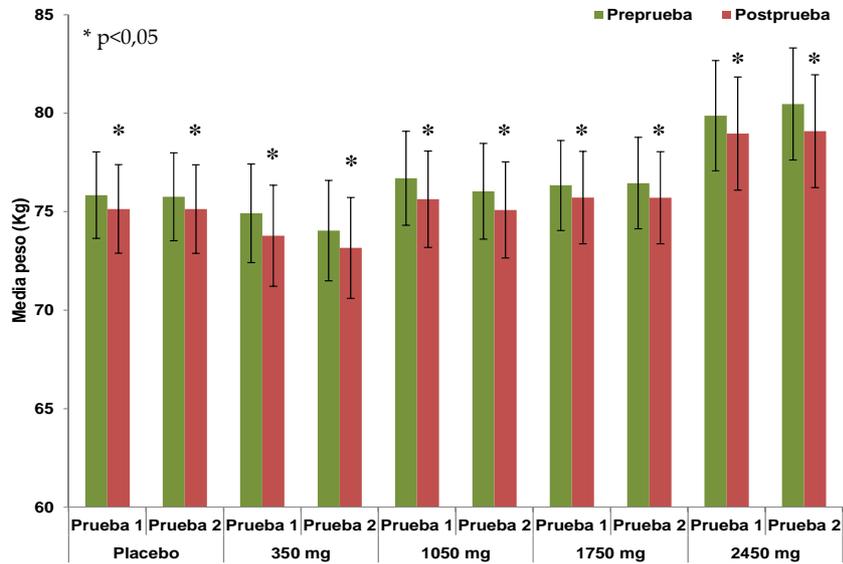


Figura 30. Peso (kg) de los sujetos de cada grupo de estudio antes y después de cada una de las pruebas. Valores medios \pm EEM

4.5 EVALUACIÓN NUTRICIONAL

No se aprecian diferencias en el consumo de energía y macronutrientes (glúcidos, lípidos y sus fracciones y proteínas) (Tabla 17a), micronutrientes antioxidantes (vitamina C, E y Zn) (Tabla 17b) y fracciones de lípidos (Tabla 18) al comparar los distintos grupos entre sí ($p > 0,05$, en todos los casos). A pesar de que en el consumo de AGPI n-3 se aprecian pequeñas diferencias entre grupos (Figura 31), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,142$). Por tanto, inicialmente, el consumo de antioxidantes dietéticos y de AGPI n-3 fue similar en todos los grupos de estudio, lo que sugiere que su influencia sobre el estudio es mínima.

Tabla 17a. Evaluación nutricional: consumo de calorías, glúcidos, lípidos y proteínas.

Dosis		Energía kcal/d	Glúcidos g/d	Lípidos g/d	Proteínas g/d
Placebo	Media	2512,1	278,4	109,7	102,1
	DE	685,4	70,0	43,4	28,4
350 mg	Media	2301,6	228,4	110,5	98,5
	DE	627,2	47,9	50,5	25,3
1050 mg	Media	2646,0	299,6	112,8	108,2
	DE	837,5	80,5	64,4	19,4
1750 mg	Media	2731,4	281,4	132,7	102,8
	DE	916,2	93,3	62,0	30,4
2450 mg	Media	2484,1	294,4	100,8	99,8
	DE	355,7	35,0	27,1	22,4

Tabla 17b. Evaluación nutricional: algunos micronutrientes con capacidad antioxidante.

Dosis		Vitamina C mg/d	Vitamina E mg/d	Zinc mg/d
Placebo	Media	513,3	8,1	8,1
	DE	490,3	11,4	10,9
350 mg	Media	395,7	6,4	10,5
	DE	549,8	6,4	7,9
1050 mg	Media	336,1	3,0	5,5
	DE	203,6	3,5	6,3
1750 mg	Media	462,9	7,2	10,8
	DE	464,2	11,5	8,8
2450 mg	Media	392,1	7,5	9,5
	DE	394,8	5,5	7,5

Tabla 18. Evaluación nutricional: consumo de los distintos tipos de ácidos grasos según los grupo de estudio.

Dosis		AGS	AGMI	AGPI	n-6	n-3	n-6/n-3
		g	g	g	g	g	g
Placebo	Media	31,7	47,5	15,5	4,1	1,1	8,7
	DE	14,4	16,1	9,3	2,0	1,1	7,6
350 mg	Media	41,7	48,4	18,6	5,8	1,0	10,4
	DE	27,6	19,8	18,7	3,5	1,1	5,5
1050	Media	29,9	45,2	14,2	4,5	1,4	9,9
	DE	8,8	18,1	9,1	3,4	1,4	10,2
1750	Media	35,5	52,7	15,9	3,6	1,8	5,0
	DE	23,9	22,8	7,0	1,9	1,3	6,2
2450	Media	32,6	43,5	11,8	3,1	0,4	10,0
	DE	8,8	13,5	3,8	0,8	0,4	7,1

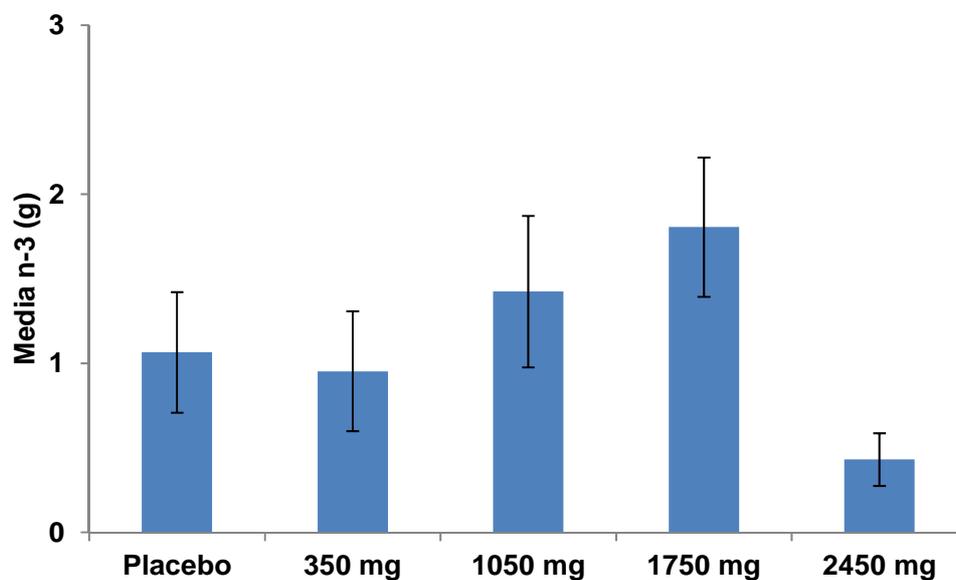


Figura 31. Consumo de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en los distintos grupos de estudio. Valores medios \pm EEM.

4.6 ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRADOS EN MEMBRANA ERITROCITARIA

Se realizó el análisis del perfil de AG de la membrana del eritrocito en la sangre extraída antes de ambas pruebas de esfuerzo con intensidad constante al 70% del $\text{VO}_{2\text{max}}$ del sujeto (condiciones basales en tiempos anterior y posterior a las 4 semanas de consumo de DHA). Los resultados de dichos análisis se recogen en la Tabla 19, 20, 21 y 22.

Al realizar el análisis comparativo observamos:

- No se aprecian cambios significativos en la cantidad relativa de AGS y AGPI tras el consumo durante 4 semanas de DHA ($p=0,145$ y $p=0,590$, respectivamente). Esto se cumple en todos los grupos de estudio y por tanto tampoco existen diferencias entre grupos (Figura 32 y 33). En relación con los AGMI sí se aprecian diferencias significativas según grupo de estudio ($p<0,001$). Concretamente, el grupo que consumió placebo experimenta un incremento no significativo de AGMI ($p=0,399$) mientras que aquellos grupos que consumieron distintas dosis de DHA experimentan un descenso de este tipo de AG en la membrana del eritrocito que se hace significativo para los grupos que consumieron 350, 1050 y 1750 mg/d ($p<0,019$, $p<0,035$ y $p<0,003$, respectivamente) (Figura 34).

Tabla 19. Frecuencia relativa de los distintos tipos de ácidos grasos que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.

Dosis	Prueba		AGS	AGMI	AGPI
			%	%	%
Placebo	Preprueba	Media	35,8	19,1	32,2
		DE	0,8	1,6	1,4
	Preprueba	Media	35,5	19,4	32,4
		DE	1,0	2,4	2,0
350 mg	Preprueba	Media	35,3	18,9	32,3
		DE	0,8	1,8	1,2
	Preprueba	Media	35,0	17,9	32,3
		DE	0,8	1,1	3,8
1050 mg	Preprueba	Media	35,9	19,3	32,1
		DE	0,7	1,5	1,3
	Preprueba	Media	35,6	18,5	32,0
		DE	1,6	1,2	1,5
1750 mg	Preprueba	Media	35,9	19,5	32,3
		DE	1,2	1,7	1,2
	Preprueba	Media	35,8	18,4	32,5
		DE	1,2	1,7	1,4
2450 mg	Preprueba	Media	35,3	18,4	32,9
		DE	1,3	1,1	1,1
	Preprueba	Media	34,9	17,6	33,3
		DE	1,3	1,1	1,4

Tabla 20. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados n-3, n-6 y el cociente n-6/n-3 en la membrana del eritrocito, evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.

Dosis	Prueba		n-3 g	n-6 g	n-6/n-3
Placebo	Preprueba 1	Media	5,6	26,7	4,9
		DE	0,9	1,1	0,8
	Preprueba 2	Media	5,6	27,0	5,0
		DE	1,1	1,3	1,0
350 mg	Preprueba 1	Media	5,9	26,4	4,8
		DE	1,6	1,5	1,4
	Preprueba 2	Media	6,7	25,7	4,0
		DE	1,6	3,3	1,0
1050	Preprueba 1	Media	5,8	26,4	5,0
		DE	1,8	2,6	1,7
	Preprueba 2	Media	6,6	25,4	4,2
		DE	1,9	2,3	1,4
1750	Preprueba 1	Media	5,4	26,9	5,4
		DE	1,2	1,3	1,8
	Preprueba 2	Media	6,6	25,9	4,0
		DE	1,0	1,4	0,9
2450	Preprueba 1	Media	6,2	26,7	4,7
		DE	1,5	1,5	2,1
	Preprueba 2	Media	7,7	25,7	3,5
		DE	1,2	1,5	0,9

Tabla 21. Frecuencia relativa de los ácidos docosahexaenoico, eicosapentaenoico, docosapentaenoico y araquidónico en la membrana del eritrocito, evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.

Dosis	Prueba		DHA	EPA	DPA	ARA
			%	%	%	%
Placebo	Preprueba	Media	3,7	0,5	1,2	13,1
		DE	0,6	0,2	0,2	0,9
	Preprueba	Media	3,7	0,5	1,2	13,4
		DE	0,7	0,2	0,2	1,1
350 mg	Preprueba	Media	3,9	0,5	1,3	12,9
		DE	1,1	0,2	0,4	0,9
	Preprueba	Media	4,6	0,6	1,4	13,0
		DE	1,2	0,2	0,3	1,1
1050	Preprueba	Media	3,7	0,7	1,3	13,2
		DE	0,8	0,7	0,4	1,5
	Preprueba	Media	4,5	0,8	1,2	12,8
		DE	0,9	0,6	0,5	1,4
1750	Preprueba	Media	3,6	0,4	1,2	13,5
		DE	0,8	0,2	0,3	0,7
	Preprueba	Media	4,7	0,6	1,2	13,1
		DE	0,8	0,2	0,2	0,7
2450	Preprueba	Media	4,2	0,5	1,3	13,8
		DE	1,0	0,3	0,3	1,0
	Preprueba	Media	5,4	0,7	1,3	13,1
		DE	0,9	0,2	0,3	0,7

Tabla 22. Cociente ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico y cociente ácidos grasos saturados/ácido docosahexaenoico en la membrana del eritrocito, evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico.

Dosis	Prueba		ARA/DHA	AGS/DHA
Placebo	Preprueba	Media	3,6	9,8
		DE	0,5	1,5
	Preprueba	Media	3,7	9,8
		DE	0,7	1,5
350 mg	Preprueba	Media	3,5	9,6
		DE	0,9	2,6
	Preprueba	Media	3,0	8,1
		DE	0,9	2,2
1050 mg	Preprueba	Media	3,8	10,1
		DE	1,1	2,0
	Preprueba	Media	3,0	8,3
		DE	0,8	1,9
1750 mg	Preprueba	Media	4,0	10,7
		DE	1,4	3,6
	Preprueba	Media	2,9	7,8
		DE	0,6	1,6
2450 mg	Preprueba	Media	3,6	9,2
		DE	1,7	3,9
	Preprueba	Media	2,5	6,6
		DE	0,6	1,5

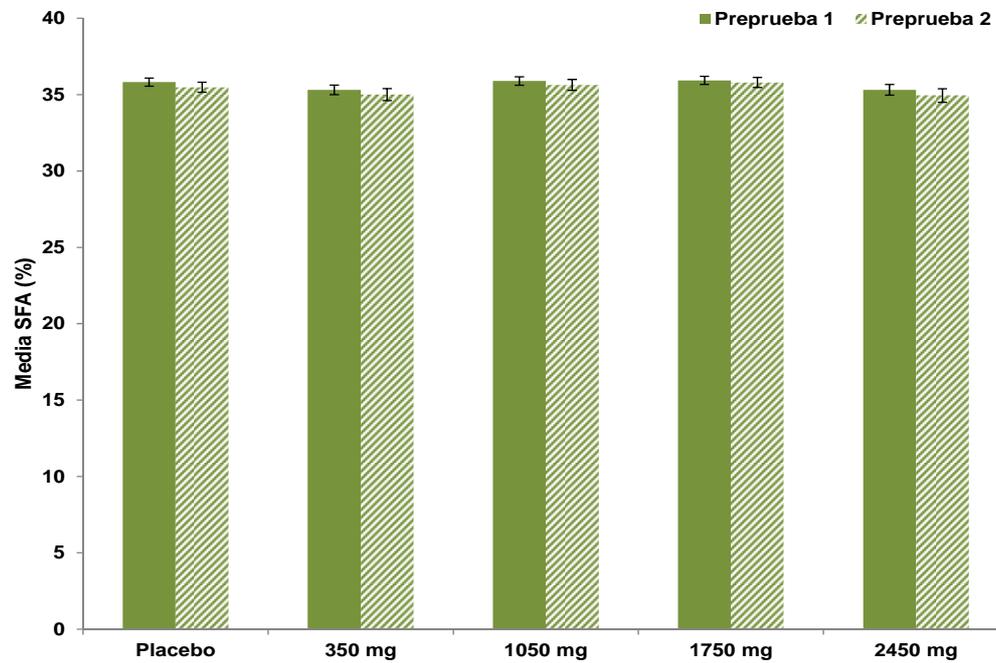


Figura 32. Frecuencia relativa de los ácidos grasos saturados que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

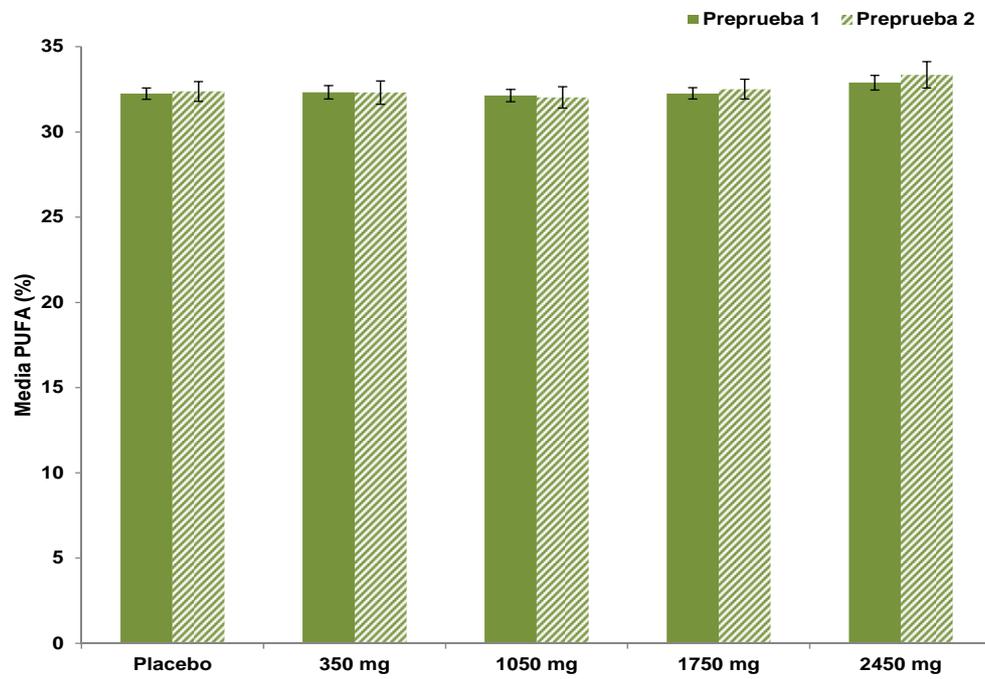


Figura 33. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

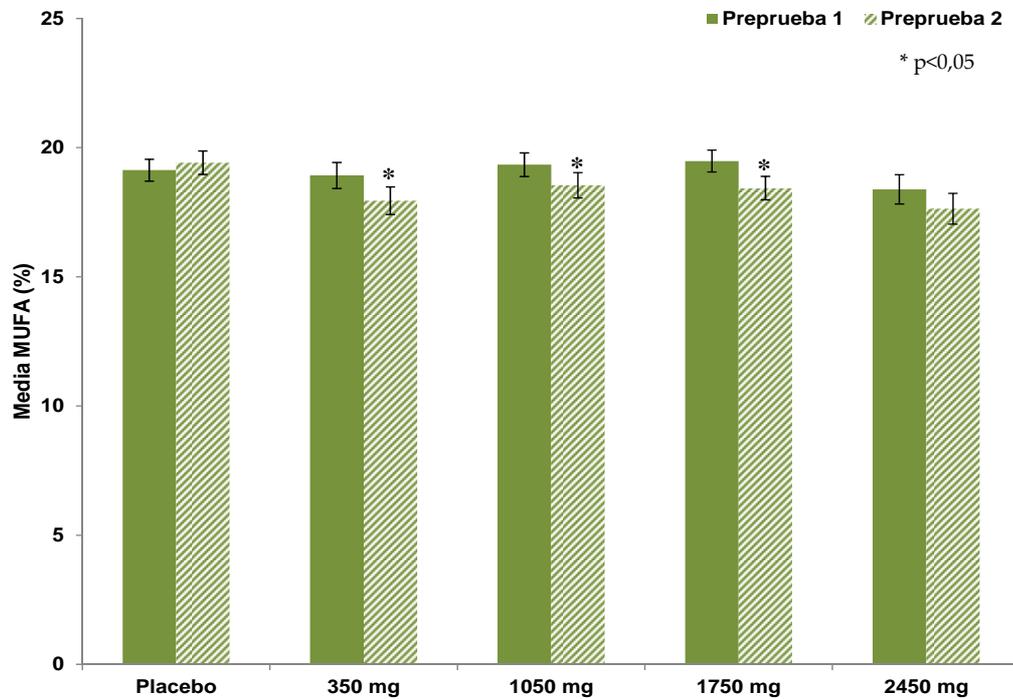


Figura 34. Frecuencia relativa de los ácidos grasos monoinsaturados que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

- Si consideramos los AGPI n-3 en su conjunto y analizamos su evolución en la membrana del eritrocito con el consumo de DHA, apreciamos un incremento significativo dosis-dependiente en la incorporación de estos n-3 a la membrana en todos los grupos con consumo de DHA (350 mg $p < 0,012$; 1050 mg $p < 0,004$; 1750 mg $p < 0,001$; 2450 mg $p < 0,001$) (Figura 35). En la Figura 36 se muestra el incremento dosis-dependiente.

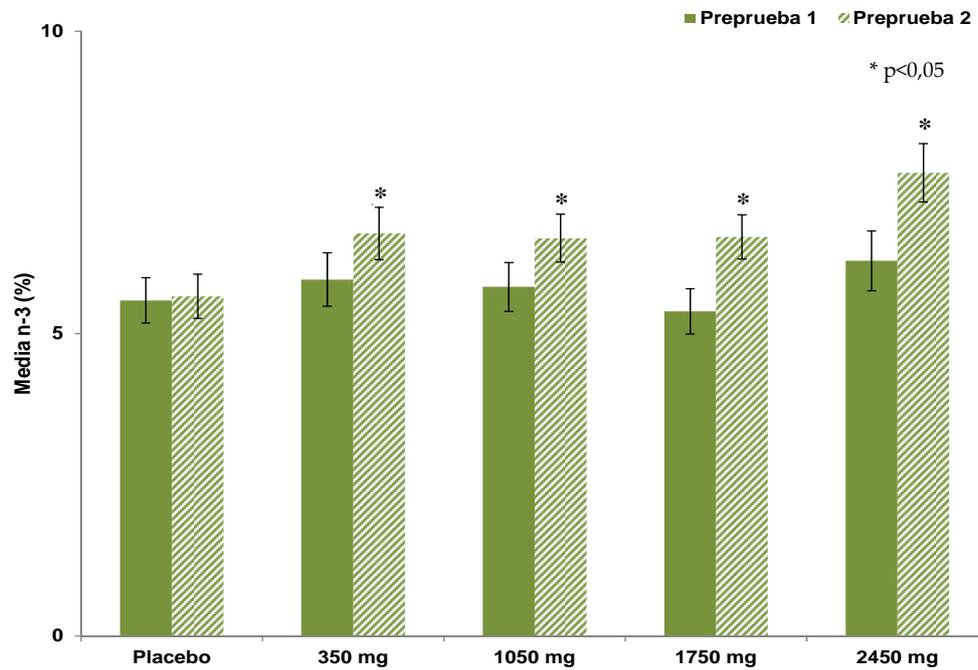


Figura 35. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

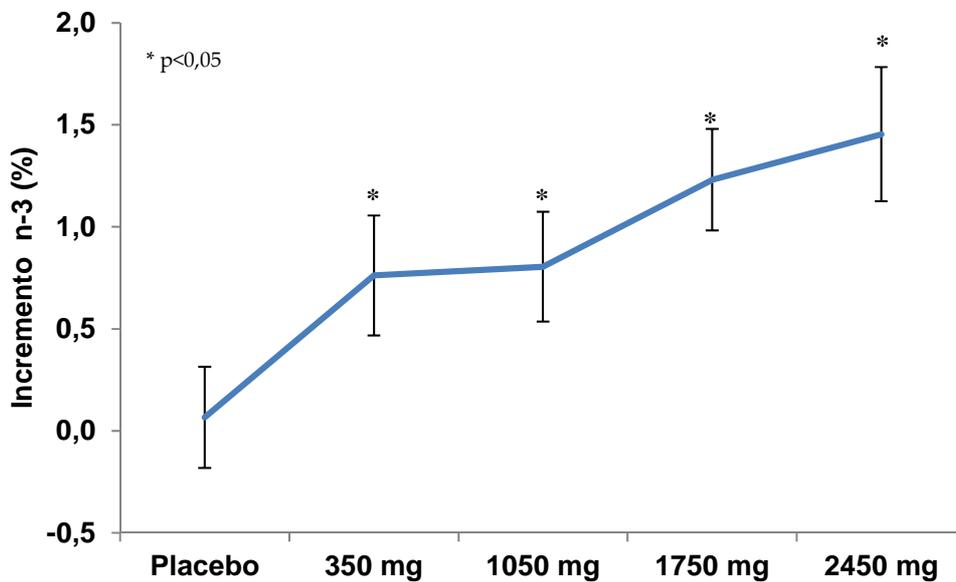


Figura 36. Incremento de ácidos grasos poliinsaturados n-3 que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio.

- Los AGPI n-6, por el contrario, experimentan un descenso tras el consumo de DHA, que es estadísticamente significativo en el grupo 1750 mg ($p < 0,028$) (Figura 37 y 38).

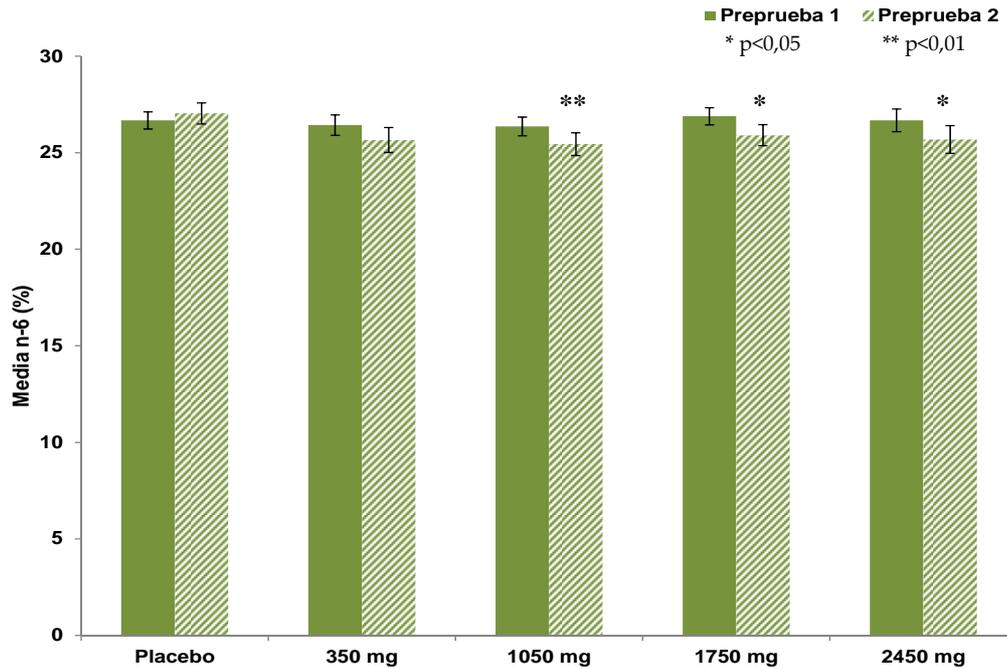


Figura 37. Frecuencia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados n-6 que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

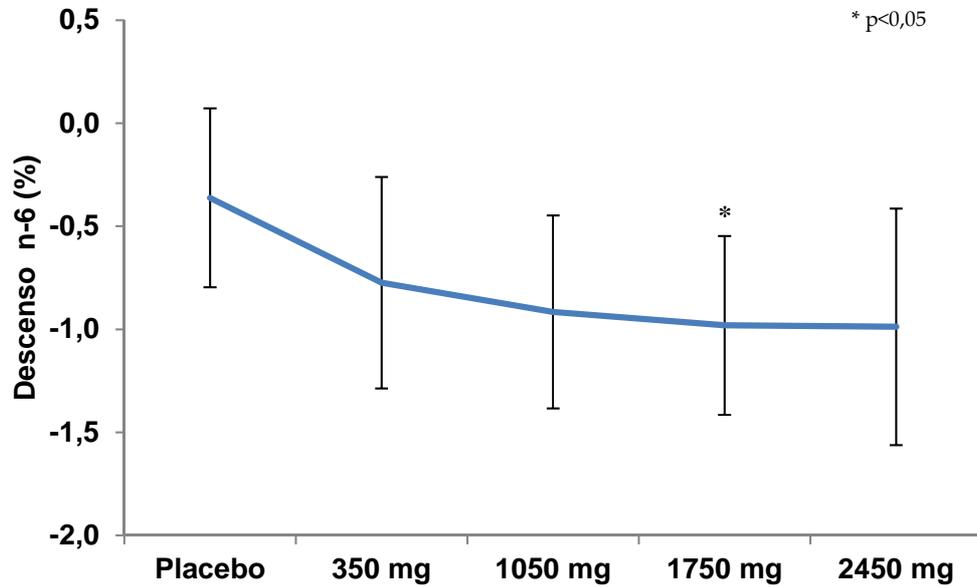


Figura 38. Descenso de ácidos grasos poliinsaturados n-6 que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio.

- Como consecuencia de estas variaciones, el cociente n-6/n-3 experimenta descensos significativos dosis-dependientes en los individuos que consumieron el producto de estudio (350 mg $p<0,018$; 1050 mg $p<0,009$; 1750 mg $p<0,001$; 2450 mg $p<0,001$) (Figura 39).

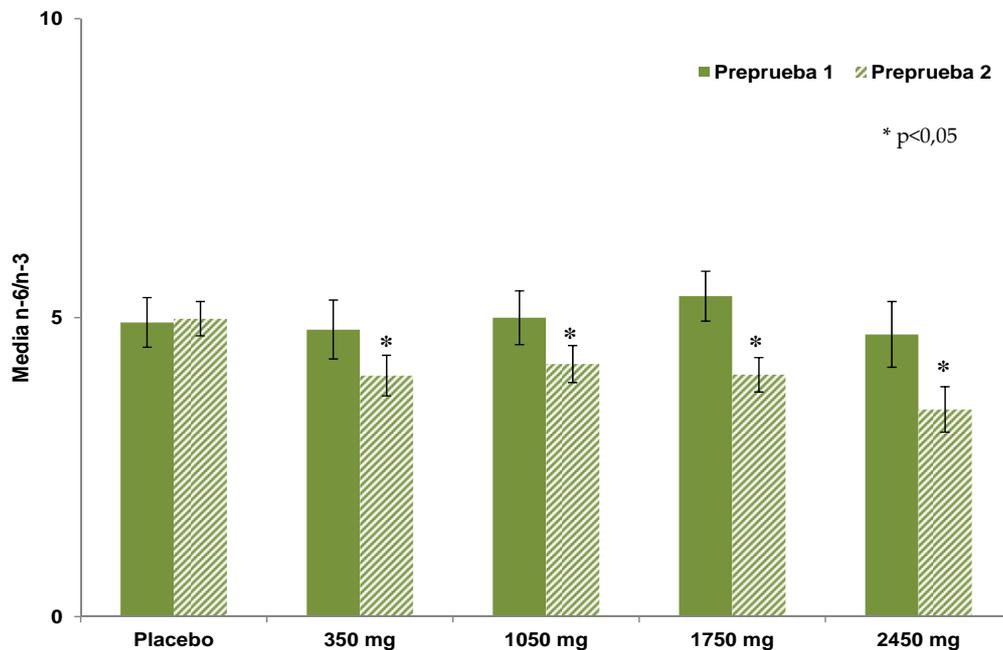


Figura 39. Cociente de las frecuencias relativas de los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3 que aparecen en la membrana del eritrocito evaluados antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

- Al valorar cada AGPI por separado se observan los siguientes cambios:
 - Incremento estadísticamente significativo del porcentaje de DHA en la membrana del eritrocito tras el consumo de DHA (350 mg $p < 0,001$; 1050 mg $p < 0,001$; 1750 mg $p < 0,001$; 2450 mg $p < 0,001$) (Figura 40). Este incremento es mayor en las dosis de ingesta del DHA más altas (350 mg 17,4% de aumento con respecto al % basal; 1050 mg 20,2%; 1750 mg 30,3%; 2450 mg 30,0%) (Figura 41).

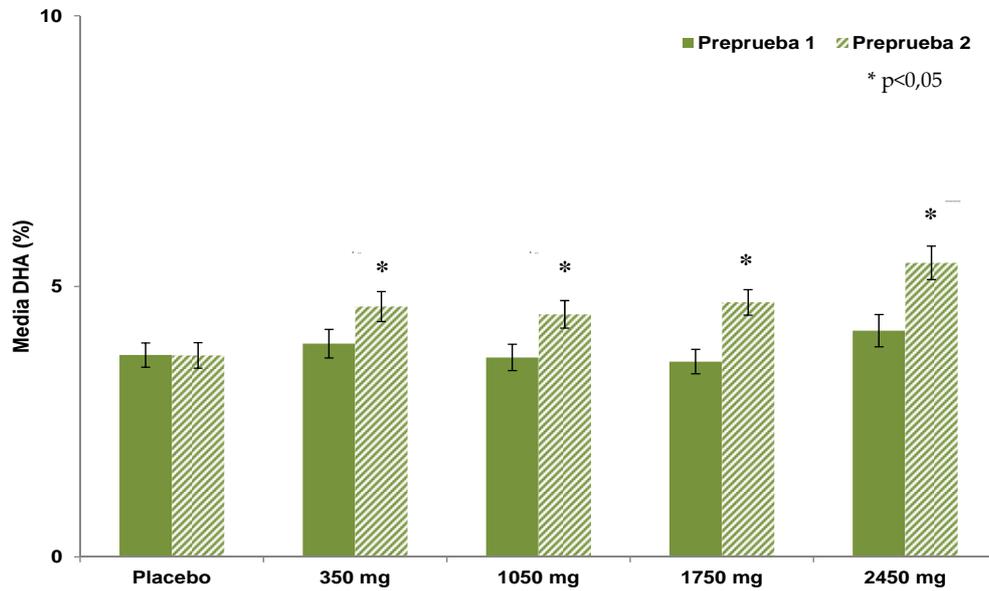


Figura 40. Frecuencia relativa del ácido docosahexaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

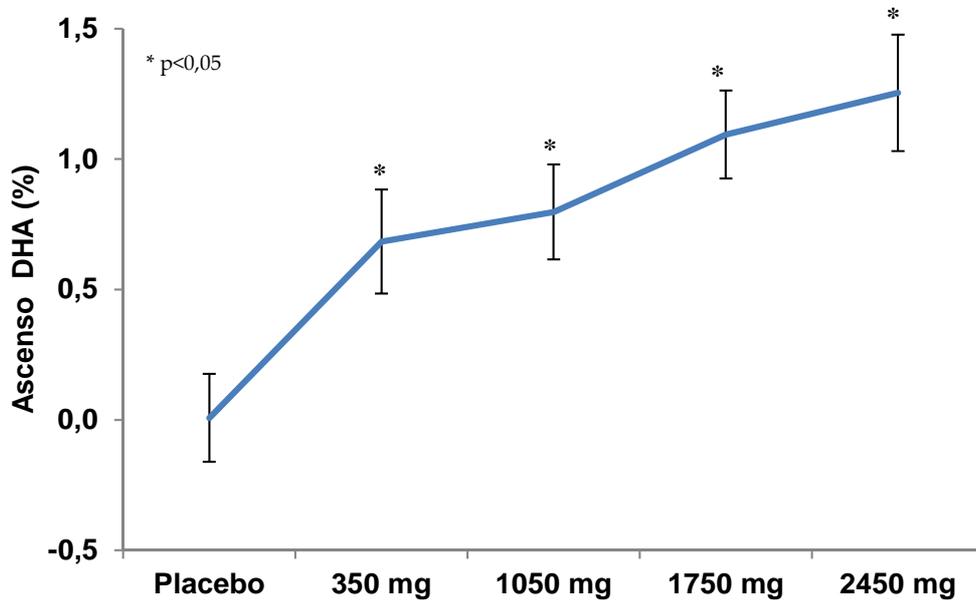


Figura 41. Ascenso de ácido docosahexaenoico que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio.

- No se observa un incremento del porcentaje de DPA en la membrana del eritrocito tras el consumo de DHA ($p=0,615$) (Figura 42).

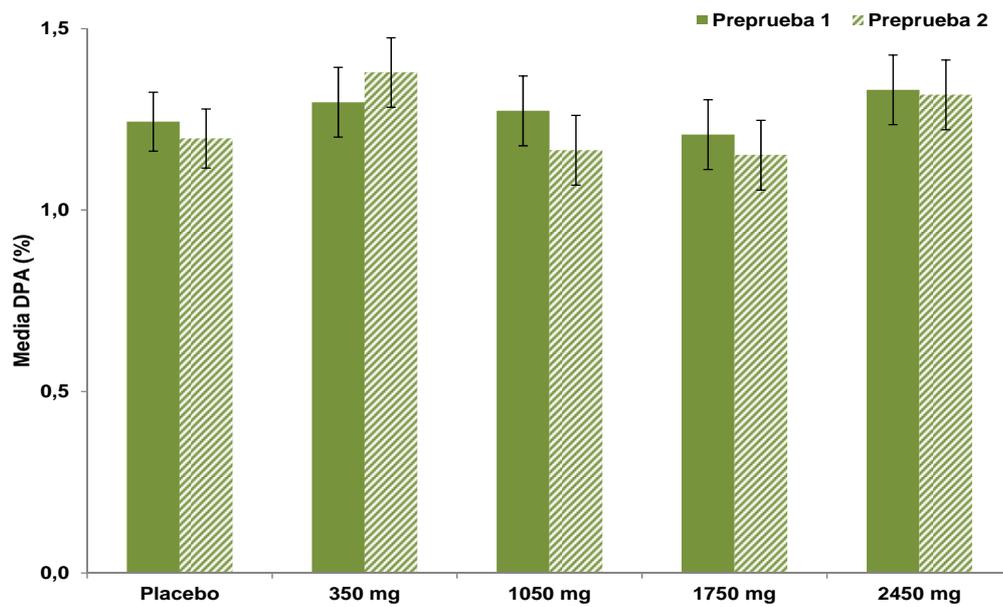


Figura 42. Frecuencia relativa del ácido docosapentaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

- Se observa un incremento del porcentaje de EPA en la membrana del eritrocito tras el consumo de DHA. Este incremento fue estadísticamente significativo para los grupos con mayor dosis de DHA, grupos 1750 mg y 2450 mg DHA ($p < 0,001$ y $p < 0,005$, respectivamente) y no lo fue para el grupo placebo, 350 mg y 1050 mg DHA ($p = 0,939$ y $p = 0,696$ y $p = 0,061$, respectivamente) (Figura 43). Además, se observa que este incremento fue tanto mayor cuanto mayor fue la dosis ingerida de DHA (Figura 44).

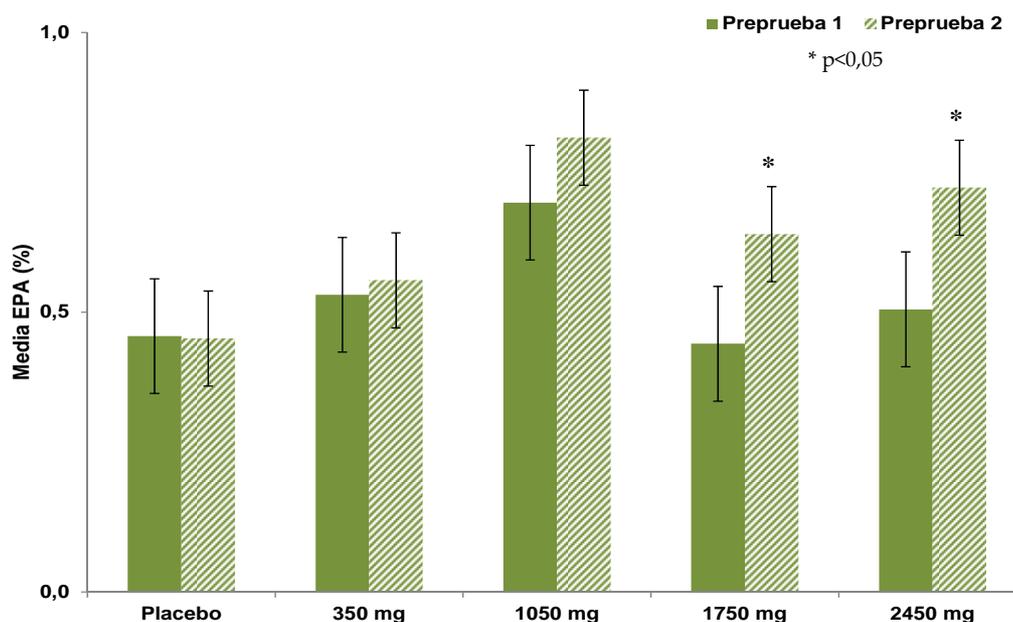


Figura 43. Frecuencia relativa del ácido eicosapentaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio. Valores medios \pm EEM.

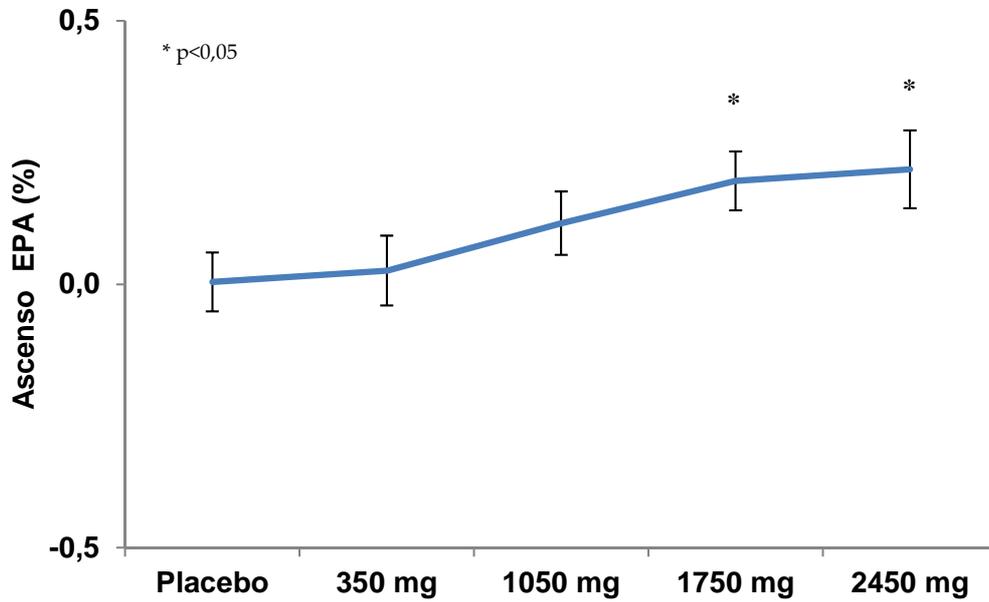


Figura 44. Ascenso de ácido eicosapentaenoico que experimenta la membrana del eritrocito tras el consumo del producto (placebo/ácido docosahexaenoico) en cada uno de los grupos a estudio. Valores medios \pm EEM

- Se aprecia un descenso del porcentaje de ARA en la membrana eritrocitaria tras el consumo de dosis de DHA iguales o mayores a 1050 mg, siendo estos descensos estadísticamente significativos (1050 mg ($p<0,017$), 1750 mg ($p<0,010$) y 2450 mg ($p<0,002$)) (Figura 45).

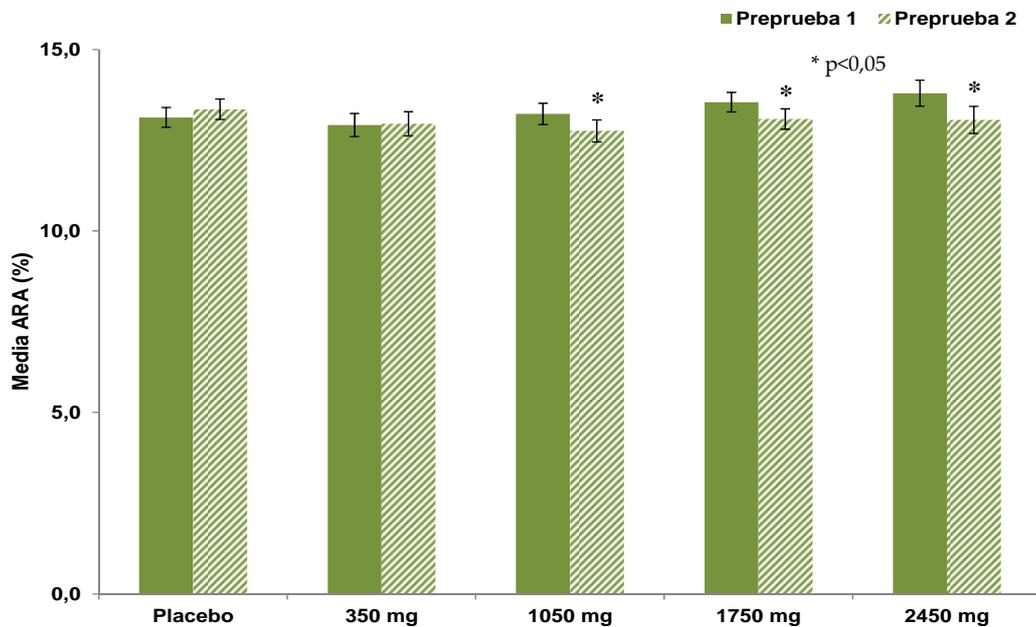


Figura 45. Frecuencia relativa del ácido araquidónico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.

- Se observa una disminución significativa del cociente ARA/DHA en la membrana eritrocitaria tras el consumo de DHA a dosis de 1050, 1750 y 2450 mg DHA ($p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente), siendo esta disminución mayor a mayores dosis de DHA (Figura 46).

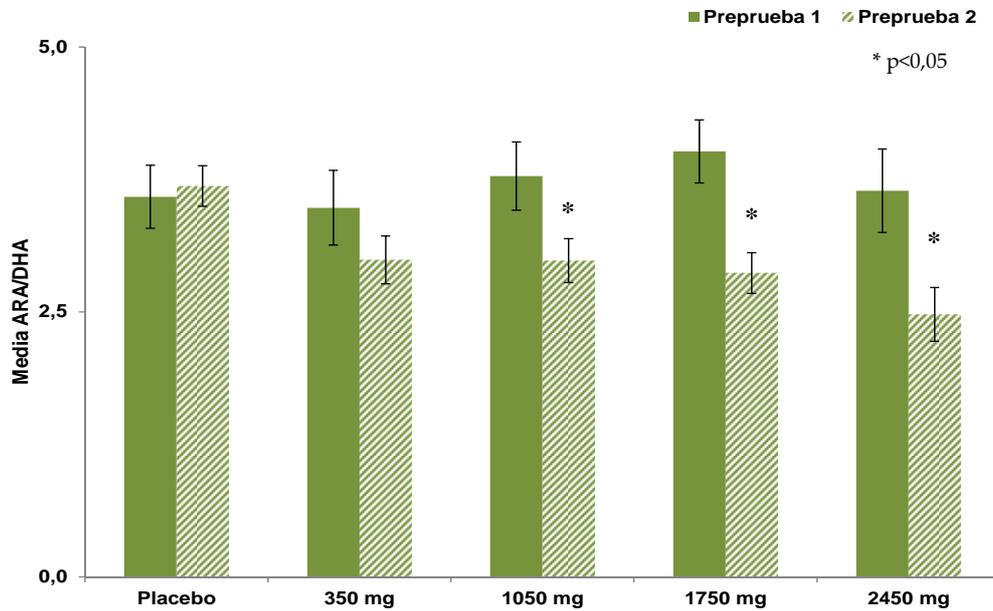


Figura 46. Frecuencia relativa de ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.

- Asimismo, se observa una disminución significativa del cociente AGS/DHA en la membrana eritrocitaria tras el consumo de DHA a dosis de 350, 1050, 1750 y 2450 mg de DHA ($p < 0,021$, $p < 0,003$, $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente), siendo esta disminución mayor a mayores dosis de DHA (Figura 47).

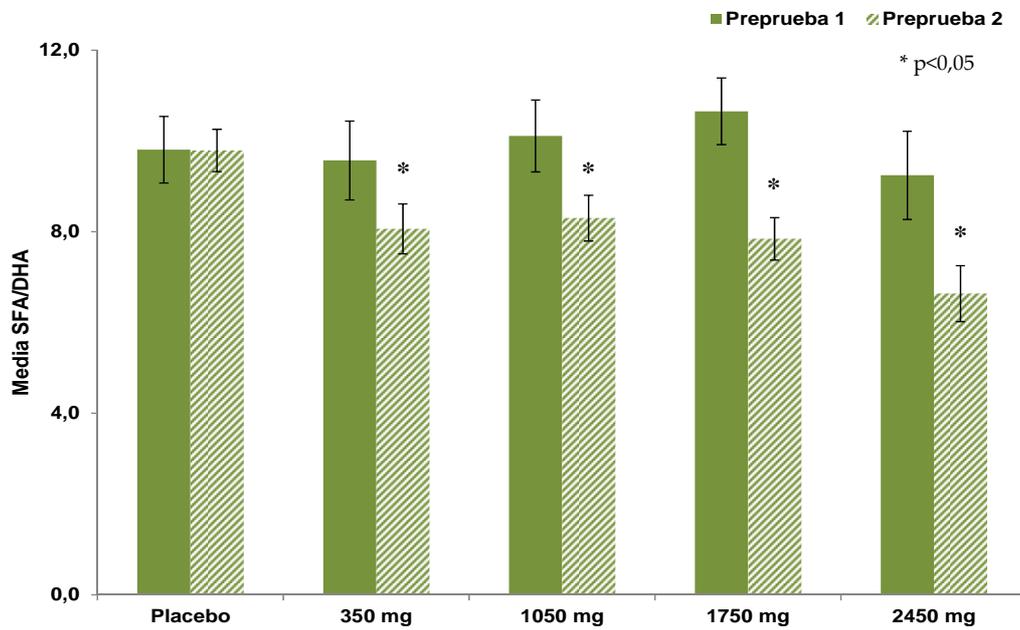


Figura 47. Frecuencia relativa del ácidos grasos saturados/ácido docosahexaenoico que aparece en la membrana del eritrocito evaluado antes y después de 4 semanas de consumo de ácido docosahexaenoico para los distintos grupos a estudio.

4.7 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO GRASO DOCOSAHEXAENOICO

La excreción total de 8-OHdG en orina de 24 h relativa al peso del sujeto para los distintos grupos de estudio y para las 2 pruebas realizadas se muestra en la Tabla 23. Se ha valorado el daño oxidativo generado por la prueba de esfuerzo con intensidad constante al 70% del VO_{2max} del sujeto mediante la medición de la excreción total de 8-OHdG en orina.

Tabla 23. Excreción media de 8-hidroxi-2'-dexosiguanosina en orina de 24 horas en relación al peso del sujeto para cada uno de los grupos de estudio.

Dosis	Prueba		Preprueba ng/kg 24h	Postprueba ng/kg 24h
Placebo	Prueba 1	Media	3965,4	6032,2
		DE	1388,6	2156,1
	Prueba 2	Media	4232,6	6219,7
		DE	1718,5	1954,8
350 mg	Prueba 1	Media	4083,5	5474,6
		DE	1993,2	2813,7
	Prueba 2	Media	4388,1	5545,5
		DE	1886,1	1762,4
1050 mg	Prueba 1	Media	3328,3	4874,5
		DE	981,1	1257,9
	Prueba 2	Media	3417,7	3816,0
		DE	1146,0	1380,7
1750 mg	Prueba 1	Media	3923,8	5680,9
		DE	967,7	2028,8
	Prueba 2	Media	4119,3	4594,2
		DE	1926,7	2228,0
2450 mg	Prueba 1	Media	4351,8	6085,3
		DE	1557,5	1806,2
	Prueba 2	Media	4471,6	4235,3
		DE	1165,0	1677,2

Los resultados obtenidos tras comparar el daño oxidativo generado por la prueba de esfuerzo en los distintos grupos de estudio, así como los niveles previos a las pruebas de cuantificación de 8-OHdG, han sido los siguientes (Figura 48):

- Los niveles basales de 8-OHdG (orina recolectada en las 24 h anteriores a la prueba de esfuerzo), entre las 2 pruebas de esfuerzo realizadas por cada grupo, no muestran diferencias significativas ($p=0,144$); así como tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar estos niveles basales entre los distintos grupos ($p=0,319$).
- En la primera prueba de esfuerzo con intensidad constante al 70% del VO_{2max} del sujeto (prueba 1), en todos los grupos se ha observado un incremento de la excreción de 8-OHdG al comparar la muestra de orina preprueba con respecto a la muestra postprueba (placebo $p<0,001$; 350 mg $p<0,008$; 1050 mg $p<0,002$; 1750 mg $p<0,001$; 2450 mg $p<0,003$).
- En la prueba de esfuerzo con intensidad constante al 70% del VO_{2max} del sujeto realizada tras 4 semanas de consumo de DHA (prueba 2) se observa que los grupos placebo y 350 mg de DHA presentan un incremento similar y estadísticamente significativo del daño oxidativo que el observado al realizar la prueba 1 (postprueba vs preprueba) (placebo $p<0,001$; 350 mg $p<0,003$). Por el contrario, los individuos pertenecientes a los grupos que consumieron 1050, 1750 y 2450 mg de DHA no presentan diferencias significativas entre los niveles de 8-OHdG anteriores y posteriores a la prueba 2, lo que es indicativo de una disminución del daño oxidativo al compararlo con la prueba 1. Este efecto es mayor en los individuos que consumen 2450 mg de DHA en los que el daño oxidativo generado por la prueba de esfuerzo se anula totalmente.

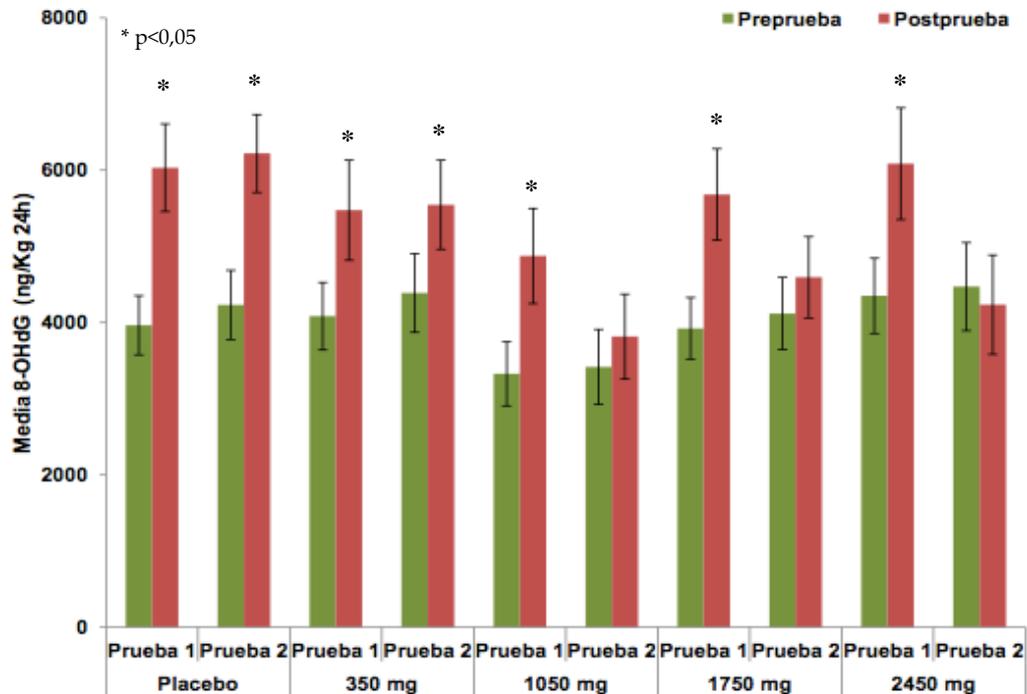


Figura 48. Excreción de 8-hidroxi-2'-dexosiguanosina en orina de 24 horas en relación al peso del sujeto para cada uno de los grupos de estudios evaluados y para cada prueba. Valores medios \pm EEM.

Si definimos la variable “poder antioxidante de una sustancia” como “la disminución de la excreción de 8-OHdG urinaria secundaria a la realización de una prueba de esfuerzo con intensidad constante al 70% del VO_{2max} del sujeto, tras el consumo de dicha sustancia y en comparación con la misma medida antes de ingerirla, empíricamente sería:

$$([8\text{-OHdG}]_{\text{postpru 1}} - [8\text{-OHdG}]_{\text{prepru 1}}) - ([8\text{-OHdG}]_{\text{postpru 2}} - [8\text{-OHdG}]_{\text{prepru 2}})$$

$[8\text{-OHdG}]_{\text{postpru 1}}$: cantidad de 8-OHdG excretada en orina en 24 h en relación al peso del individuo, después de realizar la prueba 1 en la que no se ha ingerido el producto experimental.

$[8\text{-OHdG}]_{\text{prepru 1}}$: cantidad de 8-OHdG excretada en orina en 24 h en relación al peso del individuo, antes de realizar la prueba 1 en la que no se ha ingerido el producto experimental.

[8-OHdG]postpru 2: cantidad de 8-OHdG excretada en orina en 24 h en relación al peso del individuo, después de realizar la prueba 2 y después de haber ingerido durante un tiempo el producto experimental.

[8-OHdG]prepru 2: cantidad de 8-OHdG excretada en orina en 24 horas en relación al peso del individuo, antes de realizar la prueba 2 y después de haber ingerido durante un tiempo el producto experimental.

Los resultados de esta variable se presentan en la Figura 49.

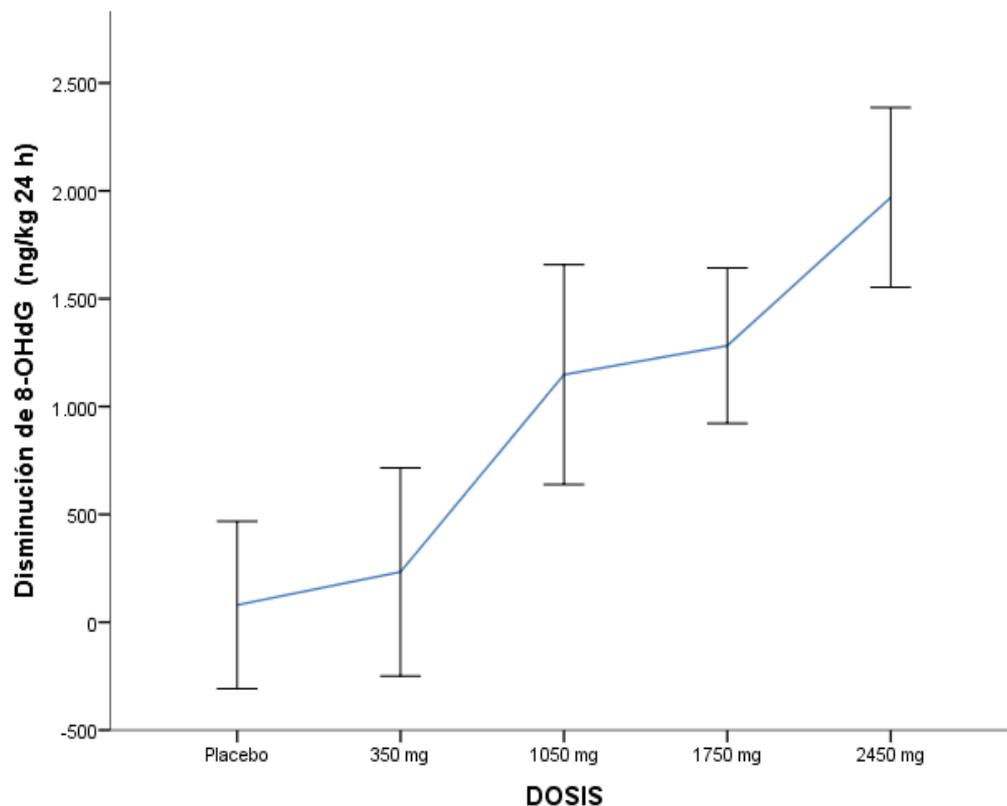


Figura 49. Disminución de la excreción de 8-hidroxi-2'-dexosiguanosina urinaria secundaria a la realización de una prueba de esfuerzo con intensidad constante al 70% del consumo máximo/pico de oxígeno del sujeto, tras el consumo de ácido docosahexaenoico. Valores medios \pm EEM.

Los resultados de la figura 49 muestran que la capacidad de DHA para frenar el daño oxidativo generado por una prueba de esfuerzo aparece a partir del consumo de 1050 mg y que dicho efecto se incrementa en las dosis superiores. Asimismo, se observa que el consumo de 350 mg de DHA se comporta de forma similar que placebo pero atendiendo a la biodisponibilidad del DHA, el consumo de dicha dosis mantenida un tiempo mayor podría aportar resultados distintos con respecto a placebo.

4.8 VARIABLES HEMATOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

4.8.1 Variables hematológicas

Al realizar la comparación de los valores hematológicos se observa un ascenso significativo durante la realización de las pruebas de esfuerzo de los niveles de hemoglobina, número de eritrocitos, hematocrito, número de leucocitos y número de plaquetas ($p < 0,001$ en todos los casos). Este aumento se repite generalmente de forma similar en la prueba 1 y 2 y no se observan diferencias significativas en dicho ascenso al comparar los distintos grupos entre sí ($p = 0,883$, $p = 0,145$, $p = 0,359$, $p = 0,802$, respectivamente). Estas variaciones pueden ser atribuidas al estado de deshidratación postprueba que sufren los sujetos. No se observan, por tanto, variaciones en función de la dosis de DHA ingerida (Tablas 24a y 24b).

Tabla 24a. Media y desviación típica de cada una de las variables hematológicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.

Dosis	Prueba	Prueba	Media	Eritrocitos	Hemoglobina	Hematocrito
				10 ⁶ cel/mmc	g/dl	%
Placebo	Prueba	Preprueba	Media	4,6	14,3	41,5
			DE	0,3	0,7	2,2
	Postprueba	Media	4,7	14,5	42,6	
			DE	0,3	0,7	2,1
	Prueba	Preprueba	Media	4,7	14,0	42,0
			DE	0,4	0,9	2,7
Postprueba	Media	4,8	14,3	43,2		
		DE	0,4	0,9	2,5	
350 mg	Prueba	Preprueba	Media	4,8	14,8	43,5
			DE	0,2	0,8	2,0
	Postprueba	Media	4,8	14,8	43,8	
			DE	0,3	0,8	2,6
	Prueba	Preprueba	Media	4,8	14,5	43,5
			DE	0,2	0,7	1,8
Postprueba	Media	4,9	14,9	45,0		
		DE	0,2	0,9	2,4	
1050 mg	Prueba	Preprueba	Media	4,7	14,9	43,6
			DE	0,3	0,6	1,4
	Postprueba	Media	4,9	15,6	45,7	
			DE	0,3	0,6	1,5
	Prueba	Preprueba	Media	4,6	14,4	43,2
			DE	0,3	0,6	1,9
Postprueba	Media	4,9	14,9	45,1		
		DE	0,3	0,6	1,9	
1750 mg	Prueba	Preprueba	Media	4,7	14,8	42,9
			DE	0,4	1,1	3,2
	Postprueba	Media	4,8	15,1	43,8	
			DE	0,3	1,0	2,8
	Prueba	Preprueba	Media	4,7	14,1	42,3
			DE	0,2	0,9	2,3
Postprueba	Media	4,8	14,5	43,2		
		DE	0,2	0,9	2,3	

Dosis	Prueba			Eritrocitos	Hemoglobina	Hematocrito
				10 ⁶ cel/mm ³	g/dl	%
2450 mg	Prueba	Preprueba	Media	4,6	14,5	43,1
			DE	0,3	0,7	2,4
		Postprueba	Media	4,8	15,1	44,8
			DE	0,3	1,0	3,0
	Prueba	Preprueba	Media	4,7	14,7	43,7
			DE	0,2	0,7	1,9
		Postprueba	Media	4,8	15,1	44,3
			DE	0,4	1,2	3,2

Tabla 24b. Media y desviación típica de cada una de las variables hematológicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.

Dosis	Prueba			Leucocitos 10 ³ cel/mmc	Plaquetas 10 ³ cel/mmc	
Placebo	Prueba	Preprueba	Media	6,6	204,0	
			DE	1,1	34,9	
		Postprueba	Media	10,4	229,4	
			DE	2,4	46,1	
		Prueba	Preprueba	Media	6,3	200,5
				DE	0,9	27,6
		Postprueba	Media	9,0	228,2	
			DE	1,4	25,7	
350 mg	Prueba	Preprueba	Media	6,9	207,0	
			DE	2,7	49,4	
		Postprueba	Media	8,0	218,1	
			DE	2,9	52,5	
		Prueba	Preprueba	Media	5,8	208,7
				DE	0,9	30,6
		Postprueba	Media	9,9	237,0	
			DE	3,8	32,2	
1050 mg	Prueba	Preprueba	Media	5,9	187,1	
			DE	1,6	47,1	
		Postprueba	Media	9,2	225,5	
			DE	2,4	43,6	
		Prueba	Preprueba	Media	5,4	191,9
				DE	0,8	41,3
		Postprueba	Media	8,8	218,7	
			DE	1,9	45,8	
1750 mg	Prueba	Preprueba	Media	5,7	210,6	
			DE	1,0	32,0	
		Postprueba	Media	8,6	243,9	
			DE	2,5	37,3	
		Prueba	Preprueba	Media	5,0	207,5
				DE	1,3	24,3
		Postprueba	Media	8,6	240,2	
			DE	3,0	25,8	

Dosis	Prueba		Leucocitos 10 ³ cel/mmc	Plaquetas 10 ³ cel/mmc	
2450 mg	Prueba	Preprueba	Media	5,7	178,6
			DE	0,9	67,7
		Postprueba	Media	10,5	248,7
			DE	2,3	57,9
	Prueba	Preprueba	Media	5,7	209,6
			DE	0,8	49,0
		Postprueba	Media	9,4	239,6
			DE	2,3	53,3

4.8.2 Variables bioquímicas

Los resultados de la media y desviación estándar de las variables séricas evaluadas en este estudio se muestran en las tablas 25a, 25b, 26a y 26b.

Al igual que en las variables anteriores, al realizar la comparación de estos valores se observa un aumento estadísticamente significativo durante la realización de las pruebas de esfuerzo ($p < 0,001$ para los niveles de ferritina, ácido úrico, GOT, GPT, GGT, LDH, CPK, potasio, CT total y HDL; $p < 0,014$ para los niveles de sodio; $p < 0,002$ para los niveles de LDL), excepto para la concentración de glucosa, TAG y de creatinina que no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,548$, $p = 0,616$ y $p = 0,168$, respectivamente). Este aumento se repite de forma similar en la prueba 1 y 2 y no se observan diferencias significativas en dicho ascenso al comparar los distintos grupos entre sí ($p > 0,05$ en todos los casos). Estas variaciones observadas en estos parámetros pueden ser atribuidas al estado de deshidratación postprueba que sufren los sujetos. Por tanto, no se observan variaciones de las variables séricas en función de la dosis de DHA ingerida.

Tabla 25a. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.

Dosis	Prueba			Ferritina ng/ml	Glucosa mg/dl	Creatinina mg/dl	Ácido úrico mg/dl
Placebo	Prueba	Preprueba	Media	141,8	80,6	1,1	3,9
			DE	92,3	18,8	0,2	1,3
		Postprueba	Media	152,7	83,3	1,3	4,1
			DE	96,7	18,3	0,3	1,4
	Prueba	Preprueba	Media	129,2	92,6	1,1	4,2
			DE	79,2	8,6	0,1	0,6
		Postprueba	Media	136,6	86,2	1,2	4,4
			DE	82,8	8,1	0,1	0,6
350 mg	Prueba	Preprueba	Media	114,9	83,2	1,0	4,4
			DE	62,6	10,2	0,1	0,9
		Postprueba	Media	119,9	90,1	1,2	4,6
			DE	62,6	12,2	0,2	0,9
	Prueba	Preprueba	Media	100,1	89,7	0,9	4,1
			DE	51,1	13,0	0,1	1,1
		Postprueba	Media	106,3	94,8	1,1	4,4
			DE	52,6	11,3	0,2	1,1
1050 mg	Prueba	Preprueba	Media	144,1	85,9	1,0	4,9
			DE	90,5	14,2	0,1	1,3
		Postprueba	Media	159,0	86,2	1,3	5,2
			DE	99,8	10,8	0,2	1,3
	Prueba	Preprueba	Media	133,0	94,6	1,1	4,8
			DE	76,9	19,5	0,1	1,0
		Postprueba	Media	143,2	87,5	1,2	5,2
			DE	82,0	15,7	0,2	1,2
1750 mg	Prueba	Preprueba	Media	103,7	86,4	1,0	4,0
			DE	72,5	9,2	0,1	1,2
		Postprueba	Media	117,4	92,5	1,2	4,2
			DE	73,8	18,3	0,1	1,1
	Prueba	Preprueba	Media	109,9	89,5	1,1	4,2
			DE	81,7	11,4	0,1	1,1
		Postprueba	Media	120,5	89,7	1,2	4,4
			DE	87,9	16,2	0,1	1,2

Dosis	Prueba		Ferritina ng/ml	Glucosa mg/dl	Creatinina mg/dl	Ácido úrico mg/dl	
2450 mg	Prueba	Preprueba	Media	214,3	84,4	1,0	4,3
			DE	175,4	11,7	0,2	1,2
		Postprueba	Media	242,0	89,1	1,1	4,6
			DE	204,2	11,1	0,3	1,2
	Prueba	Preprueba	Media	238,0	84,0	1,0	4,3
			DE	198,1	12,2	0,2	1,5
		Postprueba	Media	270,3	82,1	13,8	4,8
			DE	234,8	10,2	35,6	1,5

Tabla 25b. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiados.

Dosis	Prueba			GOT UI/l	GPT UI/l	GGT UI/l
Placebo	Prueba	Preprueba	Media	25,3	25,7	17,9
			DE	18,7	11,7	5,6
		Postprueba	Media	28,6	27,3	21,1
			DE	21,5	12,6	10,2
	Prueba	Preprueba	Media	19,9	21,8	18,4
			DE	4,7	6,6	5,5
	Postprueba	Media	21,8	23,2	19,5	
		DE	4,9	6,8	6,7	
350 mg	Prueba	Preprueba	Media	20,1	20,9	15,2
			DE	6,7	6,5	2,5
		Postprueba	Media	22,7	22,7	16,2
			DE	7,9	6,9	2,9
	Prueba	Preprueba	Media	17,8	17,3	16,0
			DE	3,4	2,5	4,1
	Postprueba	Media	19,8	18,7	18,2	
		DE	3,8	2,8	3,3	
1050 mg	Prueba	Preprueba	Media	23,1	24,0	20,6
			DE	3,8	6,4	18,5
		Postprueba	Media	25,1	24,7	21,9
			DE	5,5	8,7	18,8
	Prueba	Preprueba	Media	21,3	23,0	19,9
			DE	4,1	8,1	18,0
	Postprueba	Media	23,5	24,6	20,8	
		DE	5,6	8,4	19,5	
1750 mg	Prueba	Preprueba	Media	26,2	25,7	18,9
			DE	9,1	10,2	5,4
		Postprueba	Media	29,0	27,5	20,3
			DE	9,8	11,5	5,9
	Prueba	Preprueba	Media	22,0	23,4	19,0
			DE	4,6	8,8	4,9
	Postprueba	Media	24,8	24,5	19,2	
		DE	5,3	9,3	5,4	
2450 mg	Prueba	Preprueba	Media	20,6	20,9	22,8
			DE	4,5	4,8	4,4
		Postprueba	Media	23,3	22,9	25,3

Dosis	Prueba		GOT UI/l	GPT UI/l	GGT UI/l	
		DE	5,5	5,1	5,9	
	Prueba	Preprueba	Media	20,8	25,0	24,8
		DE	3,3	7,7	4,6	
		Postprueba	Media	26,9	27,3	27,8
		DE	5,2	8,1	5,7	

Tabla 26a. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiado.

Dosis		Prueba		LDH UI/l	CKP UI/l	Sodio mEq/l	Potasio mEq/l
Placebo	Prueba 1	Preprueba	Media	285,9	432,8	136,3	5,0
			DE	53,5	723,2	3,1	0,7
		Postprueba	Media	298,9	493,4	136,8	5,4
			DE	65,6	820,9	3,0	0,9
	Prueba 2	Preprueba	Media	279,1	208,7	136,7	4,8
			DE	39,9	125,7	1,8	0,5
		Postprueba	Media	293,9	232,6	137,1	4,9
			DE	49,7	143,0	3,0	0,5
350 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	275,1	193,0	136,4	4,8
			DE	50,8	152,1	1,7	0,2
		Postprueba	Media	315,7	214,6	137,0	5,3
			DE	61,5	163,0	1,2	0,5
	Prueba 2	Preprueba	Media	270,9	138,6	136,8	4,8
			DE	62,1	36,8	1,1	1,1
		Postprueba	Media	311,8	156,9	138,2	4,9
			DE	53,1	42,2	1,3	0,5
1050 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	270,5	175,4	136,2	5,0
			DE	52,4	92,0	2,7	0,6
		Postprueba	Media	293,9	211,9	137,0	5,2
			DE	82,4	99,8	3,3	0,8
	Prueba 2	Preprueba	Media	241,8	165,7	136,3	4,9
			DE	30,1	71,8	3,6	1,3
		Postprueba	Media	274,3	199,5	136,8	5,4
			DE	34,5	89,6	3,8	1,6
1750 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	286,4	257,3	137,0	5,2
			DE	66,0	308,7	3,7	0,7
		Postprueba	Media	345,0	288,4	139,0	5,1
			DE	80,3	330,6	5,1	0,9
	Prueba 2	Preprueba	Media	271,2	168,4	136,3	5,3
			DE	36,7	84,3	3,1	1,4
		Postprueba	Media	323,6	191,3	137,3	5,4
			DE	55,2	94,4	3,3	1,4

Dosis	Prueba		LDH UI/l	CKP UI/l	Sodio mEq/l	Potasio mEq/l	
2450 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	267,6	170,3	138,5	4,7
			DE	38,1	92,0	2,1	0,4
		Postprueba	Media	317,6	200,1	138,5	5,1
			DE	59,2	100,6	2,6	0,3
	Prueba 2	Preprueba	Media	270,4	167,1	136,0	5,9
			DE	36,6	71,1	3,3	1,4
		Postprueba	Media	342,8	188,8	136,3	6,7
			DE	83,6	77,0	2,6	1,3

Tabla 26b. Media y desviación típica de cada una de las variables bioquímicas analizadas en este estudio, antes y después de cada una de las pruebas de esfuerzo y en cada uno de los grupos estudiado.

Dosis	Prueba			CT mg/dl	TAG mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	
Placebo	Prueba 1	Preprueba	Media	187,2	151,1	56,5	100,4	
			DE	40,0	101,5	12,9	30,4	
		Postprueba	Media	198,6	133,6	59,1	112,8	
			DE	33,7	66,2	13,8	27,9	
	Prueba 2	Preprueba	Media	194,6	125,5	60,8	108,7	
			DE	39,4	64,2	15,0	27,1	
		Postprueba	Media	201,5	120,0	63,7	113,7	
			DE	36,9	65,0	15,5	23,9	
350 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	180,1	123,2	68,8	86,7	
			DE	27,2	93,4	17,4	33,9	
		Postprueba	Media	190,3	89,2	72,6	99,9	
			DE	32,2	26,1	15,5	24,1	
	Prueba 2	Preprueba	Media	192,6	83,2	73,8	102,1	
			DE	34,3	22,9	21,4	23,8	
		Postprueba	Media	200,6	81,8	78,0	106,2	
			DE	37,4	15,9	20,5	29,7	
	1050 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	200,0	126,8	57,8	116,7
				DE	37,4	50,5	11,1	24,4
			Postprueba	Media	210,2	112,3	61,5	126,2
				DE	45,8	47,7	10,8	33,6
Prueba 2		Preprueba	Media	203,2	91,8	64,1	120,7	
			DE	44,8	33,6	13,8	42,3	
		Postprueba	Media	205,3	101,8	67,5	117,5	
			DE	53,9	25,5	13,9	48,2	
1750 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	207,3	124,4	64,2	117,9	
			DE	26,2	43,5	11,4	25,8	
		Postprueba	Media	216,9	124,2	67,5	124,0	
			DE	29,7	48,0	12,5	21,1	
	Prueba 2	Preprueba	Media	205,3	106,8	70,5	111,5	
			DE	30,4	48,6	14,5	36,2	
		Postprueba	Media	215,0	131,0	73,8	121,4	
			DE	33,7	104,8	15,7	30,8	

Dosis	Prueba		CT mg/dl	TAG mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	
2450 mg	Prueba 1	Preprueba	Media	178,8	82,0	58,6	103,7
			DE	32,0	39,4	8,1	21,5
		Postprueba	Media	191,9	92,1	62,0	105,4
			DE	45,1	32,8	7,9	37,5
	Prueba 2	Preprueba	Media	187,9	101,3	63,4	113,0
			DE	42,8	57,5	11,8	25,5
		Postprueba	Media	203,8	97,0	67,0	117,4
			DE	50,6	56,3	10,9	40,6

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio participaron 54 varones con amplio rango de edad (20-60 años), y una edad media de 38,6 (9,8) años. Los sujetos a estudio eran físicamente activos y presentaban una media de 9,1 (4,6) h de actividad física general y 7,6 (3,7) h de ciclismo en particular, sin diferencias significativas entre los grupos en el número de horas dedicadas al deporte ($p=0,961$) y al ciclismo ($p=0,518$). Al realizar comparación del VO_{2max} relativo al peso y del VO_2 en el UV2 tampoco se observaron diferencias significativas ($p=0,536$ y $p=0,846$, respectivamente) entre los grupos. La evaluación de las condiciones de laboratorio (temperatura y humedad relativa) no mostró diferencias significativas ($p=0,265$ y $p=0,985$, respectivamente), al igual que la valoración de consumo hídrico intraprueba entre los sujetos ($p=0,454$). Por último, no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos al analizar la alimentación de los deportistas ($p<0,05$); aunque se observaron pequeñas diferencias en el consumo de AGPI n-3 éstas no fueron estadísticamente significativas ($p=0,142$).

Las variables mencionadas influyen en los resultados obtenidos en este trabajo y la ausencia de diferencias significativas entre los distintos grupos a estudio convierte en homogéneos a todos los grupos para cada una de estas variables. Por tanto, los datos obtenidos no pueden ser atribuibles al efecto de estas variables.

La población del estudio se estratificó en 5 grupos: placebo y 4 grupos con dosis distintas de DHA (350 mg/d, 1050 mg/d, 1750 mg/d y 2450 mg/d). Los sujetos del estudio fueron hombres deportistas sanos, no fumadores ni consumidores habituales de bebidas alcohólicas, con al menos 18 años, sin padecimientos crónicos ni consumidores de alimentos funcionales enriquecidos con AGPI n-3 en el mes anterior al inicio del estudio o durante la realización del mismo.

5.1 BIODISPONIBILIDAD DEL ÁCIDO GRASO DOCOSAHEXAENOICO

El contenido de DHA en la membrana de eritrocitos es considerado el mejor marcador de biodisponibilidad a largo plazo, siendo efectivo a distintas dosis, y en adultos, niños, adolescentes y mujeres embarazadas y lactantes¹⁹⁸. Además, este marcador se correlaciona adecuadamente con las concentraciones de AG de cadena larga n-3 en la membrana celular del tejido miocárdico, hepático y renal¹⁸⁵. Asimismo, el porcentaje de DHA en las membranas eritrocitarias es un marcador de adherencia a ingestas de DHA y EPA en intervenciones nutricionales²⁷⁷.

La valoración del cambio del perfil de AG en la membrana celular de eritrocitos no mostró cambios en la cantidad relativa de AGS y AGPI en ninguno de los grupos a estudio. Sin embargo, se constató un descenso significativo en relación a los AGMI en los grupos con consumo de 350, 1050 y 1750 mg/d, y una reducción no significativa en el grupo con consumo de 2450 mg/d. Al analizar los AGPI n-3 en conjunto se observó un incremento significativo dosis-dependiente en todos los grupos, mientras que los AGPI n-6 descendieron de forma significativa cuando el DHA se consumió en dosis iguales o superiores a 1050 mg/d. Como consecuencia, el cociente n6/n3 experimentó un descenso dosis-dependiente significativo en todos los grupos con consumo de DHA. Asimismo, al estimar los AGPI por separado se observó un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de DHA en todas las dosis de estudio, con aumento del 17,4, 20,2, 30,3 y 30,0% para los grupos con consumo de 350, 1050, 1750 y 2450 mg/d, respectivamente. Con respecto al EPA, se constató un incremento dosis-dependiente significativo en dosis superior o igual a 1750 mg/d; los otros grupos del estudio mostraron incremento no significativo. La baja concentración de EPA en el producto experimental no justifica el incremento observado, por lo que este resultado puede ser debido a la retroconversión de DHA a EPA. En este sentido, en fosfolípidos de LDL se ha informado de que el consumo de DHA a dosis de 400-1600 mg/d durante 2 semanas conlleva una retroconversión del 12%²¹⁷, lo que podría justificar el resultado observado. En relación al DPA no se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos a estudio, lo que parece ser debido a que el incremento del DPA es dependiente de la presencia de EPA en el suplemento empleado²⁷⁸; sin embargo, Cazzola et al²⁷⁹ observaron que la

suplementación diaria con 720 mg de DHA y 286 mg de EPA durante 4 semanas incrementa de forma significativa la concentración de DPA en membrana eritrocitaria. Además, hubo un descenso significativo de ARA tras el consumo de dosis de DHA iguales o superiores a 1050 mg/d. En consonancia con este resultado, Cazzola et al²⁷⁹ también informaron de un descenso de ARA a dosis de 720 mg DHA y 286 mg EPA durante 4 semanas. Además, Calzada et al²¹⁷ también observaron un descenso del 11% de ARA tras 2 semanas de consumo de DHA de 1600 mg/d, situación no observada en consumos de 200-800 mg (datos en fosfolípidos de LDL). Como consecuencia de la reducción de ARA, se observó un descenso del índice ARA/DHA en todos los grupos que consumieron DHA, que fue dosis-dependiente y estadísticamente significativo en consumos superiores o iguales a 1050 mg/d. Asimismo, el incremento de DHA y EPA con reducción concomitante de ARA justifica la ausencia de cambios en la cantidad relativa de AGPI en la membrana de los eritrocitos. Por último, se observó una disminución dosis-dependiente significativa del cociente AGS/DHA en los grupos que consumieron DHA derivado del incremento observado de DHA en la membrana del eritrocito.

Tras la revisión bibliográfica desarrollada sólo se han encontrado 3 estudios que relacionen distintas dosis de DHA con el perfil de AG en membrana eritrocitaria. En consonancia con nuestros resultados, Milte et al²⁸⁰ observaron un incremento dosis-dependiente significativo de DHA y de AGPI n-3 (DHA y EPA) al emplear distintas dosis de DHA (0,52 g DHA y 0,12 g EPA; 1,04 g DHA y 0,24 g EPA; 1,56 g DHA y 0,36 g EPA) durante 12 semanas en sujetos con un índice de masa corporal superior a 25 kg/m². Barceló-Coblijn et al²⁸¹ emplearon dosis de 0,6 y 1,2 g AGPI n-3 (EPA:DHA 2:1) en sujetos sanos durante 12 semanas y no observaron cambios en la cantidad relativa de AGS, AGMI y AGPI; aunque nuestros datos muestran igual resultado para AGS y AGPI, se observó un descenso significativo de los AGMI para dosis de 350-1750 mg/d. Además, al contrario que nosotros, no observaron un incremento significativo de DHA y determinaron un incremento de DPA, datos que parecen ser debido al bajo contenido de DHA y al elevado porcentaje de EPA en el suplemento empleado. Por el contrario, Browning et al²⁸² informaron de un incremento dosis-dependiente significativo de DHA y AGPI n-3 ($p < 0.001$), y la concentración de EPA en membrana eritrocitaria no mostró un incremento dosis-respuesta, al

emplear dosis distintas de DHA y EPA (0,25 g y 0,21 g; 0,5 g y 0,42 g; 1,0 g y 0,84 g) en individuos sanos durante 12 meses.

Otros estudios han evaluado la biodisponibilidad del DHA a dosis únicas. Klinger et al²⁸³ observaron que el consumo de 510 mg/d de DHA durante 29 días supuso un incremento significativo de DHA en membrana eritrocitaria ($p < 0.001$) pero no un cambio en el contenido de EPA, lo que según los autores indica que la dosis y duración de la suplementación no fueron suficientes para que se produjera retroconversión. Además, la reducción de ARA no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, Capó et al²⁵² determinaron una reducción significativa de ARA al suplementar la dieta de futbolistas con 1,14 g/d de DHA durante 8 semanas y un incremento dosis-dependiente de DHA en membrana eritrocitaria, ambos resultados similares a los datos obtenidos con dosis de DHA de 1050 mg/d durante 4 semanas.

Por último, nuestros datos fueron similares a un estudio en sujetos con fibrosis quística a los que se les suplementó la dieta con DHA en forma de TAG a dosis de 50 mg/kg/d, lo que supuso un consumo diario medio de 1-4,2 g de DHA, durante 6 meses; los niveles de DHA en el grupo placebo se mantuvieron estables, mientras que en el grupo experimental se observó un incremento significativo de DHA, EPA y AGPI n-3, y un descenso significativo de ARA (29%) e índice ARA:DHA (80%) en la membrana eritrocitaria²⁸⁴.

En definitiva, según nuestros datos, el consumo de DHA produce un incremento de AGPI n-3, principalmente DHA y en menor medida de EPA, pero no de DPA, en la membrana del eritrocito. El ascenso de DHA y EPA produce un desplazamiento en la membrana eritrocitaria del ARA y disminuye su contenido eritrocitario al consumir el DHA a dosis iguales o superiores a 1050 mg/d. El aumento de las concentraciones de DHA y EPA encontrada en el perfil de la membrana de eritrocitos es similar al establecido en la literatura en la que se informa que al suministrar DHA como suplemento se incrementan las concentraciones de DHA y EPA en las membranas de los tejidos. El aumento del DHA se produce de modo dosis-dependiente y el aumento del EPA se observa en menor medida¹⁶⁸. En alimentos fortificados con DHA también se ha observado un incremento de DHA en membrana eritrocitaria con incremento menor en EPA. Además, el contenido elevado de DHA se mantiene durante más tiempo en

comparación con EPA en membrana de eritrocitos tanto en individuos sanos²⁸⁵ como en individuos con patologías²⁸⁶.

5.2 ÁCIDO GRASO DOCOSAHEXAENOICO COMO ANTIOXIDANTE

Los 54 sujetos a estudio fueron sometidos a 2 pruebas de esfuerzo (ejercicio físico aeróbico) de alta intensidad (70% del VO_{2max}) y larga duración (90 min) como modelo inductor de estrés oxidativo, lo que supone una producción suficiente de ER, como se ha observado en protocolos de ejercicio en torno al 75% del VO_{2max} ³⁸, que permitió determinar la capacidad antioxidante del DHA consumido a distintas dosis durante 4 semanas.

Se evaluó el daño oxidativo al ADN basal y el daño inducido por una prueba de esfuerzo de elevada intensidad y larga duración realizada antes y después del consumo de cada una de las dosis a estudio. El daño oxidativo al ADN se valoró mediante la determinación de la 8-OHdG en orina 24 h, marcador aceptado como indicar de daño oxidativo al ADN en humanos^{233,271}. La presencia de este marcador, que no se produce durante el normal metabolismo de nucleótidos³⁸, surge cuando estos sufren un daño inducido por ER^{287,288}. Aunque algunos estudios no han observado elevación de este marcador como respuesta al ejercicio³⁸, nuestro protocolo de estrés oxidativo conllevó un incremento significativo de la excreción urinaria de 8-OHdG (placebo $p < 0,001$; 350 mg $p < 0,008$; 1050 mg $p < 0,002$; 1750 mg $p < 0,001$; 2450 mg $p < 0,003$) al comparar la muestra de orina preprueba con la muestra postprueba de la prueba 1 (sin consumo de DHA).

En los últimos años se ha verificado la necesidad de revisión de los criterios que relacionan a los AGPI n-3 (EPA y DHA) con el riesgo de peroxidación lipídica. A pesar de los beneficios en la salud derivados de su consumo, elevar su consumo incrementa su incorporación a las membranas plasmáticas, lo que podría inducir un incremento de la peroxidación lipídica²²⁴ como consecuencia del aumento del índice de insaturación de las membranas; así, al incrementar dicho índice, el DHA incrementa el número de “dianas” para las ER generadas²²⁸.

5.2.1 Estudios *in vitro*

Diversos estudios en líneas de células tumorales han observado un efecto citotóxico al tratar dichas células con DHA. En células de cáncer de próstata se ha observado un incremento de generación de ERO a nivel mitocondrial dosis-dependiente (10-50 μM), lo que conlleva disfunción mitocondrial derivada de la incorporación del DHA a la membrana mitocondrial y reducción de la viabilidad celular²²⁷. En células de cáncer de mama (MCF-7) se han obtenido datos similares con dosis de 30 μM , aunque este estrés incrementado no se produjo al emplear α -tocoferol, ácido ascórbico y N-acetil-L-cisteína²³⁰. De modo similar, en células de cáncer de mama se ha observado un incremento de la apoptosis con dosis de 50-300 μM por incremento del grado de insaturación de la membrana tumoral²⁸⁹. Otro estudio demostró menor viabilidad en células tumorales pancreáticas, tratadas con DHA (30 μM), antes de la exposición a H_2O_2 como consecuencia de una mayor sensibilidad al estrés oxidativo derivada de la inhibición del NF- κB ²²⁶. Asimismo, en células de cáncer de ovario y páncreas se ha observado que el DHA reduce la expresión génica de la SOD1 y, por tanto, la capacidad antioxidante endógena de las células tumorales²²⁵. En el mismo sentido, se ha observado una reducción de la expresión de SOD1 y de los niveles de GPx4 (50%) en células de cáncer de ovario, linfoma de células B, leucemia de células T, leucemia mieloide y mieloma²⁹⁰, y una inhibición de la GPx1 en células de cáncer de mama (MDA-MB-231) cuando se emplea de forma conjunta DHA (30 μM) y doxorubicina²²⁸. Además, se han observado datos similares en modelos en animales (ratas)²³⁰ y en pacientes con cáncer de mama con metástasis, en los que el consumo de 1,8 g de DHA/d en el tratamiento con quimioterapia conlleva una mayor eficacia del tratamiento derivado del mayor contenido de DHA en la membrana plasmática de la célula tumoral, sin incrementos de lesión miocárdica, situación típica en quimioterapia a causa de la mayor generación de ERO²⁹¹.

Los resultados en células tumorales son concluyentes y, por ello, se ha sugerido que el incremento de peroxidación lipídica podría suponer un peligro potencial en células normales²²⁴. Los estudios *in vitro* desarrollados muestran resultados contradictorios. Por un lado, se ha observado un efecto prooxidante del DHA en células endoteliales (Ea hy 926) al emplear una dosis de 50 μM , al

incrementar la generación de ERO y, consecuentemente, de dienos conjugados²³². De igual modo, en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) se ha observado un efecto dosis-dependiente (5, 10, 20 y 50 μM) en la producción de H_2O_2 , siendo el incremento significativo a partir de 20 μM , aunque se ha sugerido que este efecto no es perjudicial ya que el H_2O_2 es necesaria para el crecimiento de las células neurales inmaduras (neuritas) vía modulación de la ERK²⁹². Por el contrario, otros estudios han informado de un efecto antioxidante del DHA. Primero, el DHA reduce la síntesis de ERO en células neurales C6 (25 μM)²³⁶, macrófagos RAW 264.7 (100 μM)²³⁴ y en células endoteliales aórticas humanas (1, 5 y 10 μM) de modo dosis-dependiente²¹⁸. Segundo, el DHA presenta un efecto neutralizador de H_2O_2 en células ganglionares de retina de modo dosis-dependiente (0,1, 1 y 10 μM)²⁹³ y un efecto neutralizador de O_2^\bullet (1, 5 y 10 μM), siendo dicho efecto superior, pero idéntico, a dosis de 5 y 10 μM ²¹⁸. Tercero, el DHA reduce el estrés oxidativo al reducir la entrada de Ca^{+2} a nivel intracelular (10 y 20 μM)²⁹⁴. Cuarto, el DHA reduce el estrés oxidativo al inducir diversas enzimas relacionadas con el estrés oxidativo. Por ejemplo, el DHA a dosis de 20 μM conlleva un incremento significativo de GSH en células hepáticas humanas HepG2, con mejora de la actividad SOD, GPx y glutatión S-transferasa (GST) ($p < 0,05$), y no así de la actividad CAT²²⁴. En células de fibroblastos humanos se ha observado que la suplementación de DHA a dosis de 5, 15, 30 y 60 μM induce la síntesis de GSH por inducción de enzimas reguladoras del pool intracelular de GSH: GR, *gamma*-glutamil-cisteinil ligasa y hemooxigenasa 1; aunque se produjo una reducción de GSH hasta las 8 h, a las 24 y 48 h se observó un incremento significativo de la misma ($p < 0,01$). Asimismo, se observó que la dosis de 30 μM supuso un incremento significativo de DHA en membrana, con menor aumento de EPA y reducción de ARA²⁹⁵. Además, en células megacariobásticas humanas (MEG-01) se ha observado un incremento significativo de la expresión de GPx1 (10 y 100 μM), y GPx4 y CAT (100 μM) por expresión al alza del ARNm para PPAR β/δ y PPAR- γ ²⁹⁶. En macrófagos RAW 264.7 también se ha demostrado reducción de la expresión de la iNOS con dosis de 100 μM sin neutralización del NO^\bullet ²³⁴. Por último, en células epiteliales del pigmento de retina humano se ha informado que un subproducto del DHA, la NPD1, inhibe la activación de la vía de la caspasa-3 inducida por estrés oxidativo, lo que demuestra un efecto antioxidante indirecto del DHA²⁹⁷. Sin embargo, otros estudios no muestran

modificación del estrés oxidativo. En células de músculo liso arterial coronario humano sometidas a hipoxia y reoxigenación, el uso de dosis de 1, 3, 10 y 30 μM ni incrementa ni reduce la síntesis de ERO y $\text{NO}\bullet^{231}$. De forma similar, en células de trofoblastos se ha constatado que dosis de 1 y 10 μM no suponen un incremento de MDA, pero reducen de forma significativa la 8-OHdG; a dosis de 100 μM no se produce una reducción significativa de la 8-OHdG y sí un incremento significativo de MDA²³³.

5.2.2 Modelos animales

Los estudios en modelos animales también han mostrado resultados contradictorios en lo que respecta al incremento de peroxidación lipídica por incremento del índice de insaturación en membranas plasmáticas.

Por un lado, el contenido de DHA en la dieta de ratas Sprague-Dawley influye en el grado de peroxidación lipídica. Así, cantidades variables de DHA (0, 1,0, 3,4 y 8,7% de kcal totales) durante 14 días conllevaron un incremento dosis-dependiente de TBARS a nivel renal, sin modificación del contenido de GSH y de actividad GPx. Sin embargo, los niveles de TBARS a nivel hepático en el grupo 8,7% no fueron superiores a los del grupo 3,4%, incumpliendo así el índice de peroxidabilidad, pero se generó un incremento significativo de GSH ($p<0,05$) y actividad GPx ($p<0,05$) a dosis de 8,7%. Además, en un segundo experimento en el que se empleó una cantidad única de DHA (8,7%) con dosis variable de vitamina E (54, 134 y 402 mg/kg) durante 15 días se observó un contenido de GSH superior y una actividad GPx menor, ambos estadísticamente significativos ($p<0,05$), en comparación con el grupo control, sin influencia de la dosis de vitamina E empleada. Por el contrario, a nivel renal se determinó, de forma significativa ($p<0,05$), un contenido de GSH mayor y una actividad GPx reducida dependiente de la dosis de vitamina E²⁹⁸.

De igual forma, una dieta con un contenido de 50 g/kg de AGPI n-3 (9,6% EPA y 10,2% DHA), en comparación con una dieta con 50 g/kg de n-6, a igual consumo de vitamina E (59 mg/kg dieta seca) supone un mayor grado de peroxidación lipídica (TBARS) al tratar *ex vivo* células hepáticas de ratas Wistar con 10 μM de H_2O_2 ($p<0,01$). Las células de los animales alimentados con aceite de pescado que no fueron sometidas a estrés oxidativo presentaron un mayor

contenido de TBARS en comparación con las células de animales alimentadas con una dieta rica en AGPI n-6, pero tras su exposición a 10 μM de H_2O_2 , la formación de 8-OHdG fue inferior en el grupo con alto contenido en AGPI n-3. Con respecto a la 8-OHdG, los autores sugirieron que una mayor peroxidación lipídica podría en sí reducir el daño oxidativo al ADN, siempre y cuando la ingesta de los AGPI n-3 vaya acompañada de vitamina E²³⁵.

Por último, se ha sugerido que el contenido de vitamina E en los suplementos de aceite de pescado influye en la producción de MDA. Así, el uso de un suplemento de aceite de pescado con 0,75 IU d- α -tocoferol/g en dosis de 5% (28,0% DHA y 7,7% EPA) durante 10 semanas en ratas Sprague-Dawley incrementó de forma significativa los niveles plasmáticos de MDA²⁹⁹.

Por el contrario, otros estudios en modelos animales han demostrado un efecto antioxidante del DHA. En ratas Sprague-Dawley embarazadas, la suplementación con DHA a dosis de 2,5 mg/kg peso corporal durante 19 días incrementó significativamente la actividad SOD a nivel hepático y cerebral, además de la GPx hepática y CAT cerebral, con síntesis de $\text{NO}\bullet$ reducida a nivel hepático²³⁶. En ratas Sprague-Dawley también se ha demostrado un incremento significativo ($p < 0,01$) de la actividad SOD en plasma al emplear un suplemento de aceite de pescado (19% EPA y 13% DHA) en la semana 1 y 3 postconsumo *ad libitum*³⁰⁰. Asimismo, en ratas Sprague-Dawley, con o sin exposición a un agente prooxidante (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina), el uso de 250 mg DHA/kg de peso corporal en ratas no expuestas supuso un incremento significativo de SOD, CAT, GPx y GSH a nivel hepático; además, cuando las ratas fueron expuestas al agente oxidante se originó una reducción significativa del efecto reductor del oxidante sobre las enzimas antioxidantes endógenas²³⁷. En ratas Sprague-Dawley el uso de suplementos de aceite de pescado (28,0% de DHA y 7,7% de EPA; 17,4% de EPA y 11,7% de DHA), que suponen una suplementación del 5% p/p, con antioxidantes (3,50 IU d- α -tocoferol/g), durante 10 semanas no supuso un incremento de los niveles de MDA e incrementó la actividad de la NOS a nivel cerebral²⁸⁹. Con respecto a ratas Wistar, el consumo de 0,4 g/kg/d de aceite de pescado (18% EPA y 12% DHA) durante 30 días supuso un incremento significativo de la actividad plasmática de SOD ($p < 0,001$), sin modificación de las actividades GPx y XO, y reducción de los niveles plasmáticos de TBARS ($p < 0,05$); según los autores, el incremento de actividad SOD podría suponer mayor

resistencia al ataque de los RL y, por tanto, reducir la peroxidación lipídica³⁰¹; la aplicación del mismo diseño de estudio, pero con aportación del aceite de pescado vía sonda, supuso reducción de MDA ($p < 0,005$), incremento de actividad CAT ($p < 0,0001$) y menores niveles de NO^\bullet ($p < 0,002$), todos resultados estadísticamente significativos, a nivel eritrocitario; sin embargo, no hubo modificación de actividad SOD y GPx³⁰². Asimismo, también se ha evaluado el efecto sobre las enzimas endógenas al introducir AGPI n-3 en matriz alimentaria. El consumo de leche en polvo con adición de 7 mg/g de EPA y DHA durante 60 días en ratas Wistar supuso un incremento significativo en actividad CAT, pero no significativo en SOD, una reducción de actividad GPx (25-36%) e incremento de la actividad GST (34-39%); sin embargo, se observó un incremento de peróxidos lipídicos en hígado (112%) y plaquetas (355%)³⁰³. Además, un estudio *ex vivo* en raíz aórtica de ratones apoE^{-/-} demostró que el uso de aceite de sábalo atlántico (14,0 mol% EPA, 9,2 mol% DHA), que corresponde al 5% de las calorías, redujo de forma significativa ($p < 0,05$) la producción de O_2^\bullet por parte del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa a las 14 y 20 semanas de tratamiento, no así a las 8 semanas. Además, se determinó un incremento significativo de la generación de NO^\bullet (30%) en comparación con el grupo control (aceite de maíz) a las 14 ($p < 0,01$) y 20 semanas ($p < 0,05$) debido al incremento también significativo de la expresión de eNOS en las semanas 14 ($p < 0,01$) y 20 ($p < 0,05$), y no así de la iNOS (inducible por estrés oxidativo), que descendió significativamente en las semanas 14 ($p < 0,05$) y 20 ($p < 0,05$), justificando este descenso la ausencia de estrés oxidativo; aunque se observaron niveles superiores de grupos carbonilos y MDA a las 8 semanas de consumo, a las 20 semanas el incremento se vio reducido, lo que según los autores podría ser debido a que los productos de peroxidación lipídica a dosis subletales inducen una adaptación celular y una mejora en la tolerancia contra el estrés oxidativo subsecuente mediante regulación al alza de sistemas antioxidantes³⁰⁴.

Por último, en modelos animales en situación patológica también se ha observado un efecto antioxidante del DHA. Así, en ratas Wistar diabéticas alimentadas con una dieta rica en grasa, la suplementación con aceite de pescado (DHA:EPA 5:1; 3% de calorías diarias) durante 4 semanas generó a nivel hepático una reducción significativa de los niveles de TBARS ($p < 0,05$), del ratio enzimático SOD/CAT ($p < 0,05$) y del contenido de CAT ($p < 0,05$), e incremento de los niveles

de SOD2 ($p < 0,05$), sin modificación en los niveles de grupos carbonilos²³⁸. Además, en ratas Wistar con diabetes gestacional se informó de que una dieta rica en AGPI n-3 (22,2 g de EPA y 2 g de DHA) conlleva en las crías nacidas una reducción de los contenidos de LOOH y grupos carbonilos en comparación con una dieta rica en AGPI n-6 (21,3 g) tanto en el día de nacimiento como a los 90 días de edad³⁰⁵.

5.2.3 Modelos humanos

Con respecto a los estudios en humanos, los datos disponibles tampoco son concluyentes. Así, se ha informado de efecto prooxidante, ausencia de modificación sobre marcadores de estrés oxidativo y efecto antioxidante.

En pacientes que iban a ser sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea ($n=95$), la suplementación con 2 g/d de AGPI n-3 (DHA:EPA 2:1) durante 5 días supuso un incremento significativo de los niveles de MDA ($p < 0,05$) en comparación con los valores basales y con el grupo placebo pero al añadir al tratamiento experimental un consumo diario de 1 g de vitamina C más 400 UI de vitamina E durante los 2 días previos a la intervención se observó que ambos grupos presentaban valores similares de MDA. Por el contrario, tras la intervención (6-8 h) y a los 5 días, el grupo placebo exhibió unos niveles significativamente superiores de MDA ($p < 0,01$) respecto a los niveles basales y a los valores observados en el grupo experimental³⁰⁶.

En una muestra de 40 adultos sanos (22 hombres y 18 mujeres) se evaluó el efecto de distintas dosis de AGPI n-3 (1,4 g de EPA y 1,1 g de DHA; 2,7 g de EPA y 2,4 g de DHA; 4,1 g de EPA y 3,6 g de DHA; placebo), con ingesta idéntica de α -tocoferol (0,3 mg), a los 30 y 180 días de consumo. Así, a los 30 días se observó una reducción estadísticamente significativa de los niveles de MDA en membrana eritrocitaria en los grupos de dosis media y superior ($p < 0,01$); sin embargo, a los 180 días se mostró un incremento significativo, dosis-dependiente, de MDA ($p < 0,05$). Respecto al contenido de α -tocoferol en membrana eritrocitaria, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) para dosis media y máxima a los 30 días; según los autores esto pudo ser debido a un mecanismo de homeostasis para mantener una concentración adecuada de vitamina E con el objetivo de evitar el incremento de la peroxidación derivada de la elevación del contenido de n-3 en la

membrana. Por el contrario, a los 180 días, se observó que los niveles de α -tocoferol volvían a valores basales, lo que según los autores se pudo deber a su consumo en la membrana derivado del incremento de estrés oxidativo²³⁹.

En mujeres normocolesterolémicas, el consumo de 2,4 g/d de EPA y DHA (42,23 y 23,72%, respectivamente), y 4,8 mg de tocoferoles, durante 6 semanas generó un incremento significativo de MDA en plasma ($p < 0,003$) y de la actividad SOD ($p < 0,014$), una reducción de la expresión de CAT ($p < 0,013$), un incremento de la expresión de SOD ($p < 0,033$) y ausencia de modificación de la capacidad antioxidante total del plasma. Por el contrario, en mujeres dislipémicas tratadas con estatinas, dicha cantidad de EPA y DHA supuso una reducción no significativa de MDA, y actividad SOD y CAT²⁴⁰. Asimismo, se ha evaluado el efecto sobre los niveles de TBARS al introducir AGPI n-3 en matriz alimentaria. El consumo de leche enriquecida con AGPI n-3 (500 mg de DHA y 150 mg de EPA por día) en mujeres embarazadas, suplementadas o no con ácido fólico, desde la semana 22 de embarazo supuso un incremento significativo de los niveles plasmáticos de TBARS en la semana 30 ($p < 0,042$) y en el momento del parto ($p < 0,030$) en comparación con sus respectivos grupos control. Además, se observó que, al contrario que en los grupos suplementados con AGPI n-3, los niveles de TBARS entre la semana 20 y 30 se reducían significativamente en los grupos sin consumo de leche suplementada ($p < 0,001$)³⁰⁷.

Por último, se ha informado de que en mujeres posmenopáusicas, la suplementación con 2,5 g/d de EPA y 1,8 g de DHA sin vitamina E durante 5 semanas genera un incremento significativo de TBARS en plasma ($p < 0,0001$) pero al introducir distintas cantidades de acetato de α -tocoferol (100, 200 y 400 mg) no hubo modificaciones en dicho marcador al comparar grupos. Por el contrario, con independencia de la presencia y la dosis de vitamina E no se produjo modificación de la concentración de grupos carbonilos³⁰⁸.

Sin embargo, muchos son los estudios que han observado ausencia de modificación de marcadores de estrés oxidativo. Un estudio a corto plazo demostró que una comida rica en grasa y fructosa en individuos con sobrepeso u obesidad ($n=10$) no supuso un incremento significativo de LOOH y LDL oxidada en las 2, 4 y 6 h postingesta, y sí un incremento significativo del status antioxidante total en los momentos 2 y 4 h postingesta³⁰⁹.

En mujeres postmenopáusicas veganas y lactoovovegetarianas (n=25) no se observó que el consumo de 2,14 g/d de DHA, en forma de TAG (algas), durante 6 semanas conllevara diferencia significativa en los niveles urinarios de isoprostanos F₂²⁴¹. Un estudio aleatorizado, controlado y doble ciego exhibió ausencia de modificación en la excreción urinaria de MDA y 8-OHdG en mujeres embarazadas (n=46) que consumieron leche en polvo enriquecida con AGPI n-3 (500 mg de DHA y 150 mg de EPA por día) desde la semana 20 de embarazo hasta el momento de dar a luz²³³.

Asimismo, en un estudio desarrollado en 74 individuos sanos, sin grupo control, se observó que el consumo de 2,3 g/d de DHA durante 6 semanas (n=25) no modificó los niveles de MDA pero sí redujo los niveles de LOOH a nivel eritrocitario. Sin embargo, aunque no se observó modificación de la capacidad antioxidante total del plasma ni de los niveles de ácido úrico, los niveles plasmáticos de MDA se incrementaron de forma significativa (p<0,001) y se produjo una reducción significativa de vitamina C, reducción que pudo ser debida, según los autores, a su consumo durante el proceso oxidativo²⁸⁵.

En sujetos sanos (n=115) con niveles normales o ligeramente elevados de CT sérico (<7,5 mmol/L) y de TAG (<4,0 mmol/L) también se ha observado que la suplementación con aceite de pescado (864 mg/d de EPA y DHA) o aceite de krill (543 mg/d de EPA y DHA) durante 7 semanas no supuso una modificación de los niveles urinarios del marcador de peroxidación lipídica 8-iso-prostaglandina F₂ *alfa* (8-iso-PGF₂ α)²⁴². Otro estudio doble ciego y placebo controlado en pacientes con fibrosis quística (n=19) mostró que el consumo de DHA a dosis de 50 mg/kg peso (1,0-4,2 g/d) en forma de TAG (algas) durante 6 meses no modificó la concentración plasmática de varios antioxidantes liposolubles (luteína, zeaxantina, criptoxantina, licopeno, α y β -caroteno, retinol, retinil-palmitato, y α y γ -tocoferol), lo que demuestra, según los autores, que los niveles incrementados de DHA no causan estrés oxidativo al no incrementar la depleción de antioxidantes liposolubles²⁸⁴.

En pacientes con síndrome metabólico se evaluó la influencia del tipo y cantidad de grasa dietética, y se observó que una dieta con bajo contenido en hidratos de carbono suplementada con 1,24 g/d de DHA durante 12 semanas no supuso modificación en los niveles urinarios de la 8-iso-PGF₂ α en comparación

con una dieta rica en grasas (38%) sin suplemento de AGPI n-3 o con dos dietas ricas en hidratos de carbono y con un contenido en grasa dietética del 28%³¹⁰.

Además, el consumo diario de 41,4 mg de EPA y 36,8 mg de DHA por kg de peso durante 6 meses en pacientes pediátricos con cardiomiopatía dilatada (n=18) no conllevó una reducción significativa en la actividad SOD y CAT eritrocitaria, modificación de la capacidad antioxidante total del plasma ni incremento en plasma de la 8-iso-PGF2 α ²⁴³.

Por último, diversos estudios han informado del efecto antioxidante del DHA en diferentes situaciones. En sujetos sanos sometidos a restricción calórica (30%) para la pérdida de peso corporal se ha estudiado la influencia de la introducción de consumo de bacalao (227 \pm 29 mg/d de AGPI n-3), salmón (1418 \pm 34 mg/d de AGPI n-3) y aceite de pescado (3003 \pm 128 mg/d de AGPI n-3) en una dieta idéntica en aporte de macronutrientes y fibra. Así, se observó que la dieta con bacalao fue la más efectiva en el incremento de la capacidad antioxidante total del plasma en comparación con grupo control (p<0,005) y aceite de pescado (p<0,034) pero sin diferenciación estadística al comparar con el grupo salmón. Además, los niveles de MDA sólo se redujeron significativamente en el grupo con consumo de bacalao (p<0,026) y sólo en este grupo se redujo el estrés oxidativo expresado por el índice MDA/Capacidad antioxidante total del plasma³¹¹.

En sujetos sanos de la tercera edad (n=12) se analizó la concentración urinaria de la 8-iso-PGF2 α tras el consumo diario de DHA a dosis de 200, 400, 800 y 1600 mg durante 2 semanas; así, se observó reducción significativa con 200 mg/d (p<0,05), incremento significativo con 1600 mg/d (p<0,05) y ausencia de modificación con 400 y 800 mg/d en comparación con el grupo control³¹².

En pacientes con deterioro cognitivo leve (n=25) también se ha observado una reducción significativa (p<0,05) de la concentración de MDA en membrana eritrocitaria, con incremento (p<0,05) del índice GSH/GSSG al consumir un suplemento con AGPI n-3 (720 mg de DHA y 286 mg de EPA); sin embargo, este resultado parece no ser causado exclusivamente por el contenido de AGPI n-3 ya que la melatonina tiene efecto antioxidante e incrementa la actividad de la GR²⁷⁹.

Asimismo, un estudio que evaluó el efecto de la ingesta diaria de zumo de tomate enriquecido con 250 mg de AGPI n-3/d (125 mg de EPA y 125 mg de DHA), durante 2 semanas, mostró un incremento significativo (p<0,05) de la

capacidad antioxidante total del plasma en sujetos sanos (n=18), sin modificación significativa del nivel sérico de varios antioxidantes (albúmina, bilirrubina, ácido úrico, ácido ascórbico y β -caroteno) y MDA²⁴⁴.

En fumadores (n=7), el consumo diario de un suplemento que aportó 500 mg de vitamina C, 30 mg de vitamina E, 3 mg de β -caroteno, 5 mg de vitamina B6, 10 mg de zinc, 100 μ g de selenio, 1,0 g de EPA y 1,1 g de DHA durante 34 días conllevó un incremento significativo de actividad SOD plasmática; sin embargo, se observó una tendencia incremental no significativa de los niveles urinarios de 8-OHdG, aunque esta tendencia podría derivar del incremento significativo ($p<0,05$) observado en la concentración plasmática de vitamina C³¹³, sustancia que según la dosis de consumo puede tener un efecto prooxidante¹⁰⁹.

Además, se ha investigado la relación entre los AGPI n-3 y los genes relacionados con procesos oxidativos en sujetos sanos y dislipémicos. Así, en sujetos normolipémicos (n=9), el consumo de 6 cápsulas/d de aceite de pescado (1,56 g de EPA y 1,14 g de DHA) durante 12 semanas supuso un incremento significativo de la expresión de CAT desde la semana 1 ($p<0,002$) y tras 12 semanas de consumo ($p<0,05$), y una reducción significativa ($p<0,01$) de la GPx1. En lo referente a los sujetos dislipémicos (n=7), tras 12 semanas de consumo, se observó una reducción significativa de la expresión plasmática de GPx3 ($p<0,05$) y de hemooxigenasa 1 (inducible) ($p<0,05$), una regulación a la baja de las enzimas citocromo P450 ($p<0,05$), una regulación al alza de la GR ($p<0,01$) y un incremento significativo de la expresión de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 1 ($p<0,05$); tras 1 semana de consumo se observó una reducción significativa de la expresión de eNOS e iNOS ($p<0,05$). Por último, ambos grupos mostraron un incremento significativo de la expresión de hemooxigenasa 2 (forma no inducible) ($p<0,05$) y de la SOD3 ($p<0,01$)²⁴⁵.

También se ha constatado un efecto antioxidante en pacientes patológicos. Por ejemplo, en pacientes con fallo renal crónico en hemodiálisis (n=75), el consumo de 3 g de AGPI n-3 (cantidad de EPA y DHA no indicada) durante 2 meses derivó en un incremento significativo de los niveles de SOD ($p<0,007$), GPx ($p<0,003$) y capacidad antioxidante total del plasma ($p<0,02$), y una reducción significativa de MDA ($p<0,009$)²⁴⁶. Otro estudio en pacientes de tercera edad con fallo renal crónico y dislipemia mostró un efecto similar. Así, en una muestra de 40 individuos, la suplementación con 2,1 g/d de AGPI n-3 (33% de EPA y 12% de

DHA) supuso una reducción significativa de los niveles de TBARS a los 30 ($p<0,05$) y 90 días de consumo ($p<0,01$) comparado con grupo control, y una reducción progresiva a los 30, 60 y 90 días de consumo ($p<0,01$) en comparación con los niveles basales. Asimismo, en comparación con valores basales de grupos carbonilos, se observó una reducción de los valores en los 3 tiempos ($p<0,05$, $p<0,05$ y $p<0,001$, respectivamente); sin embargo, no hubo diferencias significativas de los niveles de carbonilos en comparación con el grupo control. Además, se determinó un incremento significativo de la actividad SOD y GPx en los 3 tiempos de valoración en comparación con el grupo control, y de la actividad CAT a los 60 y 90 días con respecto al grupo control³¹⁴. En sujetos estériles con oligoastenoteratospermia idiopática ($n=211$) se ha informado que el consumo de 1,84 g/d de AGPI n-3 (1,12 g de EPA y 0,72 g de DHA) durante 32 semanas conlleva un incremento significativo de la concentración plasmática seminal de las actividades SOD y CAT ($p<0,001$)³¹⁵. En este sentido, un estudio descriptivo llevado a cabo en hombres fértiles y estériles ($n=156$) informó de que los pacientes estériles presentaban concentraciones inferiores de AGPI n-3 estadísticamente significativas ($p<0,05$), un índice n-6/n-3 significativamente superior ($p<0,001$) y valores significativamente inferiores en las actividades de SOD y CAT ($p<0,001$)³¹⁶. Otro estudio descriptivo llevado a cabo en mujeres embarazadas normotensivas y con preeclampsia ($n=115$) constató que las mujeres con preeclampsia presentaban en el perfil de AG plasmáticos menor contenido en AGPI n-3 ($p<0,01$) y DHA ($p<0,05$), mayor índice n-6/n-3 ($p<0,01$) y un contenido significativamente mayor de MDA en comparación con mujeres embarazadas normotensivas ($p<0,01$); en la membrana eritrocitaria también se observó un contenido de AGPI n-3 significativamente menor ($p<0,05$)³¹⁷.

Asimismo, se ha informado de un efecto antioxidante de los AGPI n-3 en diversas patologías al ser utilizados como tratamiento concomitante. Un estudio en diabéticos tipo II con tratamiento para hipertensión ($n=51$) mostró que el consumo diario de 4 g de DHA durante 6 semanas redujo significativamente la concentración urinaria de isoprostanos F₂ ($p<0,014$) en comparación con el consumo diario de 4,0 g de aceite de oliva³¹⁸. Un estudio cruzado en pacientes con colitis ulcerosa activa leve o moderada ($n=9$) informó de que el consumo de 4,5 g/d de AGPI n-3 (2,7 g de EPA y 1,8 g de DHA) junto a sulfasalazina, antiinflamatorio a nivel intestinal, durante 2 meses conllevó un incremento

significativo en la capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica microsomal hepática contra H_2O_2 al comparar con situación basal ($p < 0,006$) y con el grupo control ($p < 0,002$), además de una reducción en la formación plasmática de RL lipoperoxil, lo que según los autores se debe al efecto neutralizador de ER de los AGPI n-3. Sin embargo, no se observó modificación de la actividad SOD y CAT, peroxidación lipídica en membrana eritrocitaria y niveles plasmáticos de MDA³¹⁹. Por último, la suplementación con 4 g/d de aceite de pescado (0,8 g de EPA y 1,6 g de DHA) durante 12 meses en pacientes con esclerosis múltiple tratados con interferón *beta-1b*, medicamento modulador del sistema inmune, no supuso una modificación de los niveles de MDA y 4-hidroxicolesterol, y redujo de forma significativa los niveles séricos de NO y sus metabolitos (nitratos y nitritos) a los 3, 6, 9 y 12 meses de consumo al compararlos con el grupo control; según los autores, los resultados sobre NO y sus metabolitos parecen ser debidos a la reducción de los niveles séricos de las citocinas inflamatorias $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$, lo que secundariamente reduce la actividad iNOS³²⁰.

5.2.4 Estudios en deportistas

El efecto de la suplementación con AGPI n-3 en el estrés oxidativo basal e inducido por el ejercicio ha sido poco estudiado en individuos deportistas²⁴⁷⁻²⁵⁵.

El presente estudio muestra que los niveles basales de 8-OHdG relativa al peso en orina 24 h preprueba no se modificaron tras 4 semanas de consumo de DHA ($p = 0,144$) y tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los niveles basales entre los distintos grupos ($p = 0,319$). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos anteriormente por nuestro grupo²⁵⁶. Además, los resultados del presente estudio son similares a los obtenidos en otras investigaciones. Un estudio a corto plazo (7 días) demostró que el consumo diario de 540 mg de EPA y 360 mg de DHA en deportistas jóvenes no supuso una modificación en los niveles basales de MDA²⁵¹. Otros estudios con 6 semanas de consumo han demostrado resultados similares a los nuestros. El consumo diario de 2224 mg de EPA y 2208 mg de DHA (estudio cruzado) en hombres entrenados no generó elevación ($p > 0,05$) de marcadores de estrés oxidativo (grupos carbonilos, MDA y actividad de XO, H_2O_2 y $NO\bullet$)²⁴⁷. El consumo diario de 2,0 g de EPA y 0,4 g de DHA en ciclistas no supuso modificación de los niveles basales de isoprostanos

F₂²⁴⁸. En judocas entrenados no se observó incremento en los niveles basales de MDA ($p > 0,05$) tras el consumo diario de 0,6 g de EPA y 0,4 g de DHA durante 6 semanas²⁵⁰. En futbolistas se ha observado que suplementar la dieta con 1,14 g/d de DHA durante 8 semanas tampoco supone una modificación de los niveles basales de MDA y grupos carbonilo en células mononucleares de sangre periférica^{252,253} o un incremento en la producción de H₂O₂ por parte de éstas al ser tratadas *ex vivo* con sustancias generadoras de ERO²⁵². Por último, solo un estudio analizó el daño oxidativo al ADN en situación basal, pero en neutrófilos, y obtuvo resultados similares a los nuestros. Así, el consumo diario de 1,3 g de EPA y 0,3 g de DHA durante 6 semanas en sujetos con actividad física recreacional, pero no entrenados, no supuso modificación del daño oxidativo al ADN y de los niveles de grupos carbonilos y TBARS²⁵⁵.

En lo que respecta al daño al ADN inducido por el ejercicio, nuestro grupo de investigación observó que el consumo diario de 2,1 g de DHA y 0,3 g de EPA no supuso una modificación de los niveles de MDA plasmático tras 2 semanas de consumo y conllevó una disminución no significativa tras 3 meses de ingesta. Con respecto a la concentración de 8-OHdG en orina resultante de la prueba de esfuerzo, en relación al peso y a la excreción de creatinina, se observó un incremento no significativo tras 2 semanas y 3 meses de consumo. Además, los niveles de 8-OHdG en la micción posterior a las pruebas de esfuerzo fueron estadísticamente inferiores ($p < 0,009$) en ambos tiempos²⁵⁶. Por ello, el presente estudio se planteó con el objetivo general de evaluar la capacidad antioxidante del DHA consumido a distintas dosis durante 4 semanas en ciclistas no profesionales. Los resultados del presente estudio en lo que respecta al daño al ADN inducido por el ejercicio mostraron un incremento significativo en el grupo placebo ($p < 0,001$) y en el grupo de sujetos que consumieron 350 mg/d de DHA ($p < 0,003$). Por el contrario, se observó un efecto protector del DHA frente al daño oxidativo al ADN inducido por la prueba de esfuerzo tras el consumo diario de dosis iguales o superiores a 1050 mg. Asimismo, este efecto fue mayor a medida que se incrementó la dosis de DHA (efecto dosis-respuesta) y se determinó que el consumo diario de 2450 mg neutralizó totalmente el daño oxidativo al ADN inducido por la prueba de esfuerzo.

Tras la revisión bibliográfica desarrollada no se ha encontrado ninguna publicación que relacione dosis de DHA con daño oxidativo al ADN inducido por

el ejercicio. Sólo un estudio ha relacionado la ingesta de AGPI n-3 con el daño oxidativo al ADN pero, primero, el daño analizado fue en ADN de linfocitos, segundo, la dosis de EPA y DHA es distinta a la empleada en nuestro estudio y, tercero, el estrés oxidativo se consiguió mediante un protocolo de ejercicio excéntrico. Sin embargo, este estudio demostró un daño al ADN de linfocitos, estimulado *ex vivo* con H₂O₂, significativamente menor ($p < 0,05$) inmediatamente tras el ejercicio²⁵⁵. Asimismo, el consumo diario de 540 mg de EPA y 360 mg de DHA durante 7 días en deportistas jóvenes sometidos a un ejercicio excéntrico agudo de alta intensidad, aunque no supuso diferencias entre grupo experimental y control con respecto a la concentración de MDA postejercicio, sí originó un patrón de cambio significativamente superior en los niveles de MDA a las 24 h del ejercicio en el grupo placebo ($p = 0,11$)²⁵¹. En este sentido, en futbolistas sometidos a un entrenamiento de 2 h, con intensidad del 70% del VO_{2max} durante más de la mitad del entrenamiento, se ha observado que suplementar la dieta con 1,14 g/d de DHA durante 8 semanas supuso una menor producción de H₂O₂ estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en células mononucleares de sangre periférica tras tratamiento con sustancias generadoras de ERO²⁵², lo que según los autores sugiere que el DHA podría reducir la producción de ERO tras la estimulación inmune; sin embargo, en un estudio posterior la suplementación con 1,14 g/d DHA durante 8 semanas no supuso una reducción significativa de los niveles de producción de ER por parte de los neutrófilos, sino un incremento de la velocidad de respuesta de los neutrófilos al ser estimulados *ex vivo*²⁵⁴. En la misma población de estudio también se ha observado que la suplementación con 1,14 g/d DHA durante 8 semanas supuso un incremento de la PGE₂, lo que demuestra un efecto antiinflamatorio del DHA postejercicio²⁵³ que, de forma secundaria, podría reducir la peroxidación lipídica o el daño oxidativo al ADN de células sanguíneas periféricas⁵¹ como consecuencia de la infiltración de los tejidos afectados (por ejemplo, músculo) por parte de los neutrófilos y otras células fagocíticas¹⁹.

Por el contrario, los datos obtenidos en nuestro estudio difieren de los resultados observados en otras investigaciones, lo que puede ser debido a las diferencias en los protocolos de estudio, en la duración de la suplementación, en el porcentaje de AGPI n-3 del suplemento empleado, en los momentos de valoración, en los marcadores de estrés oxidativo empleados y en el nivel de

estado de forma de los sujetos a estudio. El consumo diario de 2224 mg de EPA y 2208 mg de DHA (estudio cruzado) en hombres entrenados durante 6 semanas supuso un incremento significativo ($p < 0,05$) de marcadores de estrés oxidativo (actividad de XO y niveles de H_2O_2) en respuesta a un ejercicio de carrera cuesta arriba de 60 min²⁴⁷. En ciclistas sometidos a 3 h de entrenamiento, durante 3 días consecutivos, el consumo previo de 2,0 g de EPA y 0,4 g de DHA durante 6 semanas conllevó un 53% de incremento de los niveles basales de isoprostanos F_2 ($p < 0,01$)²⁴⁸. De forma similar, en judocas sometidos a un entrenamiento de tipo anaeróbico (85-90% VO_{2max}) de 2 h, el consumo diario de 0,6 g de EPA y 0,4 g de DHA durante 6 semanas supuso un incremento de significativo ($p < 0,05$) en la producción de NO^\bullet , lo que justifica el incremento de los niveles de marcadores de estrés oxidativo (MDA, dienos conjugados y LOOH); sin embargo, cuando se añadió 30 mg de vitamina E, 60 mg de vitamina C y 6 mg de β -caroteno se produjo una reducción significativa de dienos conjugados ($p < 0,01$) y LOOH ($p < 0,05$) en comparación con grupo control²⁴⁹.

5.3 SEGURIDAD DEL PRODUCTO EXPERIMENTAL

En relación con los cambios metabólicos sistémicos evaluados no se observaron alteraciones en la funcionalidad renal o hepática, así como tampoco se observaron alteraciones en el perfil lipídico o en el componente celular sanguíneo. Estos datos están en consonancia con otros estudios que han mostrado un correcto perfil de seguridad en la suplementación con AGPI n-3^{284,321}.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis, tras el consumo diario de DHA a distintas dosis durante 4 semanas en ciclistas no profesionales, se pueden formular las siguientes conclusiones:

1. La ingesta de dosis iguales o superiores a 1050 mg disminuye el daño oxidativo al ADN generado durante un ejercicio de elevada intensidad y larga duración.
2. La disminución de daño oxidativo al ADN generado durante un ejercicio de elevada intensidad y larga duración es dosis-dependiente para las ingestas comprendidas entre 350 y 2450 mg.
3. El consumo de una dosis de 2450 mg neutraliza totalmente el daño oxidativo al ADN generado durante un ejercicio de elevada intensidad y larga duración.
4. La ingesta de dosis comprendidas entre 350 y 2450 mg no incrementa el daño oxidativo al ADN en estado basal.
5. El consumo de dosis comprendidas entre 350 y 2450 mg incrementa, de forma dosis-dependiente, los niveles de DHA en membrana eritrocitaria.
6. La ingesta de una dosis comprendida entre 1750 y 2450 mg supone un incremento dosis-dependiente de los niveles de EPA en membrana eritrocitaria.
7. El consumo de dosis comprendidas entre 1050 y 2450 mg genera un descenso de los niveles de ARA en membrana eritrocitaria.
8. La ingesta de dosis comprendidas entre 350 y 2450 mg no genera alteraciones en la funcionalidad renal y hepática, perfil lipídico y componente celular sanguíneo.

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36(4):327-58.
2. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Jun;25(3):287-99.
3. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91:S14-22.
4. Knez WL, Coombes JS, Jenkins DG. Ultra-endurance exercise and oxidative damage: implications for cardiovascular health. *Sports Med.* 2006;36(5):429-41.
5. Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology.* 2011 Apr;21(4):401-9.
6. Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts LJ II. Isoprostane generation and function. *Chem Rev.* 2011 October 12;111(10):5973-96.
7. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan;5(1):9-19.
8. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617-31.
9. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008;38(7):579-606.
10. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011 Jun 3;711(1-2):193-201.
11. Gomez-Cabrera MC, Viña J, Ji LL. Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. *Phys Sportsmed.* 2009 Dec;37(4):116-23.

12. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*. 2012;2012:645460.
13. Zinkevich NS, Gutterman DD. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signalling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Sep;301(3):H647-53.
14. Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:756132.
15. Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB. Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2010 Feb;20(1):2-14.
16. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(2):231-55.
17. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*. 2005;35(12):1045-62.
18. Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Drust B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Med*. 2009;39(8):643-62.
19. Rietjens SJ, Beelen M, Koopman R, Van Loon LJ, Bast A, Haenen GR. A single session of resistance exercise induces oxidative damage in untrained men. *Med Sci Sports Exerc*. 2007 Dec;39(12):2145-51.
20. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exerc Immunol*. 1999;5:22-56.
21. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*. 2011 Apr;1(2):941-69.
22. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang R. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Aug;10(8):1343-74.

23. Hwang ES, Bowen PE. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2007;47(1):27-50.
24. Mello LD, Kubota LT. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta.* 2007 Apr 30;72(2):335-48.
25. Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008 May;10(5):891-937.
26. Jena NR. DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *J Biosci.* 2012 Jul;37(3):503-17.
27. Jalal S, Earley JN, Turchi JJ. DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 15;17(22):6973-84.
28. Gredilla R, Garm C, Stevnsner T. Nuclear and mitochondrial DNA repair in selected eukaryotic aging model systems. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:282438.
29. Archana M, Bastian, Yogesh TL, Kumaraswamy KL. Various methods available for detection of apoptotic cells – a review. *Indian J Cancer.* 2013 Jul-Sep;50(3):274-83.
30. Yan LJ, Forster MJ. Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011 May 15;879(17-18):1308-15.
31. Bartsch H, Arab K, Nair J. Biomarkers for hazard identification in humans. *Environ Health.* 2011 Apr 5;10 Suppl 1:S11.
32. Speed N, Blair IA. Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Dec; 30(3-4):437-47.
33. Zimniak P. Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic Biol Med.* 2011 September 15;51(6):1087-105.
34. Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I. Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta.* 2012 Oct 9;413(19-20):1446-53.

35. Yung S, Chan TM. Pathophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of hyaluronan. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:180594.
36. Nikolaidis MG, Kyparos A, Spanou C, Paschalis V, Theodorou AA, Vrabas IS. Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *J Exp Biol.* 2012 May 15;215(Pt 10):1615-25.
37. Çakir-Atabek H, Demir S, Pinarbaşı RD, Gündüz N. Effects of different resistance training intensity on indices of oxidative stress. *J Strength Cond Res.* 2010 Sep;24(9):2491-7.
38. Fisher-Wellman K, Bell HK, Bloomer RJ. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2009 Jan-Mar;2(1):43-51.
39. Corbi G, Conti V, Russomanno G, Rengo G, Vitulli P, Ciccarelli AL, et al. Is physical activity able to modify oxidative damage in cardiovascular aging? *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:728547.
40. Jackson MJ, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2007 Apr;102(4):1664-70.
41. Jackson, MJ. Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Nov 1;15(9):2477-86.
42. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 2011 Apr;1(2):941-69.
43. Shi M, Wang X, Yamanaka T, Ogita F, Nakatani K, Takeuchi T. Effects of anaerobic exercise and aerobic exercise on biomarkers of oxidative stress. *Environ Health Prev Med.* 2007 Sept;12(5):202-8.
44. Powers SK, Talbert EE, Adhietty PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol.* 2011 May;589(Pt 9):2129-38.

45. Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*. 2010 Jan;95(1):1-9.
46. Trebak M, Ginnan R, Singer HA, Jourdain D. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Mar 1;12(5):657-74.
47. Kang C, Ji LL. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Oct;1271:110-7.
48. McConell GK, Rattigan S, Lee-Young RS, Wadley GD, Merry TL. Skeletal muscle nitric oxide signalling and exercise: a focus on glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Aug 1;303(3):e301-7.
49. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Ji LL, Viña J. Exercise as an antioxidant: it up-regulates important enzymes for cell adaptations to exercise. *Sci Sport*. 2006 Apr;21(2):85-9.
50. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009 Jan 13;8:1.
51. Neubauer O, Reichhold S, Nersesyan A, König D, Wagner KH. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses? *Exerc Immunol Rev*. 2008;14:51-72.
52. Davison GW, Hughes CM, Bell RA. Exercise and mononuclear cell DNA damage: the effects of antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2005 Oct;15(5):480-92.
53. Zembron-Lacny A, Slowinska-Lisowska M, Szygula Z, Witkowski K, Stefaniak T, Dziubek W. Assessment of the antioxidant effectiveness of α -lipoic acid in healthy men exposed to muscle-damaging exercise. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Jun;60(2):139-43.
54. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1243-76.
55. Clanton TL. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2007 Jun;102(6):2379-88.

56. Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012 Sep;3(3):163-79.
57. Powers SK, Smuder AJ, Criswell DS. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Nov 1;15(9):2519-28.
58. Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2011 Jan;110(1):264-74.
59. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*. 2008 Jan;7(1):34-42.
60. Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, Robin S, Fabre C. Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. *PLoS One*. 2014;9(3):e90420.
61. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:936486.
62. Pittaluga M, Parisi P, Sabatini S, Ceci R, Caporossi D, Catani MV, et al. Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radic Res*. 2006 Jun;40(6):607-14.
63. Nakatani K, Komatsu M, Kato T, Yamanaka T, Takekura H, Wagatsuma A, et al. Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. *Free Radic Res*. 2005 Sep;39(9):905-11.
64. Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):142-52.
65. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med*. 2011 Sep 1;51(5):942-50.
66. Ookawara T, Haga S, Ha S, Oh-Ishi S, Toshinai K, Kizaki T, et al. Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. *Free Radic Res*. 2003 Jul;37(7):713-9.

67. Jackson MJ, McArdle A. Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species. *J Physiol*. 2011 May 1;589(Pt 9):2139-45.
68. Paulsen G, Cumming KT, Holden G, Hallén J, Rønnestad BR, Sveen O, et al. Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind randomized controlled trial. *J Physiol*. 2014 Mar 10;1-15.
69. Halliwell B, Gutteridge JC. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:125-6.
70. Doria E, Buonocore D, Focarelli A, Marzatico F. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:830257.
71. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signalling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 5;15(6):1583-606.
72. Da Costa LA, Badawi A, El-Sohemy A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Ann Nutr Metab*. 2012;60 Suppl 3:27-36.
73. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutr Res*. 1995 May;15(5):755-66.
74. Céspedes-Cabrera T, Sánchez-Serrano D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol*. 2000;14(1):55-60.
75. Ferreira LF, Reid MB. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol*. 2008 Mar;104(3):853-60.
76. Méplan C, Hesketh J. The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk. *Mutagenesis*. 2012 May;27(2):177-86.
77. Handy DE, Lubos E, Yang Y, Galbraith JD, Kelly N, Zhang YY, et al. Glutathione peroxidase-1 regulated mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J Biol Chem*. 2009 May 1;284(18):11913-21.

78. Bindoli A, Fukuto JM, Forman HJ. Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Sep;10(9):1549-64.
79. Chae HZ, Oubrahim H, Park JW, Rhee SG, Chock PB. Protein glutathionylation in the regulation of peroxiredoxins: a family of thiol-specific peroxidases that function as antioxidants, molecular chaperones, and signal modulators. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Mar 15;16(6):506-23.
80. Lee BC, Dikiy A, Kim HY, Gladyshev VN. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Nov;1790(11):1471-7.
81. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med*. 2009 Jan-Feb;15(1-2):43-50.
82. Silva IT, Mello AP, Damasceno NR. Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂): a review. *Lipids Health Dis*. 2011;10:170.
83. Shang F, Taylor A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 1;51(1):5-16.
84. Evans MD, Sapparbaev M, Cooke MS. DNA repair and the origins of urinary oxidized 2'-deoxyribonucleosides. *Mutagenesis*. 2010 Sep;25(5):433-42.
85. Hafez M, Hausner G. Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome*. 2012 Aug;55(8):553-69.
86. Matteucci E, Giampietro O. Thiol signalling network with an eye to diabetes. *Molecules*. 2010 Dec 6;15(12):8890-903.
87. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):1149-60.

88. Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):849-58.
89. Peternej TT, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Med.* 2011;41(12):1043-69.
90. Han T, Bai J, Liu W, Hu Y. A systematic review and meta-analysis of α -lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. *Eur J Endocrinol.* 2012 Oct;167(4):465-71.
91. Quinzii CM, Hirano M. Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Dev Disabil Res Rev.* 2010 Jun;16(2):183-8.
92. Artuch R, Salviati L, Jackson S, Hirano M, Navas P. Coenzyme Q10 deficiencies in neuromuscular diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2009;652:117-28.
93. Kizhakekuttu TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovasc. Ther.* 2010 Aug;28(4):e20-32.
94. Morelli M, Carta AR, Kachroo A, Schwarzschild MA. Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate. *Prog. Brain. Res.* 2010;183:183-208.
95. Álvarez-Lario B, Macarrón-Vicente J. Uric acid and evolution. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Nov;49(11):2010-5.
96. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *J. Clin. Invest.* 2010 Jun;120(6):1791-9.
97. Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Aug;1800(8):783-92.
98. Altamura C, Squitti R, Pasqualetti P, Gaudino C, Palazzo P, Tibuzzu F, et al. Ceruloplasmin/transferring system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke.* 2009 Apr;40(4):1282-8.
99. Tapryal N, Mukhopadhyay C, Das D, Fox PL, Mukhopadhyay CK. Reactive oxygen species regulate ceruloplasmin by a novel mRNA

- decay mechanism involving its 3'-untranslated region: implications in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem*. 2009 Jan 16;284(3):1873-83.
100. Arroyo V, Fernandez J. Pathophysiological basis of albumin use in cirrhosis. *Ann Hepatol*. 2011 May;10 Suppl 1:S6-14.
 101. Collard KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics*. 2009 Apr;123(4):1208-16.
 102. Azarov I, Liu C, Reynolds H, Tsekouras Z, Lee JS, Gladwin MT, et al. Mechanisms of slower nitric oxide uptake by red blood cells and other hemoglobin-containing vesicles. *J Biol Chem*. 2011 Sep 23;286(38):33567-79.
 103. Nielsen MJ, Møller HJ, Moestrup SK. Hemoglobin and heme scavenger receptors. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Feb;12(2):261-73.
 104. Maghzal GJ, Leck MC, Collinson E, Li C, Stocker R. Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *J Biol Chem*. 2009 Oct 23;284(43):29251-9.
 105. Zhao X, Song S, Sun G, Strong R, Zhang J, Grotta JC, Aronowski J. Neuroprotective role of haptoglobin alter intracerebral hemorrhage. *J Neurosci*. 2009 Dec 16;29(50):15819-27.
 106. Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, Vinchi F, Fiorito V. Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxid. Redox Signal*. 2010 Feb;12(2):305-20.
 107. Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med*. 2011 Sep 1;51(5):1000-13.
 108. McGinley C, Shafat A, Donnelly AE. Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage? *Sports Med*. 2009;39(12):1011-32.
 109. Margaritis I, Rousseau AS. Does physical exercise modify antioxidant requirements? *Nutr Res Rev*. 2008 Jun;21(1):3-12.

110. Powers S, Nelson WB, Larson-Meyer E. Antioxidant and Vitamin D supplements for athletes: sense or nonsense? *J Sports Sci.* 2011;29 Suppl 1:S47-55.
111. Khoo HE, Prasad KN, Kong KW, Jiang Y, Ismail A. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules.* 2011 Feb 18;16(2):1710-38.
112. Agarwal M, Parameswari RP, Vasanthi HR, Das DK. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules.* 2012 Apr 23;17(4):4755-69.
113. Gallicchio L, Boyd K, Matanoski G, Tao XG, Chen L, Lam TK, et al. Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):372-83.
114. OvetakinWhite P, Tribout H, Baron E. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:560682.
115. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010 Dec;2(12):1231-46.
116. Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr.* 2011 May;141(5):989-1009S.
117. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010 Oct 21;15(10):7313-52.
118. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanism of action. *Nutrients.* 2010 Nov;2(11):1106-31.
119. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Sep 1;501(1):65-72.
120. Gomez-Pinilla F, Nguyen TT. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutr Neurosci.* 2012 May;15(3):127-33.

121. Alam S, Kelleher SL. Cellular mechanisms of zinc dysregulation: a perspective on zinc homeostasis as an etiological factor in the development and progression of breast cancer. *Nutrients*. 2012 Aug;4(8):875-903.
122. Boal AK, Rosenzweig AC. Structural biology of copper trafficking. *Chem Rev*. 2009 Oct;109(10):4760-79.
123. Prohaska JR. Impact of copper limitation on expression and function of multicopper oxidases (ferroxidases). *Adv Nutr*. 2011 Mar;2(2):89-95.
124. Nikolaidis MG, Kerksick CM, Lamprecht M, McAnulty SR. Does vitamin C and E supplementation impair the favourable adaptations of regular exercise? *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:707941.
125. Lamprecht M, Hofmann P, Greilberger JF, Schwabberger G. Increased lipid peroxidation in trained men after 2 weeks of antioxidant supplementation. *Int J Sport Nut Exerc Metab*. 2009 Aug;19(4):385-99.
126. Wagner KH, Reichhold S, Neubauer O. Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jul;1229:115-23.
127. Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Feb;37(2):234-9.
128. Vannice G, Rasmussen H. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *J Acad Nutr Diet*. 2014 Jan;114(1):136-53.
129. Yamashita T. "PUFA-GPR40-CREB signalling" hypothesis for the adult primate neurogenesis. *Prog Lipid Res*. 2012 Jul;51(3):221-31.
130. O'Keefe SF. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, 3^a ed. Akoh CC y Min DB, editors. Boca Raton (FL): CRC Press; 2008.
131. Siddiqui RA, Harvey KA, Xu Z, Bammerlin EM, Walker C, Altenburg JD. Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. *Biofactors*. 2011 Nov-Dec;37(6):399-412.

132. Simopoulos AP. Omega-6/Omega-3 essential fatty acids: biological effects. In: Simopoulos AP, Bazan NG, editors. Omega-3 fatty acids, the brain and retina. Basel: Karger; 2009. p. 1-16.
133. Calder PC, Yaqoob P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med.* 2009 Nov;121(6):148-57.
134. Calder PC, Dangour AD, Diekman C, Eilander A, Koletzko B, Meijer GW, et al. Essential fats for future health. Proceedings of the 9th Unilever Nutrition Symposium, 26-27 May 2010. *Eur J Clin Nutr.* 2010 Dec;64 Suppl 4:S1-13.
135. Gogus U, Smith C. N-3 omega fatty acids: a review of current knowledge. *Int J Food Sci Tech.* 2010 Mar;45(3):417-36.
136. Rubio-Rodríguez N, Beltrán S, Jaime I, de Diego SM, Sanz MT, Carballido JR. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids concentrates: a review. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2010 Jan;11(1):1-12.
137. Muskiet FAJ, Fokkema MR, Schaafsma A, Boersma ER, Crawford MA. Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials. *J Nutr.* 2004 Jan;134(1):183-6.
138. Daley CA, Abbott A, Doyle PS, Nader GA, Larson S. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutr J.* 2010 Mar 10;9:10.
139. Weaver KL, Ivester P, Chilton JA, Wilson MD, Pandey P, Chilton FH. The content of favourable and unfavourable polyunsaturated fatty acids found in commonly eaten fish. *J Am Diet Assoc.* 2008 Jul;108(7):1778-85.
140. Kouba M, Mourot J. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie.* 2011 Jan;93(1):13-7.
141. Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr.* 2012 Mar;142(3):S592-9.

142. Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. N-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83 Suppl 6:S1526-35.
143. Carlson BA, Kingston JD. Docosahexaenoic acid, the aquatic diet, and hominin encephalization: difficulties in establishing evolutionary links. *Am J Hum Biol.* 2007 Jan-Feb;19(1):132-41.
144. Bradbury J. Docosahexaenoic acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients.* 2011 May;3(5):529-54.
145. Whelan J, Jahns L, Kavanagh K. Docosahexaenoic acid: measurements in food and dietary exposure. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 Aug-Sep;81(2-3):133-6.
146. Özogul Y, Özogul F. Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chem.* 2007;100:1634-8.
147. Philibert A, Vanier C, Abdelouahab N, Chan HM, Mergler D. Fish intake and serum fatty acid profiles from freshwater fish. *Am J Clin Nutr.* 2006 Dec;84(6):1299-307.
148. Zhang Y, Nakai S, Masunaga S. Simulated impact of a change in fish consumption on intake of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Food Comp Anal.* 2009 Nov-Dec;22(7-8):657-62.
149. Venegas-Calderón M, Sayanova O, Napier JA. An alternative to fish oils: metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2010 Apr;49(2):108-19.
150. Lenihan-Geels G, Bishop KS, Ferguson LR. Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients.* 2013 Apr;5(4):1301-15.
151. Martins DA, Custódio L, Barreira L, Pereira H, Ben-Hamadou R, Varela J, et al. Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Mar Drugs.* 2013 Jun 27;11(7):2259-81.

152. Harika RK, Eilander A, Alsema M, Osendarp SJM, Zock PL. Intake of fatty acids in general populations worldwide does not meet dietary recommendations to prevent coronary heart disease: a systematic review of data from 40 countries. *Ann Nutr Metab.* 2013;63(3):229-38.
153. Kris-Etherton PM, Grieger JA, Etherton TD. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 Aug-Sep;81(2-3):99-104.
154. FAO (Food and Agriculture Organization, IT). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper 91. Rome: FAO; 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i1953e/i1953e00.pdf>
155. Koletzko B, Uauy R, Palou A, Kok F, Hornstra G, Eilander A, et al. Dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in children – a workshop report. *Br J Nutr.* 2010 Mar;103(6):923-8.
156. Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Fahimi S, Lim S, Andrews KG, et al; Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE). Global, regional, and national consumption levels of dietary fats and oils in 1990 and 2010: a systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys. *BMJ.* 2014 Apr 15;348:g2272.
157. Harnack K, Andersen G, Somoza V. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid is affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutr Metab.* 2009 Feb 19;6:8.
158. Sakai M, Kakutani S, Horikawa C, Tokuda H, Kaawashima H, Shibata H, et al. Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. *BMC Cancer.* 2012 Dec 19;12:606-32.
159. Ortega AR, González RL, Villalobos CT, Perea SJ, Aparicio VA, López SA. Fuentes alimentarias y adecuación de la ingesta de ácidos grasos omega-3 y omega-6 en una muestra representativa de adultos españoles. *Nutr Hosp.* 2013;28(6):2236-45.

160. Kang JX, Liu A. The role of the tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio in regulation tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013 Jun;32(1-2):201-10.
161. Blasbalg TL, Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SF, Rawlings R. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr.* 2011 May;93(5):950-62.
162. Rosell MS, Lloyd-Wright Z, Appleby PN, Sanders TA, Allen NE, Key TJ. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in plasma in British meat-eating, vegetarian and vegan men. *Am J Clin Nutr.* 2005 Aug;82(2):327-34.
163. Earnest CP, Hammar MK, Munsey M, Mikus CR, David RM, Bralley JA, et al. Microencapsulated foods as a functional delivery vehicle for omega-3 fatty acids: a pilot study. *J Int Soc Sports Nutr.* 2009;6:12.
164. Cox DN, Evans G, Lease HJ. The influence of product attributes, consumer attitudes and characteristics on the acceptance of: (1) novel bread and milk, and dietary supplements and (2) fish and novel meats as dietary vehicles of long chain omega 3 fatty acids. *Food Qual Prefer.* 2011 Mar;22(2):205-12.
165. Brenna JT, Salem N, Sinclair AJ, Cunnane SC. α -linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 Feb-Mar;80(2-3):85-91.
166. Watkins SM, German JB. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, 3^a ed. Akoh CC y Min DB, editors. Boca Raton (FL): CRC Press; 2008.
167. Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res.* 2009 Nov;48(6):355-74.
168. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83(6 Suppl):S1467-76.

169. Ishak SD, Tan SH, Khong HK, Jaya-Ram A, Enyu YL, Kuah MK, et al. Upregulated mRNA expression of desaturase and elongase, two enzymes involved in highly unsaturated fatty acids biosynthesis pathways during follicle maturation in zebrafish. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008 Nov 24;6:56.
170. Kitson AP, Stroud CK, Stark KD. Elevated production of docosahexaenoic acid in females: potential molecular mechanisms. *Lipids.* 2010 Mar;45(3):209-24.
171. Gregory MK, Gibson RA, Cook-Johnson RJ, Cleland LG, James MJ. Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis. *PLoS ONE.* 2011;6(12):e29662.
172. Gibson RA, Muhlhausler B, Makrides M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr.* 2011 Apr;7 Suppl 2:17-26.
173. Decsi T, Kennedy K. Sex-specific differences in essential fatty acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 2011 Dec;94(6 Suppl):S1914-9.
174. Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res.* 2011 Oct;50(4):372-87.
175. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol.* 2009 Mar 15;77(6):937-46.
176. Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010 Aug;83(2):61-8.
177. Goyens PL, Spilker ME, Zock PL, Katan MB, Mensink RP. Conversion of α -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of α -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jul;84(1):44-53.
178. Emken E. Human studies using isotope labelled fatty acids: answered and unanswered questions. *J Oleo Sci.* 2013;62(5):245-55.

179. Welch AA, Shakya-Shrestha S, Lentjes MA, Wareham NJ, Khaw KT. Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the precursor-product ratio of α -linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *Am J Clin Nutr.* 2010 Nov;92(5):1040-51.
180. Anderson BM, Ma DW. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis.* 2009 Aug 10;8:33.
181. Burdge GC, Jones AE, Wootton SA. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α -linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr.* 2002 Oct;88(4):355-63.
182. Burdge GC, Wootton SA. Conversi3n of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr.* 2002 Oct;88(4):411-20.
183. Williams CM, Burdge G. Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc.* 2006 Feb;65(1):42-50.
184. Le HD, Meisel JA, de Meijer VE, Gura KM, Puder M. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 Aug-Sep;81(2-3):165-70.
185. Burdge GC, Calder PC. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* 2005 Sep-Oct;45(5):581-97.
186. Schuchardt JP, Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013 Jul;89(1):1-8.
187. McClements DJ, Decker EA, Park Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2009 Jan;49(1):48-67.
188. Burri L, Hoem N, Banni S, Berge K. Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities. *Int J Mol Sci.* 2012 Nov 21;13(11):15401-19.
189. Murru E, Banni S, Carta G. Nutritional properties of dietary omega-3 enriched phospholipids. *Biomed Res Int.* 2013;2013:965417.

190. von Schacky C. Omega-3 index and cardiovascular health. *Nutrients*. 2014;6:799-814.
191. Dyerberg J, Madsen P, Møller JM, Aardestrup I, Schmidt EB. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010 Sep;83(3):137-41.
192. Vandal M, Freemantle E, Tremblay-Mercies J, Plourde M, Fortier M, Bruneau J, et al. Plasma omega-3 fatty acid response to a fish oil supplement in the healthy elderly. *Lipids*. 2008 Nov;43(11):1085-9.
193. Harris WS, Pottala JV, Varvel SA, Borowski JJ, Ward JN, McConell JP. Erythrocyte omega-3 fatty acids increase and linoleic acid decreases with age: observation from 160,000 patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013 Apr;88(4):257-63.
194. Wang TY, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest*. 2013 Nov;43(11):1203-23.
195. Garaiova I, Guschina IA, Plummer SF, Tang J, Wang D, Plummer NT. A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutr J*. 2007 Jan 25;6:4.
196. Haug IJ, Sagmo LB, Zeiss D, Olsen IC, Draget KI, Seternes T. Bioavailability of EPA and DHA delivered by gelled emulsions and soft gel capsules. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2011 Feb;113(2):137-45.
197. Barrow CJ, Nolan C, Holub BJ. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *J Funct Foods*. 2009 Jan;1(1):38-43.
198. Serra-Majem L, Nissensohn M, Øverby NC, Fekete K. Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *Br J Nutr*. 2012 Jun;107 Suppl 2:S64-76.
199. Madden J, Williams CM, Calder PC, Lietz G, Miles EA, Cordell H, et al. The impact of common gene variants on the response of biomarkers of cardiovascular disease (CVD) risk to increased fish oil fatty acids intakes. *Annu Rev Nutr*. 2011 Aug 21;31:203-34.

200. Raphael W, Sordillo LM. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: the role of phospholipid biosynthesis. *Int J Mol Sci.* 2013 Oct 22;14(10):21167-88.
201. Gorjão R, Azevedo-Martins AK, Rodrigues HG, Abdulkader F, Arcisio-Miranda M, Procopio J, et al. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacol Ther.* 2009 Apr;122(1):56-64.
202. Shaikh SR. Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. *J Nutr Biochem.* 2012 Feb;23(2):101-5.
203. Turk H, Chapkin RS. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013 Jan;88(1):43-7.
204. Deckelbaum RJ, Torrejon C. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: health benefits and sources. *J Nutr.* 2012 Mar;142(3):S587-91.
205. Kopecky J, Rossmeisl M, Flachs P, Kuda O, Brauner P, Jilkova Z, et al. N-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc Nutr Soc.* 2009 Nov;68(4):361-9.
206. Comba A, Lin YH, Eynard AR, Valentich MA, Fernandez-Zapico ME, Pasqualini ME. Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Dec;30(3-4):325-42.
207. Kruger MC, Coetzee M, Haag M, Weiler H. Long-chain polyunsaturated fatty acids: selected mechanisms of action on bone. *Prog Lipid Res.* 2010 Oct;48(4):438-49.
208. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Mar;75(3):645-62.
209. Adkins Y, Kelley DS. Mechanism underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 2010 Sep;21(9):781-92.

210. Bazan NG, Musto AE, Knott EJ. Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. *Mol Neurobiol*. 2011 Oct;44(2):216-22.
211. Bazan NG. Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009 Aug-Sep;81(2-3):205-11.
212. Aldrovandi M, O'Donnell VB. Oxidized PLs and vascular inflammation. *Curr Atheroscler Rep*. 2013 May;15(5):323.
213. Christophersen OA, Haug A. Animal products, diseases and drugs: a plea for better integration between agricultural sciences, human nutrition and human pharmacology. *Lipids Health Dis*. 2011 Jan 20;10:16.
214. Weismann D, Binder CJ. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Oct;1818(10):2465-75.
215. Richard D, Wolf C, Barbe U, Kefi K, Bausero P, Visioli F. Docosahexaenoic acid down-regulates endothelial Nox 4 through a sPLA₂ signalling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 20;389(3):516-22.
216. Gortan GC, Losurdo P, Mazzuco S, Panizon E, Jevnicar M, Macaluso L, et al. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem*. 2013 Jan;24(1):371-9.
217. Calzada C, Colas R, Guillot N, Guichardant M, Laville M, Véricel E, et al. Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acids protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis*. 2010 Feb;208(2):467-72.
218. Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol Res*. 2008 Jun;57(6):451-5.
219. Rodrigo R, Prieto JC, Castillo R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids:

- molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Jan;124(1):1-15.
220. Merendino N, Costantini L, Manzi L, Molinari R, D'Eliseo D, Velotti F. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acid DHA: a potential adjuvant in the treatment of cancer. *Biomed Res Int*. 2013 May 23;2013:310186.
221. Harris WS, Mozaffarian D, Lefevre M, Toner CD, Colombo J, Cunnane SC, et al. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J Nutr*. 2009 Apr;139(4):S804-19.
222. Okuyama H, Orikasa Y, Nishida T. Significance of antioxidative functions of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Feb;74(3):570-4.
223. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyl-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids*. 2009 Jan;157(1):1-11.
224. Di Nunzio M, Valli V, Bordoni A. Pro- and anti-oxidant effects of polyunsaturated fatty acid supplementation in HepG2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011 Sep-Oct;85(3-4):121-7.
225. Tuller ER, Beavers CT, Lou JR, Ihnat MA, Benbrook DM, Ding WQ. Docosahexaenoic acid inhibits superoxide dismutase 1 gene transcription in human cancer cells: the involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha signalling. *Mol Pharmacol*. 2009 Sep;76(3):588-95.
226. Cavazos DA, Price RS, Apte SS, deGraffenried LA. Docosahexaenoic acid selectively induces human prostate cancer cell sensitivity to oxidative stress through modulation of NF- κ B. *Prostate*. 2011 Sep 15;71(13):1420-8.
227. Shin S, Jing K, Jeong S, Kim N, Song KS, Heo JY, et al. The omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53. *Miomed Res Int*. 2013;2013:568671.

228. Vibet S, Goupille C, Bougnoux P, Steghens JP, Goré J, Mahéo K. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 1;44(7):1483-91.
229. Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, et al. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer*. 2004 Apr 10;109(3):449-54.
230. Kang KS, Wang P, Yamabe N, Fukui M, Jay T, Zhu BT. Docosahexaenoic acid induced apoptosis in MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo* reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. *PLoS One*. 2010 Apr 22;5(4):e10296.
231. Feng GM, Chen JH, Lin CI, Yang JM. Effect of docosahexaenoic acid on hypoxia/reoxygenation injury in human coronary arterial smooth muscle cells. *Eur J Nutr*. 2012 Dec;51(8):987-95.
232. Tardivel S, Gousset-Dupont A, Robert V, Pourci ML, Grynberg A, Lacour B. Protective effects of EPA and deleterious effects of DHA on eNOS activity in Ea hy 926 cultured with lysophosphatidylcholine. *Lipids*. 2009 Mar;44(3):225-35.
233. Shoji H, Franke C, Demmelmair H, Koletzko B. Effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress in placental trophoblast cells. *Early Hum Dev*. 2009 Jul;85(7):433-7.
234. Ambrozova G, Pekarova M, Lojek A. Effect of polyunsaturated fatty acids on the reactive oxygen and nitrogen species production by raw 264.7 macrophages. *Eur J Nutr*. 2010 Apr;49(3):133-9.
235. Kikugawa K, Yasuhara Y, Ando K, Koyama K, Hiramoto K, Suzuki M. Effect of supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids on oxidative stress-induced DNA damage of rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull*. 2003 Sep;26(9):1239-44.
236. Chaung HC, Chang CD, Chen PH, Chang CJ, Liu SH, Chen CC. Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine improves the antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* and cognitive functions of the developing brain. *Food Chem*. 2013 May 1;138(1):342-7.

237. Türkez H, Geyikoglu F, Yousef MI. Ameliorative effect of docosahexaenoic acid on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damage in rat liver. *Toxicol Ind Health*. 2012 Sep;28(8):687-96.
238. De Assis AM, Rech A, Longoni A, Rotta LN, Denardin CC, Pasquali MA, et al. Ω 3-polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. *Mol Cell Biochem*. 2012 Feb;361(1-2):151-60.
239. Palozza P, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, et al. N-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr*. 1996 Sep;64(3):297-304.
240. Carrepeiro MM, Rogero MM, Bertolami MC, Botelho PB, Castro N, Castro IA. Effect of n-3 fatty acids and statins on oxidative stress in statin-treated hypercholesterolemic and normocholesterolemic women. *Atherosclerosis*. 2011 Jul;217(1):171-8.
241. Wu WH, Lu SC, Wang TF, Jou HJ, Wang TA. Effects of docosahexaenoic acid supplementation on blood lipids, estrogen metabolism, and *in vivo* oxidative stress in postmenopausal vegetarian women. *Eur J Clin Nutr*. 2006 Mar;60(3):386-92.
242. Ulven SM, Kirkhus B, Lamglait A, Basu S, Elind E, Haider T, et al. Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but a lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers. *Lipids*. 2011 Jan;46(1):37-46.
243. Firuzi O, Shakibazad N, Amoozgar H, Borzooe M, Abtahi S, Ajami G, et al. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on heart function and oxidative stress biomarkers in pediatric patients with dilated cardiomyopathy. *Int Cardiovasc Res J*. 2013 Mar;7(1):8-14.
244. García-Alonso FJ, Jorge-Vidal V, Ros G, Periago MJ. Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarkers status, and

- cardiovascular disease risk in healthy women. *Eur J Nutr.* 2012 Jun;51(4):415-24.
245. Schmidt S, Stahl F, Mutz KO, Scheper T, Hahn A, Schuchardt JP. Transcriptome-based identification of antioxidative gene expression after fish oil supplementation in normo- and dyslipidemic men. *Nutr Metab (Lond).* 2012 May 23;9(1):45.
246. Tayyebi-Khosroshahi H, Houshyar J, Tabrizi A, Vatankhah AM, Zonouz NR, Dehghan-Hesari R. Effect of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. *Iran J Kidney Dis.* 2010 Oct;4(4):322-6.
247. Bloomer RJ, Larson DE, Fisher-Wellman KH, Galpin AJ, Schilling BK. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis.* 2009 Aug 19;8:36.
248. McAnulty SR, Nieman DC, Fox-Rabinovich M, Duran V, McAnulty LS, Henson DA, et al. Effect of n-3 fatty acids and antioxidants on oxidative stress after exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2010 Sept;42(9):1704-11.
249. Filaire E, Massart A, Rouveix M, Portier H, Rosado F, Durand D. Effects of 6 weeks of n-3 fatty acids and antioxidant mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *Eur J Appl Physiol.* 2011 Aug;111(8):829-39.
250. Filaire E, Massart A, Portier H, Rouveix M, Rosado F, Bage AS, et al. Effects of 6 weeks of n-3 fatty acids supplementation oxidative stress in judo athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2011 Dec;20(6):496-506.
251. Atashak S, Sharafi H, Azarbayjani MA, Stannard SR, Goli MA, Haghighi MM. Effect of omega-3 supplementation on the blood levels of oxidative stress, muscle damage and inflammation markers after acute resistance exercise in young athletes. *Kinesiol.* 2013 Jun;45(1):22-9.
252. Capó X, Martorell M, Sureda A, Llupart I, Tur JA, Pons A. Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during

- training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells. *Eur J Nutr*. 2014. Publicación electrónica 19 Mar 2014.
253. Martorell M, Capó X, Sureda A, Batle JM, Llompart I, Argelich E, et al. Effect of DHA on plasma fatty acid availability and oxidative stress during training season and football exercise. *Food Funct*. 2014. Publicación electrónica 23 Jun 2014.
254. Martorell M, Capó X, Sureda A, Tur JA, Pons A. Effects of docosahexaenoic acid diet supplementation, training, and acute exercise on oxidative balance in neutrophils. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014 Apr;39(4):446-57.
255. Gray P, Chappell A, Jenkinson AM, Thies F, Gray SR. Fish oil supplementation reduces markers of oxidative stress but not muscle soreness after eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2014 Apr;24(2):206-14.
256. López-Román FJ. Estudio de la capacidad antioxidante del ácido docosahexaenoico en ciclistas [tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia; 2008.
257. Cardinal BJ. ACSM/AHA joint position statement. American College of Sports Medicine. American Heart Association. Recommendations for cardiovascular screening, staffing, and emergency policies at health/fitness facilities. *Med Sci Sport Exerc*. 1999 Feb;31(2):353-4.
258. Rodríguez-Guisado FA. Bases metodológicas de la valoración funcional. Ergometría. En: González-Iturri JJ, Villegas-García JA, editores. Valoración del deportista. Aspectos biomédicos y funcionales. Pamplona: FEMEDE;1999. p. 233-71.
259. Myers J, Wlsh D, Buchanan N, Froelicher V. Can maximal cardiopulmonary capacity be recognized by a plateau in oxygen uptake? *Chest*. 1989 Dec;96(6):1312-6.
260. Myers J, Wlsh D, Sullivan M, Froelicher V. Effect of sampling on variability and plateau in oxygen uptake. *J Appl Physiol*. 1990 Jan;68(1):404-10.

261. Villa-Vicente JG. Valoración funcional del metabolismo aeróbico: métodos indirectos en el laboratorio. En: González-Iturri JJ, Villegas-García JA. Valoración del deportista. Aspectos biomédicos y funcionales. Pamplona: FEMEDE;1999. p. 343-425.
262. Osnes JB, Hermansen L. Acid-base balance after maximal exercise of short duration. *J Appl Physiol*. 1972 Jan;32(1):59-63.
263. Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, Beaver WL. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol*. 1973 Aug;35(2):236-43.
264. Wasserman K. The anaerobic threshold: definition, physiological significance and identification. *Adv Cardiol*. 1986;35:1-23.
265. López-Chicharro J, Lucía A. Transición aeróbico-anaeróbica: concepto, bases fisiológicas y aplicaciones. En: López-Chicharro J, Fernández-Vaquero A. Fisiología del ejercicio. Madrid: Panamericana; 2006. p. 416-41.
266. Skinner JS, McLellan TH. The transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Res Q Exerc Sport*. 1980 Mar;51(1):234-48.
267. López-Calbet JA, García-Urreiztieta B, Fernández-Rodríguez A, Chavarren-Cabrero J. Validez y fiabilidad del umbral de frecuencia cardíaca como índice de condición física aeróbica. *Arch Med Dep*. 1995;50:435-44.
268. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug;37(8):911-7.
269. Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res*. 1964 Oct;5:600-8.
270. Hoffman DR, Birch EE, Birch DG, Uauy R, Castañeda YS, Lopus MG, et al. Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long-chain polyunsaturated fatty acids on later visual development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000 Nov;31(5):540-53.
271. Cooke MS, Evans MD, Lunec J. DNA repair: insights from urinary lesion analysis. *Free Radic Res*. 2002 Sep;36(9):929-32.

272. Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, et al. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluid with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci.* 1992 Apr 15;89(8):3375-9.
273. Olinski R, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Siomek A, Cooke MS. Urinary measurement of 8-OxodG, 8-OxoGua, and 5HMUra: a noninvasive assessment of oxidative damage to DNA. *Antioxid Redox Signal.* 2006 May-Jun;8(5-6):1011-9.
274. Osawa T, Yoshida A, Kawakishi S, Yamashita K, Ochi H. Protective role of dietary antioxidants in oxidative stress. In: Cutler RG, Packer L, Bertram J, Mori A, editors. *Oxidative stress and aging.* Berlín: Birkhäuser Verlag; 1995. p. 367-77.
275. Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest.* 1997 Mar;76(3):365-74.
276. Yoshida R, Ogawa Y, Kasai H. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine values measured by an ELISA correlated well with measurements by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Oct;11(10 Pt 1):1076-81.
277. Patterson AC, Metherell AH, Hanning RM, Stark KD. The percentage of DHA in erythrocytes can detect non-adherence to advice to increase EPA and DHA intakes. *Br J Nutr.* 2014 Jan 28;111(2):270-8.
278. van Rensburg SJ, Smuts CM, Hon D, Kidd M, van der Merwe S, Myburgh C, et al. Changes in erythrocyte membrane fatty acids during a clinical trial of eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 2009 Dec;24(4):659-72.
279. Cazzola R, Rondanelli M, Faliva M, Cestaro B. Effects of DHA-phospholipids, melatonin and tryptophan supplementation on erythrocyte membrane physico-chemical properties in elderly patients

- suffering from mild cognitive impairment. *Exp Gerontol.* 2012 Dec;47(12):974-8.
280. Milte CM, Coates AM, Buckley JD, Hill AM, Howe PR. Dose-dependent effects of docosahexaenoic acid-rich fish oil on erythrocyte docosahexaenoic acid and blood lipid levels. *Br J Nutr.* 2008 May;99(5):1083-8.
281. Barceló-Coblijn G, Murphy EJ, Ohtman R, Moghadasian MH, Kashour T, Friel JK. Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n-3 fatty acid composition : a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2008 Sep;88(3):801-9.
282. Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, et al. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am J Clin Nutr.* 2012 Oct;96(4):748-58.
283. Klinger M, Klem S, Demmelmair H, Koletzko B. Comparison of the incorporation of orally administered DHA into plasma, erythrocyte and cheek cell glycerophospholipids. *Br J Nutr.* 2013 Mar 14;109(5):962-8.
284. Lloyd-Still JD, Powers CA, Hoffman DR, Boyd-Trull K, Lester LA, Benisek DC, et al. Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study. *Nutrition.* 2006 Jan;22(1):36-46.
285. Egert S, Lindenmeier M, Harnack K, Krome K, Erbersdobler HF, Wahrburg U, et al. Margarines fortified with α -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, or docosahexaenoic acid alter the fatty acid composition of erythrocytes but do not affect the antioxidant status of healthy adults. *J Nutr.* 2012 Sep;142(9):1638-44.
286. Al-Taan O, Stepheson JA, Spencer L, Pollard C, West AL, Calder PC, et al. Changes in plasma and erythrocyte omega-6 and omega-3 fatty acids in response to intravenous supply of omega-3 fatty acids in

- patients with hepatic colorectal metastases. *Lipids Health Dis.* 2013 May 7;12:64.
287. Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2012 Jan 28;18(4):302-8.
288. Harms-Ringdahl M, Jenssen D, Haghdoost S. Tomato juice intake suppressed serum concentration of 8-oxodG after extensive physical activity. *Nutr J.* 2012 May 2;11:29.
289. Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Berra B, et al. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis.* 2011 May 12;10:73.
290. Ding WQ, Lind SE. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity. *Mol Cancer Ther.* 2007 Apr;6(4):1467-74.
291. Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer.* 2009 Dec 15;101(12):1978-85.
292. Wu H, Ichikawa S, Tani C, Zhu B, Tada M, Shimoishi Y, et al. Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neuritogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-Sy5Y cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jan;1791(1):8-16.
293. Shimazawa M, Nakajima Y, Mashima Y, Hara H. Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells. *Brain Res.* 2009 Jan 28;1251:269-75.
294. Ye S, Tan L, Ma J, Shi Q, Li J. Polyunsaturated docosahexaenoic acid suppresses oxidative stress induced endothelial cell calcium influx by altering lipid composition in membrane caveolar rafts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010 Jul;83(1):37-43.

295. Arab K, Rossary A, Flourié F, Tourneur Y, Steghens JP. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating γ -glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. *Br J Nutr.* 2006 Jan;95(1):18-26.
296. Guillot N, Debard C, Calzada C, Vidal H, Lagarde M, Véricel E. Effects of docosahexaenoic acid on some megakaryocytic cell gene expression of some enzymes controlling prostanoid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Aug 8;372(4):924-8.
297. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 1;101(22):8491-6.
298. Kubo K, Saito M, Tadokoro T, Maekawa A. Changes in susceptibility of tissues to lipid peroxidation after ingestion of various levels of docosahexaenoic acid and vitamin E. *Br J Nutr.* 1997 Oct;78(4):655-69.
299. Engström K, Saldeen AS, Yang B, Mehta JL, Saldeen T. Effect of fish oils containing different amounts of EPA, DHA, and antioxidants on plasma and brain fatty acids and brain nitric oxide synthase activity in rats. *Ups J Med Sci.* 2009;114(4):206-13.
300. Chen LY, Jokela R, Li DY, Bavry AA, Snadler H, Sjöquist M, et al. Effect of stable fish oil on arterial thrombogenesis, platelet aggregation, and superoxide dismutase activity. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000 Mar;35(3):502-5.
301. Erdogan H, Fadillioglu E, Ozgocmen S, Sogut S, Ozyurt B, Akyol O, et al. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004 Sep;71(3):149-52.
302. Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, Ozugurlu F, Ozgocmen S, Fadillioglu E. Omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. *Ann Clin Lab Sci.* 2005 Spring;35(2):169-73.
303. Ramaprasad TR, Baskaran V, Krishnakantha TP, Lokesh BR. Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation

- and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing *n*-3 fatty acid. *Mol Cell Biochem.* 2005 Dec;280(1-2):9-16.
304. Casós K, Zaragoza MC, Zarkovic N, Zarkovic K, Andrisic L, Portero-Otín M, et al. A fish oil-rich reduces vascular oxidative stress in apoE^{-/-} mice. *Free Radic Res.* 2010 Jul;44(7):821-9.
305. Guermouche B, Soulimane-Mokhtari NA, Bouanane S, Merzouk H, Merzouk S, Narce M. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on oxidant/antioxidant status in macrosomic offspring of diabetic rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014:368107.
306. Castillo R, Rodrigo R, Perez F, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, et al. Antioxidant therapy reduces oxidative and inflammatory tissue damage in patients subjected to cardiac surgery with extracorporeal circulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011 Apr;108(4):256-62.
307. Franke C, Demmelmair H, Decsi T, Campoy C, Cruz M, Molina-Font JA, et al. Influence of fish oil or folate supplementation on the time course of plasma redox markers during pregnancy. *Br J Nutr.* 2010 Jun;103(11):1648-56.
308. Wander RC, Du SH. Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr.* 2000 Sep;72(3):731-7.
309. Hanwell HE, Kay CD, Lampe JW, Holub BJ, Duncan AM. Acute fish oil and soy isoflavone supplementation increase postprandial serum (n-3) polyunsaturated fatty acids and isoflavones but do not affect triacylglycerols or biomarkers of oxidative stress in overweight and obese hypertriglyceridemic men. *J Nutr.* 2009 Jun;139(6):1128-34.
310. Petersson H, Risérus U, McMonagle J, Gulseth HL, Tierney AC, Morange S, et al. Effects of dietary fat modification on oxidative stress and inflammatory markers in the LIPGENE study. *Br J Nutr.* 2010 Nov;104(9):1357-62.
311. Parra D, Bandarra NM, Kiely M, Thorsdottir I, Martínez JA. Impact of fish intake on oxidative stress when included into a moderate energy-restricted program to treat obesity. *Eur J Nutr.* 2007 Dec;46(8):460-7.

312. Guillot N, Caillet E, Laville M, Calzada C, Lagarde M, Véricel E. Increasing intakes of the long-chain ω -3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J*. 2009 Sep;23(9):2909-16.
313. Nitta H, Kinoyama M, Watanabe A, Shirao K, Kihara H, Arai M. Effects of nutritional supplementation with antioxidant vitamins and minerals and fish oil on antioxidant status and psychosocial stress in smokers: an open trial. *Clin Exp Med*. 2007 Dec;7(4):179-83.
314. Bouzidi N, Mekki K, Boukaddoum A, Dida N, Kaddous A, Bouchenak M. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty-acid supplementation on redox status in chronic renal failure patients with dyslipemia. *J Ren Nutr*. 2010 Sept;20(5):321-8.
315. Safarinejad MR. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Andrologia*. 2011 Feb;43(1):38-47.
316. Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and antioxidant status of seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutr*. 2012 Feb;29(1):100-5.
317. Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008 Mar;100(3):234-8.
318. Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IA, Croft KD, Beilin LJ. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med*. 2003 Oct 1;35(7):772-81.
319. Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodríguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids. *Nutrition*. 2003 Oct;19(10):837-42.

320. Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas MA, Ortiz GG, Pacheco-Moises F, Torres-Sanchez ED, Sorto-Gomez TE, et al. Efficacy of fish oil on serum of $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, and $IL-6$ oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:709493.
321. Huss M, Völp A, Stauss-Grabo M. Supplementation of polyunsaturated fatty acids, magnesium and zinc in children seeking medical advice for attention-deficit/hyperactivity problems – an observational cohort study. *Lipids Health Dis*. 2010 Sep 24;9:105.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado para la realización de prueba de esfuerzo.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA UNA PRUEBA DE ESFUERZO

El propósito de esta información es llevar a su conocimiento la actuación médica a la que va a ser sometido/a, para que pueda tomar la decisión libre y voluntaria de autorizar o rechazar dicha actuación médica. Sepa usted que es de obligado cumplimiento, para el/la médico que le atiende, informarle y solicitar su autorización.

En cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones complementarias a las que se va a someter pasará a formar parte de un fichero automatizado, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de estudios e investigación científica. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.

¿Qué le vamos a hacer? La prueba de esfuerzo nos permite estudiar el comportamiento de su corazón y sistema respiratorio durante el ejercicio físico. Se realiza corriendo sobre un tapiz rodante o pedaleando en una bicicleta estática. Durante la prueba controlaremos su tensión arterial y su electrocardiograma a través de un monitor y unos electrodos, que conectados por cables, van pegados a su piel. Además, llevará una mascarilla que nos permitirá, analizar los gases respirados. En algunas ocasiones y siempre que la situación lo requiera, le tomaremos una micromuestra del lóbulo de la oreja o pulpejo del dedo para análisis de sangre. La forma adecuada de colaborar en este tipo de prueba es realizar el mayor esfuerzo posible, y comunicar al médico cualquier evento que pueda suceder durante la misma.

¿Qué riesgos tiene? Debe saber que esta prueba no está exenta de riesgos, pero éstos son muy poco frecuentes (entre 1 y 4 por cada 10.000 pruebas realizadas plantean una actuación médica de urgencia). Por este motivo, esta prueba será supervisada de forma cuidadosa por un médico especialista, debidamente entrenado, que la interrumpirá si observa alguna anomalía.

HABIENDO LEIDO ESTA INFORMACIÓN:

D./Dña. _____ en mi nombre, o como representante legal de D./Dña. _____, menor de edad, que va a ser sometido a la prueba, **AUTORIZO** al Centro de Investigación de Medicina Deportiva de la Universidad Católica San Antonio de Murcia a realizar el procedimiento PRUEBA DE ESFUERZO, habiendo sido informado verbalmente y por escrito de su naturaleza y riesgos.

Murcia, a ____ de _____ de 200__ .

D./Dña. _____ D./Dña. _____
El/la interesado/a El representante legal del menor

D.N.I. _____ D.N.I. _____

Firma

Firma

En cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones de las exploraciones complementarias a las que se va a someter pasará a formar parte de un fichero automatizado, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de estudios e investigación científica. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.

Anexo 2. Consentimiento informado para la realización de extracciones sanguíneas.

EXTRACCION DE SANGRE VENOSA PARA ANÁLISIS CLÍNICO

Procedimiento

Para realizar la toma se precisa localizar una vena apropiada y en general se utilizan las venas situadas en la flexura del codo. La persona encargada de tomar la muestra utilizará guantes sanitarios y una aguja (con una jeringa o tubo de extracción).

Le pondrá un tortor (cinta de goma-látex) en el brazo para que las venas retengan más sangre y aparezcan más visibles y accesibles.

Limpiará la zona del pinchazo con un antiséptico y mediante una palpación localizará la vena apropiada y accederá a ella con la aguja. Le soltarán el tortor.

Cuando la sangre fluya por la aguja el sanitario realizará una aspiración (mediante la jeringa o mediante la aplicación de un tubo con vacío).

Al terminar la toma, se extrae la aguja y se presiona la zona con una torunda de algodón o similar para favorecer la coagulación y se le indicará que flexione el brazo y mantenga la zona presionada con un esparadrapo durante unas horas.

La sangre extraída se traslada al laboratorio en tubos especiales. En general no suelen ser necesarios más de 15 mililitros de sangre para una batería estándar de parámetros bioquímicos.

Problemas y posibles riesgos

La obtención mediante un pinchazo de la vena puede producir cierto dolor.

La posible dificultad en encontrar la vena apropiada puede dar lugar a varios pinchazos.

Aparición de un hematoma (“moratón o cardenal”) en la zona de extracción. Suele deberse a que la vena no se ha cerrado bien tras la presión posterior y ha seguido saliendo sangre produciendo este problema.

Inflamación de la vena (flebitis). A veces la vena se ve alterada, bien sea por una causa meramente física o porque se ha infectado.

Anexo 3. Consentimiento informado para la participación en el proyecto de investigación.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./Dña. _____, mayor de edad, consiente voluntariamente en participar en el Proyecto de Investigación: *Modificación del daño oxidativo en un grupo de ciclistas tras consumir ácido docosahexaenoico a distintas dosis* y someterse a la recogida de datos y analíticas necesarias para la realización de dicho proyecto.

Reconoce haber sido informado, de forma oral y escrita (informe adjunto) por el personal médico de este centro respecto al tipo de pruebas a las que se va a someter y es plenamente consciente, de que este estudio no es un reconocimiento médico orientado a la detección de patología lesional o enfermedades o padecimientos que no estén directamente implicados con la capacidad para realizar el esfuerzo físico requerido.

El deportista autoriza a la Cátedra de Fisiología del Ejercicio para ser fotografiado o filmado en vídeo durante la realización de las distintas pruebas a las que será sometido. Dicha Cátedra se compromete a que el material obtenido sea empleado para uso exclusivamente docente y de publicaciones científicas.

En cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones complementarias a las que se va a someter pasará a formar parte de un fichero automatizado, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de estudios e investigación científica. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.

Revocación de la autorización:

D./Dña. _____
 _____, revoca el consentimiento de
 utilización de su imagen con fines docentes o de publicación
 científica.

Firma y fecha

D.N.I. _____

Firma y fecha

Anexo 4: Contraindicaciones para la realización de una prueba ergométrica²⁵⁷.

Contraindicaciones absolutas

- Cambios significativos recientes en el ECG de reposo sugestivos de infarto u otro episodio de enfermedad cardiaca aguda.
- Infarto de miocardio reciente complicado (a menos que el paciente esté estable y sin dolor).
- Angina inestable.
- Arritmia ventricular no controlada.
- Arritmia auricular con compromiso de la función cardiaca.
- Bloqueo AV de tercer grado sin marcapasos.
- Insuficiencia cardiaca congestiva aguda.
- Estenosis aórtica severa.
- Sospecha o diagnóstico de aneurisma disecante.
- Sospecha o diagnóstico de miocarditis o pericarditis.
- Tromboflebitis o trombosis intracardiaca.
- Embolismo sistémico o pulmonar reciente.
- Infecciones agudas.
- Trastorno psicológico significativo (psicosis).

Contraindicaciones relativas

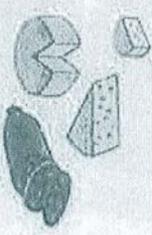
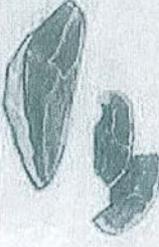
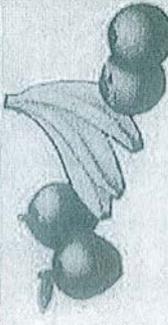
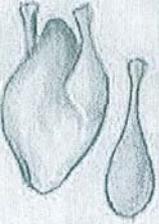
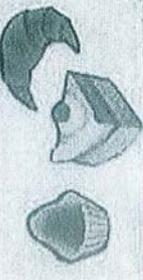
- Tensión arterial diastólica TAD > 115 mm Hg o tensión arterial sistólica TAS > 200 mm Hg en reposo.
- Enfermedad cardiaca valvular moderada.
- Trastornos electrolíticos conocidos (hipocalemia, hipomagnesemia).
- Marcapasos de ritmo fijo (de uso poco frecuente).
- Ectopia ventricular frecuente o compleja.
- Aneurisma ventricular.
- Enfermedad metabólica no controlada (diabetes, tirotoxicosis o mixedema).
- Enfermedad infecciosa crónica (mononucleosis, hepatitis, SIDA).
- Enfermedades neuromusculares, musculoesqueléticas o reumáticas que puedan exacerbarse con el ejercicio.
- Embarazo avanzado o complicado.

Anexo 5. Encuesta Nutricional “Recuento de 24 horas” para 2 días laborables y 1 día festivo.

ENCUESTA NUTRICIONAL

	LABORABLE 1	LABORABLE 2	FESTIVO
DESAYUNO			
ALMUERZO			
COMIDA			
MERIENDA			
CENA			
OTROS			

Anexo 6. Referencias de pesos y medidas básicas para una correcta cumplimentación de encuesta nutricional.

<p>REBANADA</p> <p>Pequeña (15-20 g) Mediana (25-35 g) Grande (50-75 g)</p> 	<p>HUEVO</p> <p>Pequeño (50 g) Grande (70 g)</p> 
<p>LONCHA</p> <p>Pequeña (15-25 g) Mediana (40-50 g) Grande (60-100 g)</p> 	<p>PLATO FECULA (ej. arroz, patata; pasta, trillana, legumbres,...)</p> <p>Pequeño (100-150 g) Mediano (175-200 g) Grande (250-350 g)</p> 
<p>PORCIÓN DE CARNE</p> <p>Pequeña (80-100 g) Mediana (120-150 g) Grande (180-250 g)</p> 	<p>PLATO VERDURA (ej. judías, espinacas, alcachofas, zanahorias,...)</p> <p>Pequeña (80-120 g) Mediano (150-200 g) Grande (220-300 g)</p> 
<p>PORCIÓN PESCADO</p> <p>Pequeña (60-70 g) Mediana (80-120 g) Grande (150-200 g)</p> 	<p>PIEZA DE FRUTA</p> <p>Pequeña (100 g) Mediana (150 g) Grande (250 g)</p> 
<p>PORCIÓN POLLO</p> <p>Pequeña (60-70 g) (muslo) Mediana (100-150 g) (X pollo) Grande (180-250 g)</p> 	<p>BOLLERIA</p> <p>Pequeña (40-70 g) Grande (100 g)</p> 

MEDIDAS DE USO DOMESTICO

CUCHARA:	de café	3 g
	de postre	5 g
	sopera	10 - 15 g
VASO:	de vino	50 cc
	copa	100 cc
	de agua	200 cc
	jarra	300 cc
TAZA:	de café	50 cc
	de leche	150 - 250 cc
	tazón	250 - 300 cc
PLATO:	de postre	75 - 100 g
	llano	150 - 250 g
	hondo	200 - 300 g
PUNTA DE CUCHILLO:	de mantequilla	5 g