



UNIVERSIDAD CATÓLICA SAN ANTONIO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD Y DEL DEPORTE

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA BEBIDA DE REPOSICIÓN CON
ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN
DEPORTISTAS”**

Juana M^a Morillas Ruiz

Murcia, 2004



UNIVERSIDAD CATÓLICA SAN ANTONIO

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN (Art. 8º 1 del R.D. 778/98)

La Dra. Dña. Pilar Zafrilla Rentero y el Dr. D. José Antonio Villegas García como Directores de la Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA BEBIDA DE REPOSICIÓN CON ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN DEPORTISTAS” realizada por Dña. Juana M^a Morillas Ruiz en el *Departamento de Ciencias de la Salud y del Deporte*, **autorizan su presentación a trámite**, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 8º 1 del R.D. 778/98, en Murcia a 12 de Febrero de 2004.

Dra. D^a Pilar Zafrilla

Dr. D. José Antonio Villegas

**ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA
BEBIDA DE REPOSICIÓN CON
ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS
SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN
DEPORTISTAS**

**Trabajo realizado por
Juana M^a Morillas Ruiz
para optar al Grado de Doctor.**

Murcia, Febrero de 2004.

A mi esposo, Antonio

A M^a Mercedes, Alejandro y Carlos, mis hijos

A mi padre

Quiero agradecer en primer lugar a la Universidad Católica San Antonio de Murcia la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral, de un modo muy especial a D. José Luis Mendoza, D. Vicente Mendoza y D. Higinio Marín por sus continuas muestras de apoyo desde los inicios de este trabajo.

Mi más sincera gratitud a mis directores de Tesis, el Doctor José Antonio Villegas García que me permitió llevar a cabo su magnífica intuición del encadenamiento causal y la Doctora Pilar Zafrilla Rentero por su Gran Dedicación, orientación, consejos y ese apoyo incondicional, siempre con alegría, sin los cuales no hubiese sido posible llegar hasta este momento.

Al equipo médico constituido por los profesores Javier López , Antonio Luque y Ana Belén Martínez por su colaboración en la realización de las pruebas de esfuerzo en el Laboratorio de la Cátedra de Fisiología y Medicina Deportiva de la UCAM.

A los ciclistas y entrenadores de los equipos correspondientes que voluntariamente aceptaron formar parte del estudio.

A la empresa HERO-ESPAÑA, por la financiación del presente trabajo.

A la Dra. Marisa Vidal por su constante disposición y ayuda en la búsqueda de información que siempre he necesitado.

Al Dr. Tomás Fernández por la revisión y aportaciones en el tratamiento estadístico de los datos.

A Mar y M^a José del Dpto. de Fisiología de la Universidad de León porque siempre que las necesité encontré en ellas una inestimable ayuda, llena de amabilidad.

A Sergio, Almudena, Pedro Aguilar y Gabi por su ayuda en la asistencia técnica de la Tesis.

A M^a Jesús Castillo porque juntas, como compañeras, nos iniciamos en el maravilloso mundo de la investigación y su apoyo incondicional sigue demostrándomelo en la ayuda a las traducciones de los artículos que salen de esta Tesis.

A todos los miembros del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular en Farmacia de la Universidad de Granada, muy especialmente a los Doctores Antonio Sánchez-Pozo y Fermín Sánchez de Medina que con su magnífico espíritu de trabajo despertaron mi afán docente e investigador.

A la empresa PULEVA,S.A., especialmente al Dr. Angel Gil Hernández, por confiar en mí durante los años que dediqué a la investigación de Fórmulas Lácteas Maternizadas Infantiles.

A Eliane y Francisco, por su amistad y continuas muestras de cariño a pesar del Océano que nos separa.

A la Dra. Gloria Tomás porque sin ese don que tiene de aparecer en el instante oportuno, tal vez yo no hubiese sabido superar muchos de los momentos difíciles que siempre lleva consigo la elaboración de una Tesis.

Al Dr. Martínez-Almagro porque siempre aprendí algo nuevo en cada uno de esos cafés que tan agradablemente compartí (y espero seguir compartiendo) con él. Por su continua disponibilidad desde los inicios del proyecto de este trabajo, gracias.

A los Laboratorios Carpes, especialmente a M^a Dolores y M^a José, por su colaboración laboriosa en la analítica de muestras.

Al Servicio de Informática de la UCAM, especialmente a Juan Carlos y Daniel que con tanta eficacia y amabilidad me han ayudado en todo momento.

A Juani Alemán y D^a M^a Teresa Martínez, por su ayuda y consejos.

A todos y cada uno de los compañeros de la E.U. de Nutrición Humana y Dietética de la UCAM, porque de cada uno de ellos pude aprender algo válido, gracias por la aportación que cada uno de vosotros sabéis que habéis realizado, especialmente a José M^a Cayuela por su inagotable paciencia.

A Pilar, cuya amistad ha estado por encima de todo.

A mi madre y a Salva, que supieron inculcar en mi vida la constancia y alegría en el trabajo de cada día.

A mi padre, por transmitirme su ilusión y entusiasmo por la vida. Por confiar tanto en mí, GRACIAS.

A mis tres hijos, más que agradecer he de pedirles perdón por el tiempo que no les he dedicado durante la elaboración de este trabajo. Y a Antonio, por su dedicación e incesante estímulo que jamás llegaré a agradecer como se merece.

ÍNDICE

*“En todas las cosas, es preciso comenzar.
El comienzo es más que la mitad del todo”
(Aristóteles)*

ÍNDICE

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1.- INTRODUCCIÓN	3
1.2.- OBJETIVOS	7

CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1.- ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y RADICALES LIBRES	11
2.1.1.- Papel del oxígeno	11
2.1.2.- Formación, reactividad y fuentes de especies reactivas de oxígeno	13
2.2.- PRINCIPALES SISTEMAS BIOLÓGICOS PRODUCTORES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	29
2.3.-PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS DE SEÑALES CELULARES	33
2.4.-EFECTOS BENEFICIOSOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	35
2.4.1.- Radicales libres y expresión génica	37
2.5.-REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS	44
2.6.- RADICALES LIBRES Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	56
2.7.- RADICALES LIBRES Y ACTIVIDAD FÍSICA	60
2.8.- MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	65
2.9.- ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL EJERCICIO FÍSICO	81
2.9.1.- Estrés oxidativo inducido por el ejercicio extenuante	81

2.9.2.- El entrenamiento físico como protector frente al estrés oxidativo	87
2.10.- DEFENSAS ANTIOXIDANTES	92
2.10.1.- Antioxidantes Enzimáticos	93
2.10.2.- Antioxidantes No Enzimáticos	99
2.11.- COMPUESTOS FENÓLICOS	112
2.11.1.-FLAVONOIDES: ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN	113
2.11.2.-PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE FLAVONOIDES	115
2.11.3.- BIODISPONIBILIDAD DE FLAVONOIDES	124
2.11.3.1.- Factores que afectan a la biodisponibilidad de flavonoides	126
2.11.4.- ANTOCIANOS	128
2.11.4.1.-Factores que afectan a la estabilidad de los antocianos en alimentos	132
2.11.4.2.- Antocianidinas	136
CAPÍTULO III.- PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE UNA BEBIDA DE REPOSICIÓN CON COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	
3.1.- COMPOSICIÓN DE LA BEBIDA	141
3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	143
3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	146
CAPÍTULO IV.- DISEÑO DEL ESTUDIO	
4.1.- MUESTRA DE ESTUDIO	155
4.2.- TIPO DE ESTUDIO	155
4.3.- TOMA DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS	156
4.4.- MATERIAL Y MÉTODOS DE PRUEBAS DE ESFUERZO	157

4.5.- VALORACIÓN NUTRICIONAL	161
4.6.- CAMBIOS EN EL VOLUMEN PLASMÁTICO TRAS EL EJERCICIO	164
4.7.- RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	169

**CAPÍTULO V.- EFECTO DE LOS COMPUESTOS
POLIFENÓLICOS EN LAS ENZIMAS CREATINA QUINASA Y
LACTATO DESHIDROGENASA TRAS LA ACTIVIDAD FÍSICA**

5.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	173
5.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	174
5.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	176

**CAPÍTULO VI.- EFECTO DE LOS COMPUESTOS
POLIFENÓLICOS EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA INDUCIDA
POR LA ACTIVIDAD FÍSICA**

6.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	183
6.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	184
6.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	186

**CAPÍTULO VII.- EFECTO DE LOS COMPUESTOS
POLIFENÓLICOS EN LA OXIDACIÓN PROTEICA INDUCIDA
POR LA ACTIVIDAD FÍSICA**

7.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	199
7.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	200
7.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	203

**CAPÍTULO VIII.- EFECTO DE LA BEBIDA EN EL ESTADO
ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICO INDUCIDO POR LA
ACTIVIDAD FÍSICA**

8.1- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	211
8.2.-MATERIAL Y MÉTODOS	212
8.3.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	213

CAPÍTULO IX.- DISCUSIÓN	221
--------------------------------	-------	-----

CAPÍTULO X.- CONCLUSIONES	233
----------------------------------	-------	-----

BIBLIOGRAFÍA	237
---------------------	-------	-----

ANEXOS	269
---------------	-------	-----

ABREVIATURAS

AAPH	Dicloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABAP	Hidrocloreuro de 2,2'-azobis(2- amidopropano)
ABTS ⁺	Radical catión 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ACV	Accidente cardiovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AMP	Adenosina monofosfato
AMVN	2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo)
α_1 AP	Inhibidor proteolítico α -1-antiproteinasa
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitoluenobutilado
CAT	Catalasa / Capacidad Antioxidante Total
cGMP	Guanilato monofosfato cíclico
CK	Creatina quinasa
CSF	Secreción de fluido cerebroespinal
DAG	Diacilgliceroles
DC	Dienos conjugados
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
dTg	Glicol-timidina
EDRF	Factor de relajación endotelial
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENOS	Isoenzima presente en células endoteliales vasculares
ERK	Quinasas de regulación extracelular
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESR	Resonancia de spin electrónico
F	45 minutos tras finalizar el ejercicio
Fo	Inmediatamente después de finalizar el ejercicio
GC/MS	Cromatografía de gases/espectroscopía de masas

GPx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation en forma reducida
GSSG	Glutation en forma oxidada
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HETE	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HH	Hemocromatosis idiopática primaria
HPLC	Cromatografía de alta presión
Htc	Hematocrito
I:	Antes del ejercicio
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Isoenzima presente en hepatocitos, en células endoteliales y en células de Küpffer
JNK	Quinasa amino terminal c-Jun
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAP	Quinasas : proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCHC	Concentracion de Hb por unidad de Htc
MCHC(F)	Concentración de Hb corpuscular después del ejercicio
MCHC(I)	Concentración de Hb corpuscular antes del ejercicio
MCV	Media del volumen corpuscular de los glóbulos rojos
MDA	malonildialdehído
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF-kB	Factor de transcripción nuclear
nNOS	Isoenzima presente en tejido neuronal
NOS	Enzima nitroso sintasa
OPD	<i>o</i> -Fenilendiamina
8-oxoG	8-Oxoguanosina
8-oxoGua	8-Oxoguanina

8-oxodG	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
PIP ₂	Fosfatidilinositol
PKC	Proteína quinasa C
PMF	Polimorfonucleares
PPAR	Receptor activado de proliferación de peroxisomas
PV(F)	Volumen de plasma después de la deshidratación por el ejercicio
RL	Radicales libres
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSC	Capacity scavenged of radicals
SEQC	Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
TA	Test suplementado con antioxidantes
TAS	Estado antioxidante total
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al TBA
TCA	Ácido tricloroacético
TEAC	Capacidad total antioxidante equivalente al Trolox
Tg	Glicol-timina
TP	Test placebo
TRAP	Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter
SOD	Superóxido dismutasa
TAS	Estado antioxidante total
UCAM	Universidad Católica San Antonio de Murcia
VO ₂ max	Capacidad aeróbica máxima
XDH	Xantina en forma reducida
XO	Xantina oxidasa/ xantina en forma oxidada

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

“Investigar significa pagar por adelantado y entrar sin saber lo que se va a ver”
(J. Robert Oppenheimer)

1.1.- INTRODUCCIÓN

Aunque son ampliamente conocidos los beneficios que se derivan del ejercicio físico, también existe considerable evidencia de que, durante su práctica, aumenta la producción de radicales libres (RL) que producen daño oxidativo en el tejido muscular, hígado, sangre y, posiblemente, en otras estructuras (Davies *et al.*, 1982). Recientemente, se ha incrementado sustancialmente el interés en este tópico, así como en los efectos de las terapias antioxidantes.

Si bien existen algunos informes acerca del aumento del rendimiento físico a partir de tratamientos con antioxidantes, los resultados de la suplementación con estas sustancias deben ser esperados a largo plazo y verse reflejados en la disminución del deterioro del rendimiento corporal producido por el envejecimiento y en el incremento de los beneficios derivados de la práctica regular tanto en el deportista, como en el individuo físicamente activo.

Existen diversas fuentes de producción de RL durante el ejercicio (König *et al.*, 2002):

- a) Por un escape de electrones, probablemente a nivel de la ubiquinona-citocromo b, en la cadena mitocondrial de transporte de electrones con producción de anión superóxido.
- b) Por la isquemia-reperfusión que se produce durante el ejercicio.
- c) La autooxidación de catecolaminas.
- d) La xantina oxidasa (XO) cataliza reacciones de degradación de AMP durante la isquemia muscular.
- e) La peroxidación lipídica del ácido araquidónico.
- f) La alteración de la homeostasis del calcio.
- g) Como consecuencia de la reacción de explosión respiratoria debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares (PMF) tras el daño muscular inducido por el ejercicio.

El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) producido por los mecanismos anteriormente mencionados, puede reaccionar con otra molécula similar en presencia de protones (dismutación), para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 puede reaccionar con metales de transición para producir el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), una de las especies reactivas del oxígeno más tóxicas, que puede dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Aruoma, 1998).

Los RL que se producen durante el ejercicio, son especies químicas altamente reactivas, que generan reacciones descontroladas produciendo entrecruzamientos de las cadenas del ADN, proteínas y lípidos en la misma molécula o entre moléculas (Southorn, 1988). También pueden provocar daños oxidativos en importantes grupos funcionales de las biomoléculas, acelerando el envejecimiento y las enfermedades asociadas (Aruoma, 1998; Dhalla, 2000).

A lo largo de su evolución, el cuerpo humano ha desarrollado mecanismos antioxidantes de defensa, bajo la forma de enzimas y compuestos. Sin embargo, durante la actividad física, aún en individuos entrenados, es previsible una importante producción de RL y, por lo tanto, un mayor requerimiento de mecanismos de defensa. Algunas de las defensas antioxidantes mejoran con el entrenamiento realizando una dieta apropiada, pero pueden ser agotadas cuando se excede el nivel de ejercicio en intensidad y/o duración (Brites, 1999).

Los antioxidantes desempeñan una importante función para la prevención de numerosas patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, ciertos tipos de tumores y numerosas afecciones relacionadas con el envejecimiento (Halliwell, 1994).

El conocimiento del modo como interactúan los antioxidantes ofrece bases racionales para desarrollar estrategias nutricionales y de intervención farmacológica (Sen, 1995a) que permitan afrontar tanto el progreso de las afecciones degenerativas

del envejecimiento, como las situaciones clínicas agudas generadas por el estrés oxidativo. Para lograr una comprensión efectiva de la protección que brindan, es esencial evaluar todas las sustancias y enzimas antioxidantes.

Una característica importante del sistema de defensas antioxidantes radica en la interacción de los antioxidantes con sistema redox (oxidorreducción) y no redox, que actúan en forma aditiva y sinérgica (Sen, 1995d). Los mecanismos de defensa antioxidante están localizados tanto en el medio acuoso como en el lipídico.

Existen diferentes mecanismos antioxidantes en nuestro organismo, para defender a las células de las acciones de los radicales libres. Según su mecanismo de acción los antioxidantes se clasifican en: enzimáticos (Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutacion peroxidasa) y no enzimáticos (Glutacion, dihidrolipoato, vitamina E, ubiquinol o coenzima Q, carotenoides, ascorbato o vitamina C, flavonoides, ácido úrico, manganeso, cinc, selenio, etc.) (López *et al.*, 1998).

Cuando se realiza un esfuerzo físico los enzimas antioxidantes que contribuyen a reducir el daño oxidativo, son glutación peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa y glutación reductasa. Los niveles de estas enzimas en eritrocitos y en músculo esquelético aumentan con el entrenamiento (Brites, 1999).

En el organismo existe un equilibrio entre los RL que se están formando constantemente y las sustancias con actividad antioxidante, cuando este equilibrio se rompe en el sentido que aumenta la cantidad de RL originados y/o las sustancias con actividad antioxidante son insuficientes para capturarlos aparece el llamado estrés oxidativo.

Si el ejercicio aumenta la producción de RL, dicho aumento debería relacionarse con un mayor estrés oxidativo. El método más directo para medir RL sería su cuantificación, pero lo común es la determinación indirecta cuantificando el

daño producido a lípidos (peroxidación), proteínas (formación de grupos carbonilos) o DNA (Halliwell, 1999b).

Dado que el daño oxidativo es un hecho real en el ejercicio o durante una actividad extenuante, especialmente en individuos no entrenados, los efectos de la suplementación antioxidante han suscitado un gran interés, tanto para aumentar el rendimiento del deportista, como para prevenir el daño. Si bien la relación entre los antioxidantes y el rendimiento es controvertida y, probablemente, de escaso efecto, es evidente que los antioxidantes previenen algunos de los daños oxidativos inducidos por el ejercicio, particularmente a largo plazo.

Como se señaló anteriormente, los beneficios del ejercicio físico regular sobre el aparato cardiovascular; el metabolismo energético y las defensas antioxidantes; fuerza y resistencia muscular, y osteoporosis son bien conocidos. Sin embargo existen desventajas como el aumento del consumo de antioxidantes tisulares y cambios en su estado redox. Si la intervención con antioxidantes tendiera a disminuir estos daños, se perfilaría como un enfoque terapéutico prometedor aumentando los beneficios del ejercicio y disminuyendo sus efectos deletéreos.

La defensa antioxidante fisiológica presenta diferencias interindividuales importantes, por lo que sería conveniente la valoración individual de la sensibilidad al estrés oxidativo.

La actividad física regular debe ir asociada a hábitos dietéticos que aseguren un adecuado suministro de la combinación de los antioxidantes adecuados.

1.2.- OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto de los antioxidantes mayoritariamente polifenólicos contenidos en una bebida de reposición diseñada para deportistas sobre el estrés oxidativo provocado en el laboratorio en un grupo de ciclistas profesionales.

Los objetivos concretos consisten en analizar dicho efecto a través de diversos marcadores de estrés oxidativo como son:

- El estado antioxidante total
- Productos de peroxidación lipídica
- Productos de oxidación proteica
- Niveles de actividad de las enzimas lactatodeshidrogenasa y creatinaquinasa.

El análisis de los biomarcadores anteriores nos permitirá evaluar cuáles son los métodos de laboratorio que mejor reflejan el daño oxidativo en las condiciones del estudio.

Por otra parte también se estudia la estabilidad durante el tiempo, en la capacidad antioxidante de la bebida diseñada, almacenada en oscuridad durante un período de 1 año.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

*“Toda la ciencia positiva se ha edificado sobre el análisis y siempre,
sin excepción, se ha empezado por él”
(Ivan P. Paulov)*

2.1.- ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y RADICALES LIBRES

2.1.1.- PAPEL DEL OXÍGENO

Aunque actualmente todos los organismos vivos, salvo ciertos procariotas del grupo de las arqueobacterias, necesitan oxígeno para mantener las funciones vitales, en la historia de la tierra nos encontramos que la atmósfera primitiva no poseía oxígeno. El oxígeno presente actualmente en forma de molécula diatómica (O_2) – que supone un 21% de la composición de la atmósfera – es obra de los seres vivos concretamente de los vegetales, que en su actividad fotosintética utilizan la energía solar para separar el oxígeno del hidrógeno de la molécula de agua. Hace más de 3.000 millones de años fueron probablemente las cianobacterias los primeros organismos capaces de liberar O_2 en la atmósfera primitiva, al utilizar el potencial redox del H_2O para generar el NADH y NADPH, descubriendo de esa manera las grandes posibilidades energéticas que ofrece el oxígeno. Pero teniendo en cuenta también la gran toxicidad de este mismo O_2 , las células productoras tuvieron que adoptar medidas de autoprotección para evitar sus efectos deletéreos (Elejalde, 2001).

En la fotosíntesis la energía solar impulsa la reducción del CO_2 y la oxidación del H_2O formando Hidratos de Carbono y oxígeno molecular. En el metabolismo aeróbico, realizado por los eucariotas y muchos procariotas, tiene lugar un proceso inverso a la fotosíntesis, que permite almacenar la energía libre producida en la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP. También el metabolismo anaeróbico produce ATP, aunque con menor rendimiento, a través de reacciones intramoleculares de oxidación de distintas moléculas orgánicas. Tras estas observaciones queda patente que las reacciones de óxido-reducción son la clave en los principales procesos energéticos-biológicos.

A pesar de que las reacciones de óxido-reducción son imprescindibles para la vida, la oxidación también es fuente de enfermedad cuando se pierde el equilibrio entre prooxidación y antioxidación a favor de los prooxidantes (como ocurre al generarse radicales libres). Nos encontramos entonces con el llamado estrés oxidativo (Ballester, 1996).

La homeostasis de las células sanas se mantiene dentro de unos límites, que están condicionados por su programa genético de diferenciación y especialización, por las células de su vecindad y por la disponibilidad de sustratos; cuando este margen se sobrepasa, se produce la lesión celular (Orrenius, 1987), la cual es reversible hasta cierto punto, ya que si el estímulo persiste o, si es lo bastante intenso desde el principio, la célula llega a un punto sin retorno y se produce la lesión irreversible seguida de la muerte celular. Cuatro sistemas son especialmente vulnerables (Comporti, 1987):

- 1) La membrana celular
- 2) La respiración aerobia (fosforilación oxidativa)
- 3) La síntesis de proteínas enzimáticas y estructurales
- 4) El aparato genético de la célula

Se sabe que el ejercicio físico intenso causa daño muscular y aumenta la actividad de enzimas citosólicas en plasma sanguíneo (como creatina quinasa o lactato deshidrogenasa). El ejercicio físico intenso se caracteriza por un aumento en el consumo de oxígeno y un desequilibrio entre los mecanismos pro-oxidantes de la homeostasis celular aumentando, por tanto, la producción de radicales libres (Yagi, 1987; Priscilla, 2000).

2.1.2. FORMACIÓN, REACTIVIDAD Y FUENTES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas del oxígeno (ERO / ROS) son entidades químicas reactivas que sirven como señales moleculares cuando están a baja concentración, sin embargo, cuando las ERO se producen en exceso muestran efectos perjudiciales. Las ERO difieren unas de otras en las fuentes de las que proceden, los efectos que producen y su reactividad química. Se clasifican en dos categorías (Dhalla, 2000):

- Radicales libres
- Especies no-radicales

Especies reactivas de oxígeno y radicales libres no son términos sinónimos; a diferencia de los radicales libres de oxígeno, las ERO representan un amplio espectro de especies incluyendo derivados del oxígeno no radicales capaces de iniciar y propagar el daño oxidativo tisular.

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)	
RADICALES LIBRES	ESPECIES NO-RADICALES
$O_2^{\bullet-}$ Radical anión superóxido	H_2O_2 Peróxido de hidrógeno
OH^{\bullet} Radical hidroxilo	$HClO$ Ácido hipocloroso
ROO^{\bullet} Radical Peróxido lipídico (peroxilo)	$ONOO^-$ Peroxinitrito
RO^{\bullet} Radical Alcoxilo	$^1O_2 (^1\Delta_g)$ Oxígeno singlete
RS^{\bullet} Radical Tiilo	O_3 Ozono
NO^{\bullet} Radical óxido nítrico	O_2 Oxígeno molecular
NO_2^{\bullet} Radical dióxido de nitrógeno	
$ONOO^{\bullet}$ Radical Peroxinitrito	
CCl_3^{\bullet} Radical triclorometilo	

Tabla 2.1.2.1.- Especies reactivas de oxígeno citotóxicas

Los reactantes de oxígeno se producen como consecuencia inevitable de la vida aeróbica. La forma de generación o la producción de especies reactivas de oxígeno o radicales libres por los sistemas biológicos es muy diversa y amplia, ya que el organismo está continuamente generándolos. El control de sus niveles es esencial para mantener los efectos beneficiosos, como la conversión del piruvato en acetil-S-CoA, la conversión del ácido glutámico en protombina y factores de coagulación VII y IX, la fagocitosis, la activación de las peroxidasas y de NADH oxidasas, entre otros, y prevenir los efectos perjudiciales, como la aterosclerosis, la autoinmunidad, la inflamación crónica, la isquemia-reoxigenación, la artritis reumatoide, el cáncer y el envejecimiento. Los niveles se mantienen gracias a tres líneas de defensa (Das *et al.*, 1995):

- La denominada primera línea la constituyen los antioxidantes (GSSH, tocoferol, caroteno y ascorbato y las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa).
- La segunda línea está formada por las enzimas lipolíticas y proteolíticas.
- Y la tercera línea serán los genes inducibles por el estrés oxidativo.

Existen cada vez más pruebas de que esta protección básica es insuficiente tanto en situaciones que se consideran fisiológicas (el envejecimiento, por ejemplo), como en patologías crónicas y en casos de incremento agudo de radicales de oxígeno. Los procesos patológicos son siempre el resultado de un desequilibrio, entre prooxidantes y antioxidantes que induce modificaciones oxidativas de proteínas, ADN y lípidos.

Un **radical libre** es cualquier molécula o átomo que tiene en su última capa uno o más electrones desapareados (es decir un número impar). El campo magnético creado por su rotación (spin), no se compensa por la rotación en sentido inverso de un electrón apareado. Por ello, los radicales libres son especies más reactivas que los correspondientes no-radicales.

Los radicales libres pueden ser eléctricamente neutros o estar cargados positiva o negativamente. Tienen una vida media muy corta y se encuentran en concentraciones muy pequeñas (lo que determina una gran dificultad en su determinación). Durante su breve vida los radicales actúan como catalizadores o puentes para provocar cambios y reacciones químicas en otras moléculas.

Hasta 1954 no se reconoció el poder destructivo de los radicales libres en los organismos vivos. Irónicamente la culpa recayó sobre el oxígeno, elemento esencial para la vida.

Generalmente, el producto final de una reacción en la que intervenga un radical libre, es el comienzo de otra, por lo que el daño oxidativo se mantiene. Los radicales libres son tanto más peligrosos cuanto mayor es su reactividad, concentración, persistencia y duración de su acción (Ballester, 1996).

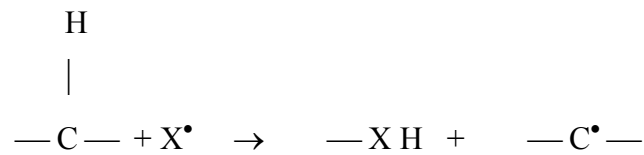
- Cuando reaccionan dos radicales libres se forma un no-radical al combinarse sus electrones desapareados mediante la formación de un enlace covalente. De este modo reaccionan los radicales superóxido y óxido nítrico:



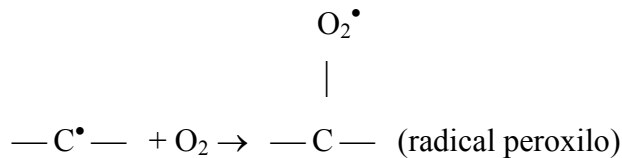
A pH fisiológico, el peroxinitrito daña directamente las proteínas, y se descompone en productos tóxicos que incluyen NO_2^{\bullet} , OH^{\bullet} y NO_2^+ . Así se explica la toxicidad de un exceso de óxido nítrico, que puede ocasionar su reacción con el radical superóxido. Además el radical superóxido puede reaccionar con los iones cobre e hierro, para formar el radical hidroxilo (Haliwell, 1994)

- La reacción de un radical libre con un no-radical desencadena una reacción en cadena para generar un nuevo radical. La mayoría de las moléculas biológicas en los seres vivos son no-radicales y estables, la reacción en cadena de radicales puede ocurrir por exposición continua a radiaciones, al humo de tabaco, etc.

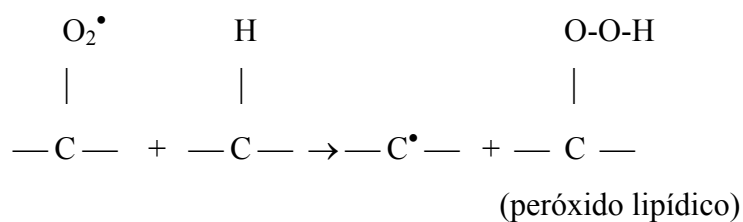
a) El ataque de los radicales libres reactivos (como NO_2^\bullet , OH^\bullet) a las membranas o a las lipoproteínas inicia la peroxidación lipídica, que está particularmente implicada en el desarrollo de la aterosclerosis. El radical libre arranca un átomo de hidrógeno del ácido graso polinsaturado de la membrana o de la lipoproteína, y así deja un electrón desapareado en un carbono:



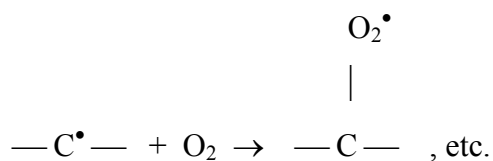
El radical carbono reacciona con el oxígeno:



Se obtiene el radical peroxilo, que reacciona con la cadena mas próxima de ácido graso para generar un nuevo radical carbono:

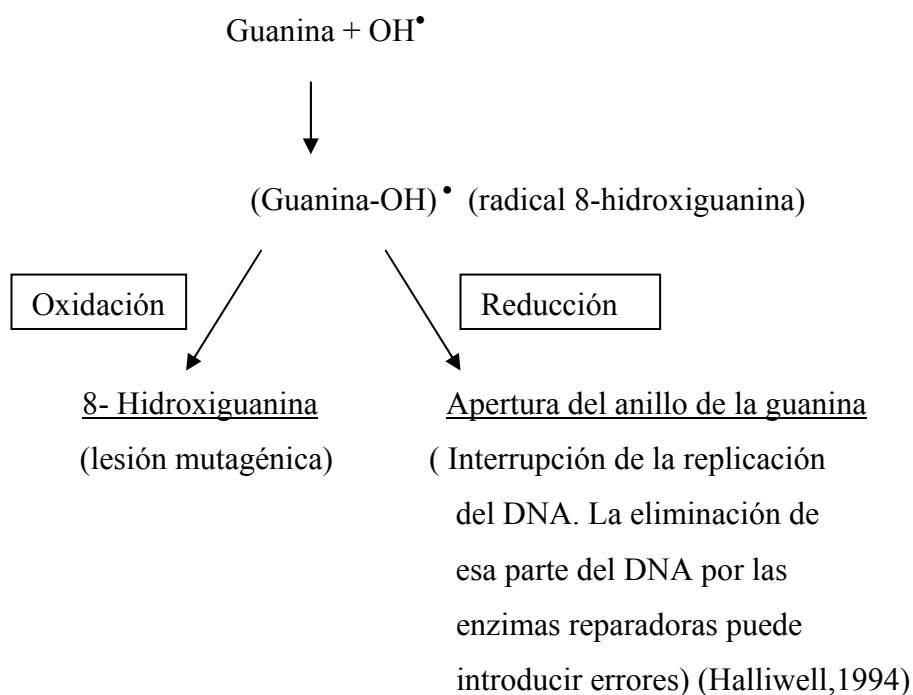


Y continúa la reacción en cadena:



Por lo general, el ataque de un radical libre reactivo puede oxidar muchas cadenas de ácidos grasos hasta peróxidos lipídicos, dañando las proteínas de la membrana, lo que altera la fluidez de la membrana y puede llevar a la rotura de la membrana celular (Halliwell, 1994)

b) La reacción de un radical libre como el hidroxilo con la guanina en el DNA consiste en:



1.- Radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Es una forma reducida del oxígeno molecular, constituido por dos átomos de oxígeno, 17 electrones y una carga eléctrica negativa. En el organismo se forma a partir del O_2 normal por captura de un electrón, cedido por ciertos sustratos (Ballester,1996):

- a) La *oxihemoglobina* (Hb-Fe^{2+})- O_2 , que puede considerarse como una sal del radical superóxido, o sea (Hb-Fe^{3+})- $\text{O}_2^{\bullet-}$. Además de su función de transporte de oxígeno (O_2), libera irreversible y lentamente radical superóxido y la metahemoglobina resultante (Hb-Fe^{3+}) que es incapaz de transportar O_2 , se reconvierte en (Hb-Fe^{2+}) mediante la metahemoglobina reductasa.
- b) En la oxidación de la *xantina* y la *hipoxantina* a *ácido úrico*, por la acción de la enzima *xantina oxidasa*.
- c) Algunos *citocromos* (P_{450}) producen $\text{O}_2^{\bullet-}$ como subproducto, en tanta mayor proporción cuanto mayor es la cantidad de oxígeno disponible, tal y como sucede en el ejercicio físico intenso.
- d) En la cadena de transporte electrónico de las *mitocondrias*, productoras de ATP (trifosfato de adenosina), algunos electrones se fugan para combinarse con oxígeno, para formar $\text{O}_2^{\bullet-}$.
- e) Ciertos iones metálicos libres, como el *hierro ferroso* (Fe^{2+}) y el *cobre cuproso* (Cu^{2+}), ceden un electrón al oxígeno:
$$\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fe}^{3+}$$
- f) El $\text{O}_2^{\bullet-}$ es segregado por los *leucocitos* que migran hacia las lesiones tisulares, a partir del H_2O_2 .
- g) Por autooxidación de *catecolaminas* y *tetrahidrofolato*

Aproximadamente entre 1-3% del oxígeno que respiramos es usado para formar $\text{O}_2^{\bullet-}$. En situaciones con un alto consumo de oxígeno, como es el ejercicio físico de alta intensidad, un organismo puede llegar a producir 2 Kg de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en un año (Halliwell, 1994).

En solución acuosa, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede oxidar el ácido ascórbico y reducir ciertos complejos de hierro como el citocromo-c y el (Fe^{3+} - EDTA).

La enzima superóxido dismutasa acelera unas 10.000 veces la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 (Ballester, 1996)



El radical superóxido reacciona con cationes como el hierro y el cobre para producir especies más reactivas, como el radical hidroxilo (OH^{\bullet}). La forma protonada del radical superóxido es el radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}).

2.- Radical hidroxilo (OH^{\bullet})

Es uno de los radicales libres más lesivos que ataca a las proteínas y lípidos de las membranas celulares, debido a su semejanza fisicoquímica con el agua y a su pequeño tamaño, que facilitan su penetración en las membranas celulares, produciendo en éstas efectos tóxicos. Tiene una vida media muy corta en las células, estimada en 10^{-9} seg. (Aruoma, 1998). Su precursor químico inmediato es el peróxido de hidrógeno. El radical OH^{\bullet} se produce por dos reacciones biológicas:

a) El H_2O_2 en presencia de ión ferroso (y cuproso) libre da el radical OH^{\bullet} (Dhalla, 2000):

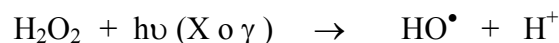


El H_2O_2 forma radicales HO^{\bullet} por:

1 a) acción de las radiaciones UV:



2 a) reacción de las radiaciones X o γ sobre el agua:



3 a) reacción del radical NO^\bullet con el $\text{O}_2^{\bullet-}$.

b) El H_2O_2 en presencia del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ genera HO^\bullet :



En el caso de la formación de HO^\bullet por la reacción de Fenton, el grado de formación está principalmente determinado por la disponibilidad y localización del ión catalítico (Aruoma,1998).

En un estudio *in vitro* combinando las técnicas de cromatografía de gases, masas y espectrofotométricas (CG/MS/SIM) y monitorizando un ión seleccionado, se comparó la actividad de los iones hierro y cobre con el peróxido de hidrógeno sobre el daño al DNA. La adición de iones cuprosos causó significativamente más daño al DNA que la adición equimolar de iones ferrosos.

La disponibilidad de hierro libre y cobre en el organismo *in vivo*, está controlada. Los iones ferrosos se absorben en el intestino y son transportados hasta las células unidos a la proteína transferrina. El hierro unido a la transferrina no participa de las reacciones de radicales libres. El exceso de hierro es almacenado como ferritina y hemosiderina como reserva del organismo. La mayoría del cobre plasmático en humanos se halla unido a la proteína ceruloplasmina, no estimulando así las reacciones de radicales libres en condiciones fisiológicas normales (Aruoma *et al.*,1991).

La formación de radicales hidroxilo se produce cuando se altera la homeostasis. Por ejemplo, los iones ferrosos y cuprosos liberados en el torrente mediante perfusión, pueden causar daño por isquemia/reperfusión.

En sistemas deficientes en mieloperoxidasa, es necesario adicionar hierro para detectar HO^\bullet . De este modo, los neutrófilos y monocitos humanos pueden

generar HO^\bullet a través de un mecanismo dependiente de la mieloperoxidasa, que puede tener implicaciones bactericidas.

3.- Radical óxido nítrico (NO^\bullet) , Radical dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y Radical Peroxinitrito (ONOO^\bullet)

El NO^\bullet es generado en el organismo por las células del endotelio vascular, a partir de L-arginina y oxígeno molecular, como un factor de relajación (EDRF), también es generado por los fagocitos y en algunas células del cerebro. El óxido nítrico tiene muchas funciones beneficiosas en el organismo (es un importante agente vasodilatador, neurotransmisor, acción protectora frente a microorganismos patógenos), pero un exceso de óxido nítrico puede ser tóxico (Halliwell, 1994).

Cuando el NO^\bullet reacciona con el O_2 , se produce NO_2^\bullet que inicia la peroxidación lipídica. La toxicidad del NO^\bullet también se debe a que reacciona con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar peroxinitrito, a una velocidad de $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; reacción implicada en la vasoconstricción de las células del músculo liso y en la aterosclerosis (Dhalla, 2000):



A pH fisiológico, el peroxinitrito daña directamente las proteínas, y se descompone en productos tóxicos que incluyen NO_2^\bullet , OH^\bullet y NO_2^+ .

La reacción entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO^\bullet también produce daño oxidativo al DNA, debido a la formación de ONOO^\bullet , que puede generar OH^\bullet y así provocar la formación de nitroguanina y otros productos. Según Salgo *et al.*, (1995), el ONOO^\bullet es capaz de alterar el DNA del plásmido pBR322, y los autores sugieren que el ONOO^\bullet actúe como mediador en la toxicidad dependiente del NO.

Además el peroxinitrito tiene una actividad bactericida, transforma las LDL a una forma que puede ser reconocida por los receptores capturadores de macrófagos, induce la peroxidación lipídica, oxida los residuos de metionina y -SH de las proteínas, consume antioxidantes (como ascorbato y glutatión), conduce a la nitración de residuos de tirosina, inactiva α_1 -antiproteinasas (α_1 -AP). La nitración de residuos de tirosina parece ser un marcador del daño *in vivo* dependiente del ONOO⁻ (Haliwell,1994).

Contienen NO[•] y su producto de oxidación, (el radical NO₂[•]), los humos y gases de combustión, y también se forman en la atmósfera por combinación del oxígeno con el nitrógeno por efecto de efluvios y descargas eléctricas y de radiaciones ionizantes.

El radical NO[•] ejerce una acción reguladora de la función celular y tisular. Esto incluye la capacidad para reconocer la señal de transducción, vía estimulación de la guanilato ciclasa, de la síntesis de cGMP (el ONOO⁻ también potencia la acción de la guanilato ciclasa).

Sessa *et al.* (1994) observaron en perros que, el ejercicio crónico, presumiblemente por un aumento del estrés endotelial, aumenta la producción de EDRF/ NO[•] y la expresión genética de la NO[•] sintasa en células endoteliales, lo que puede contribuir a los efectos beneficiosos del ejercicio en el esfuerzo cardiovascular.

4.- Radical Peróxido lipídico (peroxilo) (ROO[•])

Estos radicales (RO₂[•]) son especies intermedias formadas durante las reacciones en cadena de la oxidación lipídica, como en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

La peroxidación lipídica puede ser iniciada por especies suficientemente reactivas, capaces de sustraer un átomo de H de la cadena de AGPI (p.e. ácido araquidónico y ácido linolénico) de los lípidos de la membrana celular. El ácido araquidónico es un precursor de las prostaglandinas y los leucotrienos, que contiene grupos metilenos alternados con dobles enlaces, que son particularmente susceptibles de la abstracción del átomo de H.

La formación de los RO_2^\bullet *in vivo* se relaciona con las condiciones de estrés oxidativo, como sucede en situaciones patológicas asociadas con la inflamación (Aruoma, 1998).

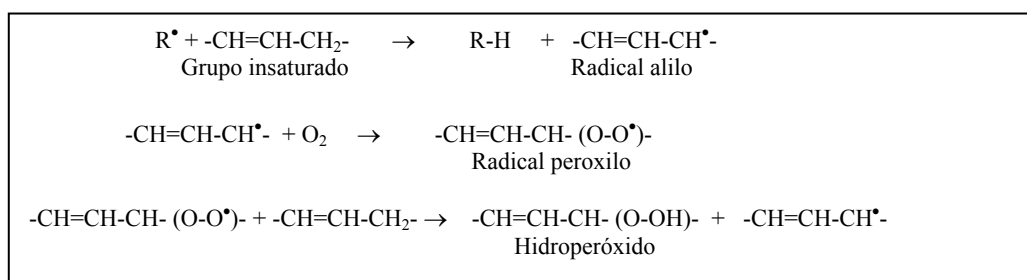


Figura 2.1.2.2.- Mecanismo en cadena de la peroxidación de los lípidos insaturados iniciado por un radical libre (R[•]) y propagado por el oxígeno molecular.

5.- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Es una especie no-radical dentro de las ERO, ya que no presenta electrones desapareados, que se forma a partir de especies radicales, como por ejemplo el radical superóxido. La reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ catalizada por la SOD genera H_2O_2 , que es fácilmente difusible entre las células.

El H_2O_2 también se forma por la acción de algunas oxidasas como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa.

Algunas de las funciones del H_2O_2 son la regulación de genes, especialmente los que están controlados por el factor de transcripción nuclear (NF- κ B) y la inducción de Ca^{2+} intracelular. En este punto es importante mencionar que el H_2O_2 es un precursor del radical HO^\bullet (en presencia de metales de transición, y de oxígeno que facilitan esta reacción) y del ácido hipocloroso (Dhalla, 2000).

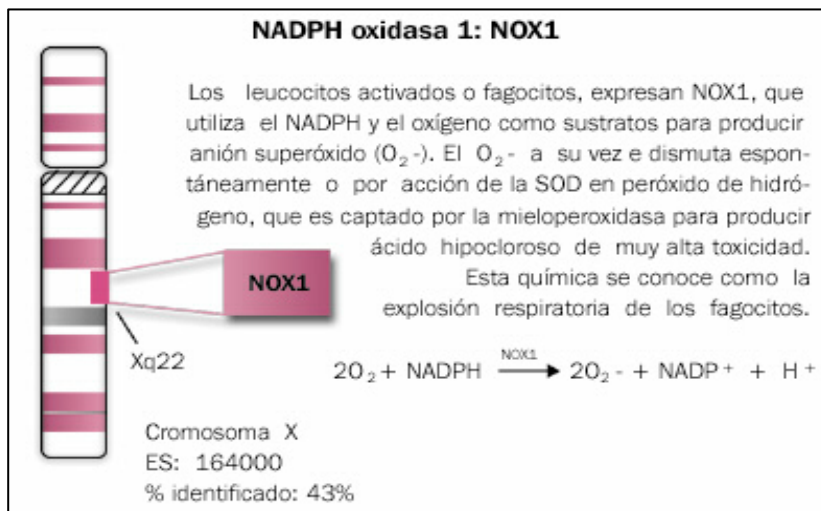
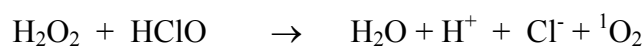
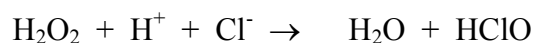


Figura 2.1.2.3.- NADP oxidasa en la formación del radical superóxido

En neutrófilos estimulados, la oxidasa NADPH-dependiente reduce el oxígeno molecular hasta radical superóxido y peróxido de hidrógeno. El ión cloruro y el H_2O_2 forman HClO en presencia de mieloperoxidasa. El H_2O_2 y HClO reaccionan dentro y fuera de la célula generando otros oxidantes no-radicales como el oxígeno singlete en neutrófilos humanos:



A muy baja concentración (micromolar) el H₂O₂ también es muy reactivo, y a concentraciones elevadas puede dañar los sistemas celulares productores de energía, por ejemplo inactivando la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa. (Aruoma, 1998).

6.- Ácido hipocloroso (HClO)

Es producido en presencia de mieloperoxidasa de neutrófilos localizados en el lugar de la inflamación y en neutrófilos estimulados en el infiltrado de tejidos reoxigenados. La enzima oxida el ión cloruro en presencia de H₂O₂.

Un total de 5x10⁶ neutrófilos humanos estimulados en 1 mL produce ácido hipocloroso (HClO) 88 μM en 2 h a 22°C. El ácido hipocloroso es una especie reactiva de oxígeno, que no es radical libre, pero que es un potente agente oxidante capaz de atacar otras moléculas biológicas.

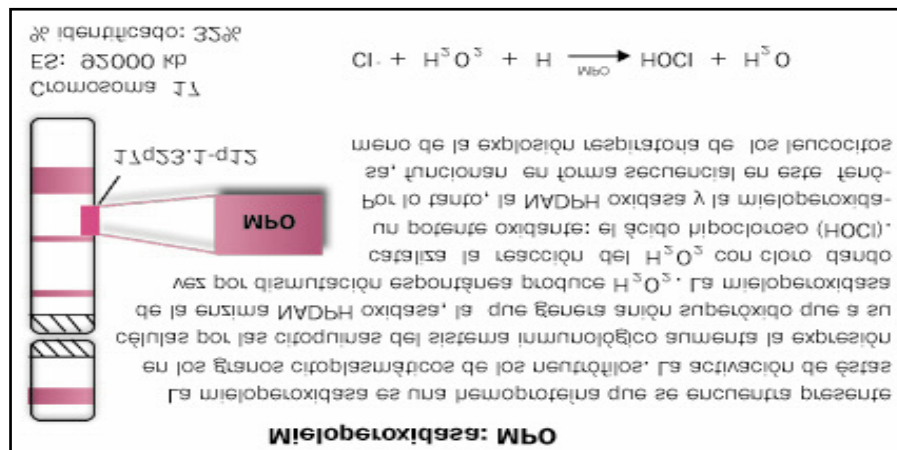


Figura 2.1.2.4.- Mieloperoxidasa en la formación del ácido hipocloroso

Así, el inhibidor proteolítico α-1-antiproteinasas (α₁AP) es en el plasma humano, el mayor inhibidor de enzimas proteolíticas, como la elastasa. El α₁AP contiene alrededor del 90% de la capacidad inhibitoria de la elastasa en el plasma, por lo que su inactivación por el HClO puede conllevar un daño tisular, ya que la elastasa se libera con la estimulación de los neutrófilos. El HClO ataca aminas

primarias y grupos sulfhidrilos en proteínas. A las concentraciones fisiológicas de HClO puede reaccionar con aril-aminas sustituidas (como anilina, 1-naftilamina y 1-naftol) para formar productos capaces de unirse al DNA, siendo así genotóxico para las células humanas.

Los compuestos fenólicos reaccionan eficazmente con el HClO, protegiendo así las moléculas susceptibles de ser atacadas antes de su oxidación (Aruoma, 1998).

7.- Oxígeno molecular (O_2) y Oxígeno singlete (1O_2)

El átomo de oxígeno posee 8 electrones. De la unión de dos de ellos resulta el oxígeno molecular, O_2 (oxígeno atmosférico), con 16 electrones: 14 apareados y dos desapareados. Por consiguiente, la molécula del O_2 es un birradical, llamado *oxígeno triplete* (3O_2) por razones derivadas de su espectro; puesto que tiene un electrón desapareado en cada uno de sus orbitales externos antienlazantes π^* . Sin embargo, la reactividad de esta molécula es baja porque los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Para que el oxígeno pudiese oxidar un átomo o una molécula que no fuese radical libre aceptando un par de electrones, éstos deberían ser de espines paralelos (Cadenas, 1989).

A pesar de su carácter radicalario, el oxígeno es estable y moderadamente agresivo. Para que el oxígeno molecular aumente su reactividad ha de invertir el espín de uno de los electrones de sus orbitales externos, o bien ha de sufrir una reducción secuencial y univalente para producir radicales de oxígeno.

La reducción univalente del oxígeno, un proceso con significación biológica en la producción de energía, se refiere a la reducción del oxígeno molecular por un electrón de una sola vez. Los productos intermedios producidos en este proceso son especies de oxígeno muy reactivas (ERO), y algunas de estas especies reactivas intermediarias pueden escapar del proceso por la reducción tetravalente completa y

reaccionar con estructuras biológicas induciendo el daño oxidativo, produciendo a su vez nuevas ERO capaces de iniciar y propagar el daño tisular (Sen, 1995).

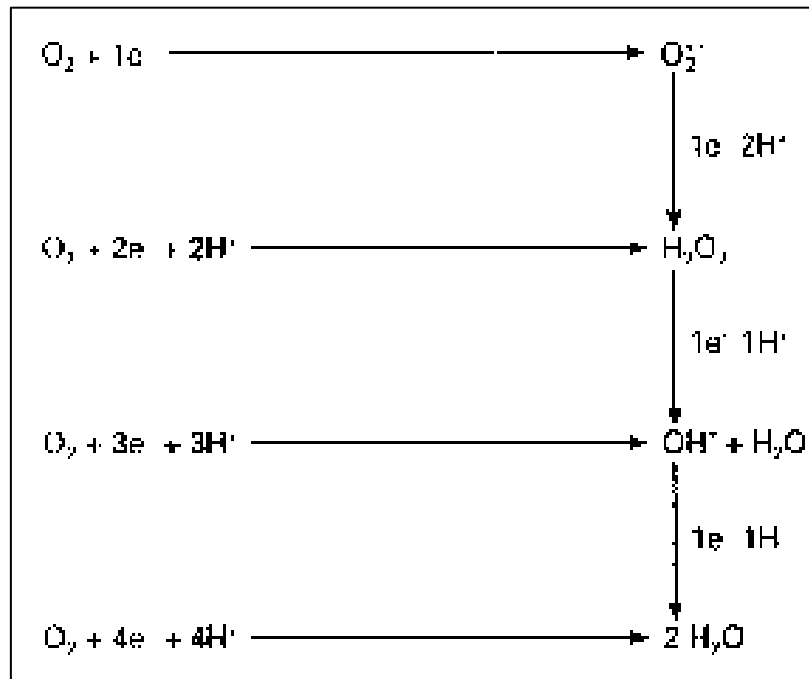


Figura 2.1.2.5.- Formación de ERO a partir de la reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular

Mediante un impulso de energía, se puede producir la inversión de los electrones de los orbitales externos del oxígeno molecular, y se originan los oxígenos *singlete*. Existen dos tipos de *oxígeno singlete*:

1. El *oxígeno singlete delta* (¹ΔgO₂) que debido a su larga vida media, es el de mayor importancia biológica.
2. El *oxígeno singlete sigma* (¹Σg⁺) es más reactivo que el anterior, pero de semivida corta, porque decae después de ser formado de forma muy rápida, al estado delta (Proctor y Reynolds, 1984; Cadenas, 1989). Su inestabilidad se debe a que presenta dos electrones en la órbita mas externa con los spines en direcciones opuestas. Se obtiene por termolisis de ciertos endoperóxidos de naftaleno y por la acción de la luz visible o de las radiaciones ultravioleta (UV) en presencia de

fotosensibilizadores, como la clorofila y la riboflavina (vitamina B₂), así como de ciertos fármacos. El ¹O₂ ataca directamente a los lípidos del organismo (Ballester, 1996).

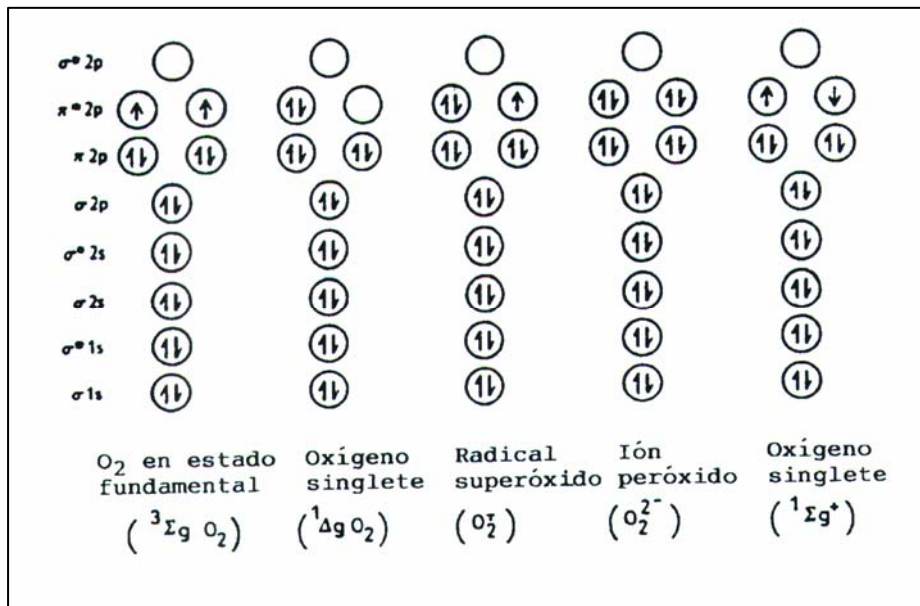


Figura 2.1.2.6.- Estados energéticos del oxígeno molecular (Martínez-Cayuela, 1998)

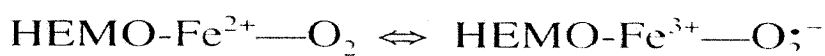
2.2.- PRINCIPALES SISTEMAS BIOLÓGICOS CAPACES DE PRODUCIR ERO

➤ Autooxidación de pequeñas moléculas

Diferentes moléculas citoplasmáticas pueden producir ERO cuando se autooxidan. En todos los casos se produce como radical primario el $O_2^{\cdot -}$ que por una reacción de dismutación espontánea o enzimática puede dar lugar a H_2O_2 . Cuando esas moléculas oxidadas se vuelven a reducir, se establece un ciclo redox que puede implicar un consumo desproporcionado de oxígeno molecular y equivalentes redox. Entre estas moléculas se encuentran iones divalentes, tioles, quininas, catecolaminas, tetrahidropterinas y flavinas (Freeman y Grapo, 1982; Proctor y Reynolds, 1984).

➤ Oxidación de hemoglobina y mioglobina

La oxidación de estas hemoproteínas puede producir radicales libres de oxígeno. El hierro de la hemoglobina y de la mioglobina cuando está unido al O_2 , está normalmente en la forma ferrosa, pero existe una cierta dislocación electrónica, de manera que se produce el equilibrio siguiente:



Es posible que la molécula de hemoglobina oxigenada se descomponga y de lugar a $O_2^{\cdot -}$ y Hemo- Fe^{3+} . En ese punto, la hemoglobina, ya metahemoglobina, no puede transportar oxígeno. Normalmente, sólo una baja proporción de oxihemoglobina es transformada en metahemoglobina debido a la acción de las metahemoglobina reductasas (Valenzuela y Videla, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1999).

➤ **Actividad de enzimas**

Diversas enzimas generan ERO durante su ciclo catalítico. Entre ellas se encuentran la dihidroorotato-deshidrogenasa, la triptófano-dioxigenasa, la aldehidoxidasa, la monoaminoxidasa, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa, la ciclo oxigenasa, la lipoxigenasa y la NADPH oxidasa. En algunos casos, las ERO que se forman inactivan las enzimas que las originan y, de esta forma, regulan la ruta metabólica en la que participan (Sies, 1985; Southorn y Powis, 1988; Greens y Paller, 1992).

➤ **Peroxisomas**

Se ha comprobado que los componentes que estimulan la proliferación de los peroxisomas inducen al estrés oxidativo. Estos orgánulos tienen una gran capacidad para producir H_2O_2 debido a la elevada concentración de oxidasas que contienen.

Algunos ejemplos son: las -L- y D-aminoácido oxidasas, la glicolato oxidasa o la urato oxidasa. Estas enzimas catalizan la reducción divalente del O_2 sin formación del radical superóxido. La oxidación peroxisómica de ácidos grasos también genera H_2O_2 como subproducto (Southorn y Powis, 1988; Del Rio *et al.*, 1992).

➤ **Transporte electrónico mitocondrial**

El sistema de transporte electrónico mitocondrial es la principal fuente de $O_2^{\bullet-}$. La citocromo oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular con cuatro electrones para formar dos moléculas de agua. El diseño molecular de esta enzima impide la liberación de los radicales libres. Sin embargo, cuando la cadena respiratoria está muy reducida y la concentración de ADP es limitante, otros componentes de la cadena respiratoria si pueden perder electrones durante su transferencia y generar $O_2^{\bullet-}$. La formación de radicales libres de oxígeno durante el

transporte electrónico mitocondrial se ve favorecida por elevadas concentraciones de oxígeno (Reed, 1997; Beckman y Ames, 1998).

➤ **Transporte electrónico microsomal**

Las fracciones microsomales liberan $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 cuando se tratan con NADPH. El denominado citocromo P450 es, en realidad, un conjunto de citocromos, localizados en el retículo endoplasmático y otros orgánulos. Estos citocromos están implicados en la oxidación de sustratos a expensas de O_2 , uno de cuyos átomos se une al sustrato y el otro forma el agua. En la reacción se requiere poder reductor que normalmente es aportado por el NADPH a través de una flavoproteína denominada NADPH-citocromo P450 reductasa. Cuando se acopla el ciclo catalítico del citocromo P450, el flujo de electrones se desvía al O_2 , que se convierte en $O_2^{\bullet-}$ en lugar de unirse al sustrato. La autooxidación de la NADPH –citocromo P450 reductasa también puede originar $O_2^{\bullet-}$ (Sevanian *et al.*, 1990; Beckman y Ames, 1998).

El citocromo b5 es una hemoproteína del sistema de transporte electrónico microsomal responsable de la introducción de doble enlaces en los ácidos grasos. Los electrones se transfieren desde el NADH o NADPH al citocromo b5 por una flavoproteína reductasa y el citocromo b5 a su vez los cede a la desaturasa. Finalmente, esta proteína oxida al ácido graso con oxígeno y forma agua. Por causas desconocidas es posible que el citocromo b5 y la flavoproteína cedan electrones al O_2 y generen $O_2^{\bullet-}$ (Freeman y Grapo, 1982 ; Valenzuela y Videla, 1989).

➤ **Los leucocitos polimorfonucleares** utilizan las ERO en las reacciones inflamatorias en sus mecanismos defensivos frente a bacterias, para destruirlas y defender de su invasión al organismo (O_2^- , H_2O_2 , HClO, OH \cdot). Los neutrófilos acceden a la zona inflamada asociados a células endoteliales. Si la lesión muscular es significativa, los neutrófilos migran hacia el músculo. Los radicales libres producidos

durante el ejercicio juegan un papel importante promoviendo la permeabilidad vascular y activando las sustancias que atraen los neutrófilos (Mc Cord, 1980).

La presencia de radicales libres, puede ser el factor desencadenante de la infiltración por neutrófilos en el músculo lesionado y la subsiguiente respuesta inflamatoria (Atalay *et al.*, 1996).

Los neutrófilos generan el radical superóxido mediante la vía de la cadena respiratoria debido a la acción de la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática. En los neutrófilos activados, la NADPH oxidasa transporta electrones del NADPH citosólico al oxígeno disuelto en el fluido extracelular, formando el anión superóxido (Weiss, 1982).

➤ Radicales libres generados a partir del óxido nítrico

El NO^\bullet como agente prooxidante conduce a la formación de moléculas altamente oxidantes, ya que puede reaccionar con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y formar peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman *et al.*, 1994), un potente agente oxidante, que puede ser

protonado rápidamente y producir otras dos moléculas oxidantes, que son el HO^\bullet y el dióxido de nitrógeno (Sergent *et al.*, 1997).

El ONOO^- puede producir daño oxidativo en lípidos, desoxirribosa, α -tocoferol, aminoácidos y proteínas (Sergent *et al.*, 1997). Por otra parte, el NO^\bullet puede reaccionar con H_2O_2 y formar oxígeno singlete, y además aumentar la formación de HO^\bullet mediante la liberación de hierro de la ferritina (Sergent *et al.*, 1997).

El NO^\bullet puede ser considerado un agente antioxidante, ya que se ha descrito que este radical puede inhibir el estrés oxidativo, inducido en hepatocitos por hierro o etanol, debido a que reacciona con el hierro formando un complejo inactivo que

no puede promover la formación de HO^\bullet , lo que conduce a una disminución del contenido de MDA y de conjugados diénicos, índices de lipoperoxidación (Sergent *et al.*, 1997).

➤ **Fuentes exógenas**

Además de los sistemas intracelulares, existen también fuentes exógenas de radicales libres. La radiación ionizante, la radiación ultravioleta o la luz visible en presencia de fotosensibilizadores pueden dar lugar a radicales libres. La formación de radicales libres también está implicada en la toxicidad de una amplia variedad de xenobióticos.

Realmente, muchos de estos compuestos químicos ejercen su acción tóxica mediante la activación metabólica a productos intermedios reactivos que son los radicales libres. Entre estos compuestos se encuentran diversos pesticidas, el humo de tabaco, antimicrobianos, fármacos anticancerígenos y otros medicamentos (Martínez-Cayuela, 1998).

2.3.-PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS DE SEÑALES CELULARES

Los numerosos mecanismos, físicos, químicos y biológicos, que inducen estrés oxidativo, han determinado por parte de las células, un número de respuestas que les permite sobrevivir al daño que producen los radicales libres de oxígeno. El estrés oxidativo activa la expresión de varias moléculas de señal que no son específicas de esa agresión, ya que regulan las respuestas celulares ante otras agresiones, así como participan en la regulación del metabolismo normal y del crecimiento (Finkel y Holbrook, 2000).

Entre los mecanismos de señales ante el estrés oxidativo se encuentran las cascadas de señales de las quinasas, que son enzimas presentes en algunos tejidos del organismo, que sirven para activar proenzimas. Entre estas quinasas se encuentran la de regulación extracelular (ERK) y la quinasa amino terminal c-Jun (JNK), entre otras. Indudablemente, en algunas situaciones, la respuesta a los radicales libres de oxígeno produce sobreestimulación de señales que normalmente son reguladas por estas especies.

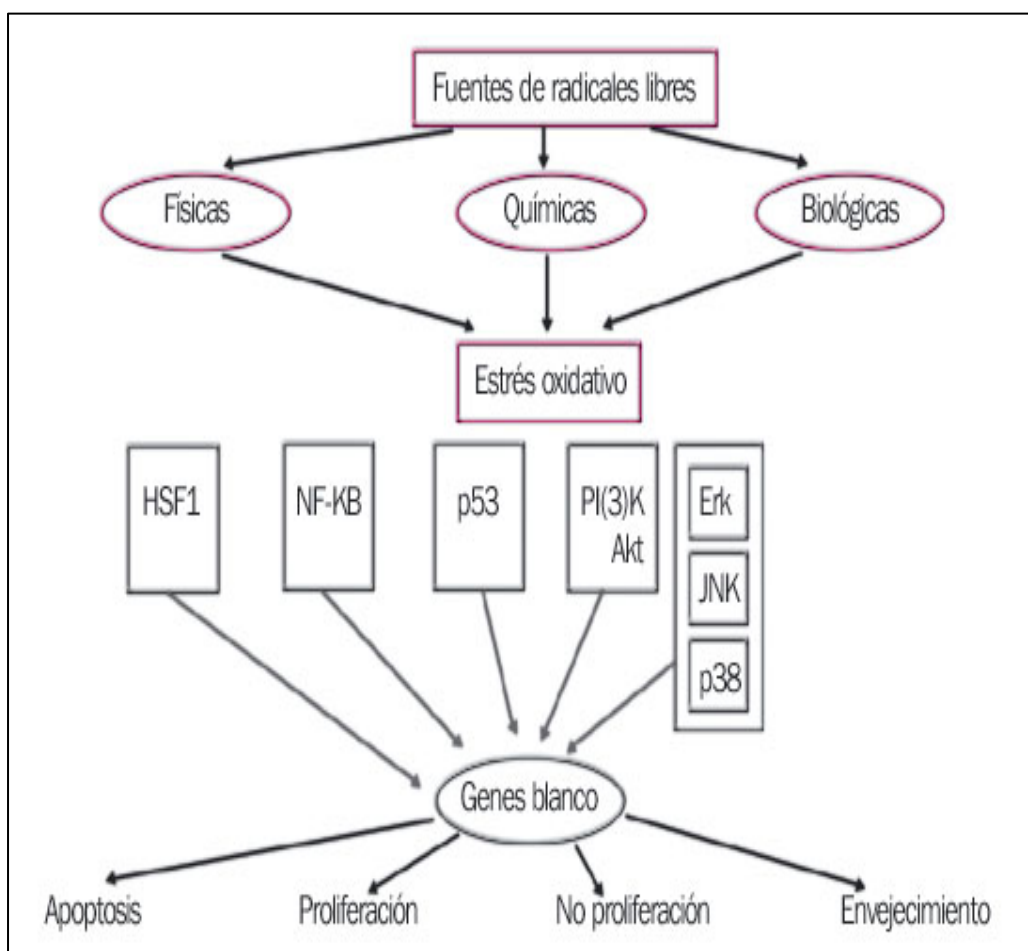


Figura 2.3.1.- Principales mecanismos de señales celulares que se activan como respuesta al estrés oxidativo. La cascada de estas señales aumentan la expresión de genes blanco que inducen o inhiben mecanismos de apoptosis y proliferación celular.

2.4.-EFECTOS BENEFICIOSOS DE LAS ERO

Aunque parezca paradójico, las especies reactivas de oxígeno también poseen efectos beneficiosos ya que desempeñan un papel importante en multitud de reacciones biológicas, estas reacciones son :

1) Los leucocitos polimorfonucleares los utilizan en las reacciones inflamatorias en sus mecanismos defensivos frente a las bacterias, para destruirlas y defender al organismo de su invasión.

En la fagocitosis normal, las ERO destruyen los microorganismos invasores mediante un proceso comúnmente conocido como *explosión respiratoria* (Sha'Afi *et al.*, 1988; Lilius *et al.*, 1992). Las ERO son capaces de inducir genes como c-fos, c-myc, c-jun y β -actin; los que codifican factores de transcripción implicados en la traducción del crecimiento, diferenciación y desarrollo celular (Amstad *et al.*, 1992). A través de este mecanismo en la inflamación temprana, las ERO pueden contribuir a paliar la situación inflamatoria.

2) Los radicales libres de oxígeno actúan como mediadores esenciales en la apoptosis (muerte programada). Se ha observado, en experimentos de cultivo celular que los antioxidantes, al suprimir la generación de radicales libres, bloquean la capacidad de los fármacos anticancerosos de destruir las células con cáncer.

3) Los radicales superóxido participan de manera esencial en el sistema de metabolización de productos tóxicos, que elimina numerosas sustancias nocivas del organismo. El papel fisiológico del radical superóxido es posible que potencie la vasorregulación (Halliwell, 1989) y la proliferación de fibroblastos (Sen, 1995).

4) El óxido nítrico (NO^*) es un radical libre inorgánico que actúa como factor de relajación endotelial, participando además como neurotransmisor en el sistema

nervioso central (Zentella, *et al.*, 1996) y en la respuesta fagocítica de algunos macrófagos (Knowles, 1994). La síntesis de NO[•] es catalizada por la NOS, para la cual se han descrito tres isoenzimas presentes en diferentes tipos de células. Las isoenzimas nNOS, presentes en el tejido neuronal y eNOS, que se encuentran en las células endoteliales vasculares, son dependientes de calcio. La isoenzima iNOS, identificada en macrófagos, hepatocitos y células pulmonares, es inducible por endotoxinas o citoquinas y es independiente del calcio (Knowles, *et al.*, 1990; Knowles, *et al.*, 1994). La síntesis hepática de NO[•] es catalizada por una iNOS y ocurre en hepatocitos, en células endoteliales y en células de Kúpffer donde se ha descrito una baja actividad (Knowles, *et al.*, 1990). Para la síntesis de NO[•] la NOS utiliza L-arginina y NADPH, generando NO[•] y citrulina. Esta reacción requiere además de oxígeno, cuatro cofactores [Protoporfirina IX, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (BH4)] y la presencia de calmodulina (Knowles, *et al.*, 1994).

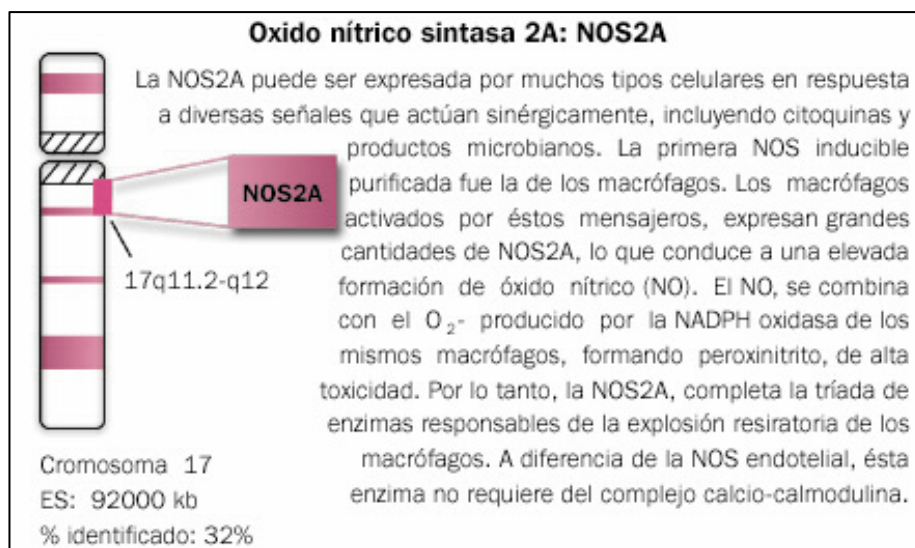


Figura 2.4.1.- Óxido nítrico sintasa 2 A en la formación de NO

Tiene un especial interés en la respuesta inflamatoria del músculo en el postejercicio por la aparente capacidad del NO para inhibir la proliferación de linfocitos y la producción del radical superóxido en los neutrófilos circulantes

(Tiidus, 1998). Sin embargo, la posible influencia local del NO en la perfusión y vasodilatación muscular, puede provocar la respuesta inflamatoria inicial tras el ejercicio (Tiidus, 1998). Aunque la influencia del NO en la respuesta inflamatoria no se conoce con exactitud, se sabe que el NO es producido en el músculo y que dicha producción se acompaña de un aumento en el consumo de oxígeno (Tiidus, 1998).

2.4.1. RADICALES LIBRES Y EXPRESIÓN GÉNICA

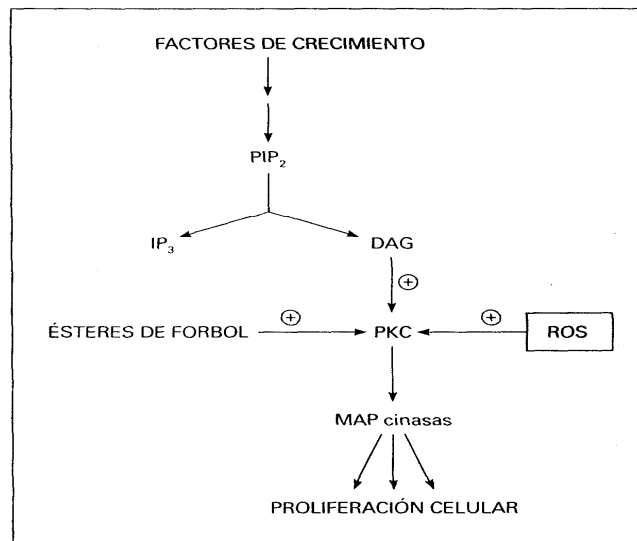
La relación de los radicales libres con la etiopatogenia de una larga serie de enfermedades está bien documentada (Martínez-Cayuela, 1998). En muchos casos, los mecanismos implicados se corresponden con los efectos citotóxicos que posteriormente se describirán. Sin embargo, en los últimos años se han descrito algunos efectos moduladores de los radicales libres sobre la expresión génica (Cimino *et al.*, 1997) que abren nuevas perspectivas en la comprensión del papel de estos compuestos como agentes patógenos.

Existen muchas posibilidades de actuación de los radicales libres en la compleja red de mecanismos bioquímicos que enlazan las señales extracelulares con la síntesis de proteínas específicas: receptores, proteínas transductoras, proteína cinasas, factores de transcripción, etc. Se conoce que al menos tres factores de transcripción parecen sensibles al estado redox celular, el factor nuclear kB (NFkB), el activador de proteínas (AP-1) y el receptor activado de proliferación de peroxisoma (PPAR). Muchas de estas proteínas son susceptibles de regulación por el equilibrio redox, especialmente los residuos de cisteína. Nos centraremos concretamente en dos sistemas bien estudiados: la proteína cinasa C y el factor de transcripción NF-kB.

Proteínaquinasa C

La proteínaquinasa C (PKC), cataliza una etapa inicial en la cascada de señales que regulan procesos celulares como la proliferación, la adhesión, apoptosis, la angiogénesis, la invasión y la metástasis. Concretamente, esta enzima modula la proliferación celular a través de la activación de las llamadas MAP cinasas (proteínasquinasas activadas por mitógenos). Resulta evidente, por tanto, que la activación de la PKC por los radicales libres puede resultar decisiva en la promoción y la progresión tumoral. Asimismo, esta activación puede ser relevante en la estimulación de la proliferación de las células del músculo liso durante el proceso aterosclerótico.

Está bien establecido que las etapas de inicio de la carcinogénesis están mediadas en muchos casos por reacciones químicas de oxidación sobre el ADN. Los radicales libres pueden originar, por ejemplo, mutaciones en oncogenes que estimulen excesivamente la proliferación celular (Oliva *et al.*, 1997). Pero para el desarrollo neoplásico se suele necesitar, además, que las células iniciadas sufran un proceso de promoción, es decir, que reciban un estímulo a su proliferación selectiva sobre las demás células no iniciadas. Este proceso de promoción lo pueden realizar, compuestos diversos (alcohol, cloruro sódico, hormonas, etc.) por mecanismos no siempre bien conocidos, pero considerados, generalmente como no oxidativos, al contrario de lo que ocurre con los factores iniciadores. Lo que está claro, sin embargo, es el papel relevante que desempeña la PKC en la promoción tumoral, porque para inducir esta etapa en experimentación animal se suelen emplear precisamente como agentes artificiales los ésteres de forbol, que son estimulantes de dicha enzima. En condiciones naturales, los activadores de la PKC son los diacilgliceroles (DAG) formados en respuesta a los estímulos proliferativos a partir del fosfatidilinositol (PIP₂).



Regulación de la proteína cinasa C (PKC). PIP₂: fosfatidil inositol difosfato; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; ROS: especies reactivas de oxígeno; MAP cinasas: proteína cinasas activadas por mitógenos.

Fig. 2.4.1.1- Regulación de la Proteínaquinasa C (PKC)

Este estímulo es, lógicamente, transitorio porque los DAG se metabolizan rápidamente. En cambio, los ésteres de forbol, que son análogos estructurales de los DAG, son metabólicamente estables y ejercen una activación más prolongada de la PKC. La activación de la PKC por los radicales libres puede explicarse razonablemente en términos moleculares. En efecto, la enzima tiene un dominio N-terminal que es autoinhibidor, rico en residuos de cisteína que pueden ser afectados por los peróxidos. La oxidación de estos residuos se reflejaría, por tanto, en un estímulo de la actividad enzimática. Parece lógico pensar que la regulación de la PKC por el estado redox celular constituye un mecanismo de promoción tumoral, mecanismo que proporcionaría una explicación adicional al papel de los antioxidantes, especialmente la vitamina E, en la prevención del cáncer (Gopalakrishna y Jaken, 2000).

Además de su implicación en la promoción tumoral y la proliferación de las células de músculo liso en la aterosclerosis, la PKC interviene en el desarrollo de algunas de las complicaciones crónicas de la diabetes. Se sabe que estas

complicaciones se deben fundamentalmente a la hiperglucemia a través de mecanismos diversos, entre los cuales se encuentra la activación de esta enzima (Koya y King, 1998). Es interesante resaltar que la activación de la PKC en estas condiciones parece estar mediada también por la producción incrementada de los radicales libres debida al funcionamiento excesivo de las cadenas de transporte electrónico mitocondrial, como consecuencia del aporte continuado de glucosa a las células afectadas (Nishikawa *et al.*, 2000).

Factor de transcripción NF- κ B

Este factor de transcripción está presente en muchos tipos de células y desempeña un papel decisivo en diversos procesos celulares, como la respuesta inmunitaria, la apoptosis, la inflamación y la proliferación celular. Esto explica el interés de su estudio en enfermedades que incluyen una respuesta inflamatoria crónica y un importante componente de proliferación celular, como es la aterosclerosis.

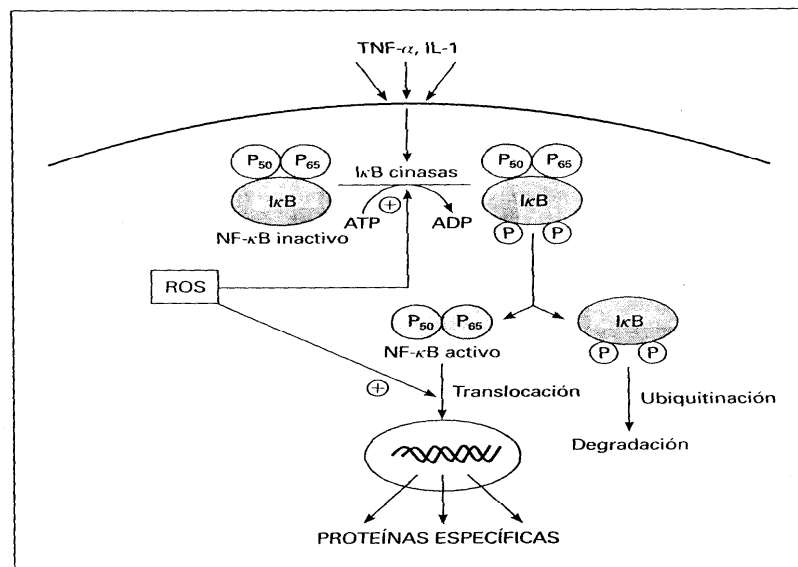
Las siglas NF- κ B aluden a su descubrimiento como factor nuclear responsable de la formación de las cadenas kappa de las inmunoglobulinas en los linfocitos B. En su forma más usual, se trata de un heterodímero constituido por dos subunidades proteicas, p50 y p65. Mientras el heterodímero está unido a la proteína I κ B, el complejo es inactivo. Sin embargo, la fosforilación de la proteína I κ B por las proteínaquinas correspondientes (I κ B cinasas) lleva a su separación del heterodímero NF- κ B. Éste puede entonces experimentar translocación al núcleo, donde se une a secuencias específicas del ADN y estimula la síntesis de una gran cantidad de proteínas relacionadas con la reacción inflamatoria, la respuesta inmunitaria, la síntesis de óxido nítrico, las interacciones celulares, la apoptosis, la proliferación, etc.

Por su parte, la fracción I κ B fosforilada se somete al proceso de ubiquitinación y proteólisis inespecífico en el proteosoma (Perkins, 2000). Los

activadores principales del factor NF- κ B son las citocinas TNF- α e IL-1, que se producen fundamentalmente por las células fagocíticas en el proceso inflamatorio. Curiosamente, estas citocinas también se forman como consecuencia de la activación del NF- κ B en un claro fenómeno de autoestimulación defensiva.

Los radicales libres parecen actuar en varios puntos de este sistema, fundamentalmente favoreciendo la actuación de las I κ B cinasas y la translocación de NF- κ B al núcleo (Flohe *et al.*, 1997; Ginn-Pease y Whisler, 1998).

El cuadro es mucho más complejo, porque además del mecanismo descrito, el NF- κ B puede activarse por otras vías que incluyen, por ejemplo, la fosforilación por MAP quinasas y PKC, sobre las cuales podrían actuar también los radicales libres (Janssen-Heininger *et al.*, 2000).



Activación del factor nuclear de transcripción NF- κ B. TNF: factor de necrosis tumoral; IL-1: interleucina 1; I κ B: proteína inhibidora del NF- κ B; ROS: especies reactivas de oxígeno.

Fig. 2.4.1.2- - Factor nuclear de activación NF- κ B: activación

Otro aspecto interesante de esta regulación es la implicación del óxido nítrico en la activación del NF- κ B. Cuando se produce en pequeñas cantidades, el óxido

nítrico activa las IKB quinasas, con el consiguiente estímulo del NF-kB. Esta acción puede interpretarse como una «protección inflamatoria» de base.

En cambio, como consecuencia de la inducción de la óxido nítrico sintasa por el NF-kB, se produciría una gran cantidad de óxido nítrico. En este caso, este compuesto originaría una inhibición del NF-kB por nitrosilación de dos cisteínas. Estaríamos ante una inhibición *feedback* en un modelo claro de defensa frente a una reacción inflamatoria prolongada (Janssen-Heininger *et al.*, 2000). Las relaciones entre los radicales libres, el óxido nítrico y sus derivados (especies reactivas de nitrógeno: RNS) son muy complejas. De hecho, el óxido nítrico puede reaccionar con el radical superóxido y originar peroxinitrito. Aunque este último compuesto puede ser también muy citotóxico (Wolin, 2000), con esta reacción se impediría la formación de peróxido de hidrógeno, que es el responsable directo de la activación del NF-kB. Esto contribuiría a explicar el carácter antiinflamatorio y antiaterogénico del óxido nítrico (De Caterina, 2000; Patel *et al.*, 2000).

Vale la pena resaltar, por último, el papel que parece desempeñar también la hiperglucemia mantenida en la activación del NF-kB por los radicales libres (Nishikawa *et al.*, 2000). Este efecto, y el ya reseñado anteriormente sobre la proteínaquinasa C, podría contribuir a explicar las alteraciones vasculares en la diabetes tipo I (Schmidt y Stern, 2000).

2.4.2.- CITOTOXIDAD DE LOS RADICALES LIBRES SOBRE PROTEÍNAS, LÍPIDOS, HIDRATOS DE CARBONO Y ÁCIDOS NUCLEICOS

La mayor parte de los componentes celulares pueden ser dañados por los radicales libres, pero las proteínas, los ácidos grasos insaturados, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono resultan ser los blancos fundamentales de las reacciones de estas especies. Cuando los radicales libres de oxígeno reaccionan con esas moléculas

las estructuras de las mismas se alteran y, como consecuencia de ello, también el correcto funcionamiento de las células. A continuación se describen los daños producidos por los radicales libres sobre las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono.

2.5.- REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

2.5.1.- Proteínas

Los radicales libres de oxígeno están implicados de forma muy importante en la oxidación que conduce a modificaciones estructurales de las proteínas, que pueden llegar a la degradación de las mismas. Entre las modificaciones posibles se incluyen las modificaciones oxidativas de los aminoácidos y la formación de carbonilos, que puede ser utilizado como un marcador temprano de dicha oxidación de proteínas.

Reznick y Packer, (1994) describieron un método espectrofotométrico adecuado para la determinación de los grupos carbonilo como marcadores de la oxidación de las proteínas. Por otra parte, **Levine et al.,(1994)**, propusieron un método más preciso que el anterior basado en la técnica de HPLC con el objetivo de determinar las diversas especies químicas que aparecen en una reacción de oxidación por radicales libres en proteínas.

Evans et al.,(1999) utilizaron un método para determinar los grupos carbonilo producidos por las reacciones de los radicales libres de oxígeno con las proteínas, estos grupos carbonilo pueden reaccionar con el reactivo DNPH (dinitrofenilhidrazina) generando compuestos dinitrofenilhidrazonas como productos de la reacción, que son coloreados, por lo tanto puede utilizarse esta reacción para estimar el contenido de los grupos carbonilos, proteínas en tejidos humanos y en fluidos corporales. Estos autores han utilizado esta técnica para medir la

concentración de grupos carbonilo en tejido celular humano; dicha técnica se utilizó para investigar los grupos carbonilo ligados a proteínas en muestras de cerebro obtenido en análisis post-mortem de pacientes que sufrieron distintos tipos de alteraciones, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular progresiva. Se tomaron también controles de personas normales y también de personas enfermas que habían sufrido otros desórdenes neurovegetativos diferentes de los que afectaron al cortex; estas enfermedades están relacionadas con mutaciones en la enzima SOD que pueden dar lugar a un incremento importante en el estrés oxidativo, afectando a las proteínas en el córtex cerebral.

Las modificaciones oxidativas proteicas pueden ser primarias o secundarias. Las modificaciones primarias suceden en la oxidación catalizada por metales, la oxidación inducida por la radiación y la oxidación por ozono u óxidos de nitrógeno. El estado redox de los ligandos metálicos de muchas metaloproteínas puede ser modificado al reaccionar con estos radicales libres. Las modificaciones secundarias se producen cuando las proteínas son alteradas por moléculas generadas por oxidación de otras moléculas. Un ejemplo importante es la modificación covalente de las proteínas producida por el hidroxinonal, generado en la oxidación lipídica. Los grupos carbonilo pueden aparecer en las proteínas por cualquiera de estas reacciones, y la aparición de grupos carbonilo se acepta como una evidencia de la oxidación proteica. Por ejemplo la glicosilación de proteínas puede aumentar los grupos carbonilo en los residuos aminoácidos.

Así, la oxihemoglobina se convierte en metahemoglobina cuando reacciona con el $O_2^{\cdot -}$ o el peróxido de hidrógeno (Freeman y Grapo, 1982; Valenzuela y Videla, 1989). Otra hemoproteína citoplasmática, la catalasa, también es inhibida por los radicales superóxido, que la convierten en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Los radicales libres pueden reaccionar con aminoácidos que contengan grupos insaturados o azufre. De esta manera, las proteínas con elevada proporción de

fenilalanina, histidina, tirosina, triptófano, cisteína o metionina son más susceptibles al ataque de los radicales libres. En este sentido, se ha comprobado que enzimas tales como la gliceraldehídoeral-3-fosfato deshidrogenasa, la papaína o la superóxido dismutasa (SOD), cuya actividad depende de estos aminoácidos, se inhiben en presencia de ciertos radicales libres. Las reacciones de los radicales libres con todos estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Stadtman, 1992; Gebicki y Gebicki, 1993).

Los enlaces peptídicos pueden ser dañados por los radicales libres. Estos enlaces se rompen después de la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido (Woff *et al.*, 1986).

Por último, la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que amplifiquen el daño inicial. Por ejemplo, cuando el triptófano se oxida hasta H₂O₂ y N-formilquinurenina, este compuesto reacciona con algunos grupos amino y provoca entrecruzamientos entre proteínas lípidos o ambos (Freman y Grapo, 1982; Stadtman, 1992).

2.5.2.- Lípidos

Como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de los radicales libres de interés biológico suele corresponder a especies extremadamente reactivas e inestables, por lo que su período de vida media es muy corto, así como su radio de acción. No obstante, cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical, se puede formar un nuevo radical libre que podrá reaccionar, a su vez, con otro compuesto no radical y así sucesivamente.

De esta manera, es posible que se creen reacciones en cadena que darán lugar a efectos biológicos lejos del lugar donde se originó el primer radical. Un claro

ejemplo de este hecho lo constituye la peroxidación lipídica de la que se hablará a continuación.

Los radicales libres hidroxilo y perhidroxilo y el oxígeno singlete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens y Dix, 1991; Schaich, 1992; Choe *et al.*, 1995). Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena hidrocarbonada para originar un radical libre lipídico. Los ácidos grasos poliinsaturados son especialmente susceptibles al ataque de los radicales libres, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace metileno C-H. El radical libre lipídico, para estabilizarse, sufre un reajuste molecular que produce un dieno conjugado. El dieno conjugado reacciona con el oxígeno molecular y se forma un radical peróxido que puede dar lugar a endoperóxidos, o bien captar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente y formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido. Así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo.

Los hidroperóxidos lipídicos son compuestos estables, pero si entran en contacto con iones metálicos de transición, producen más radicales libres que pueden iniciar y propagar otras reacciones en cadena. De esta manera, se altera la estructura de las membranas y, por tanto, su función (Rice-Evans y Burton, 1993). Los productos finales de la peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y alterar la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis (Blake *et al.*, 1987; Pryor y Church, 1991).

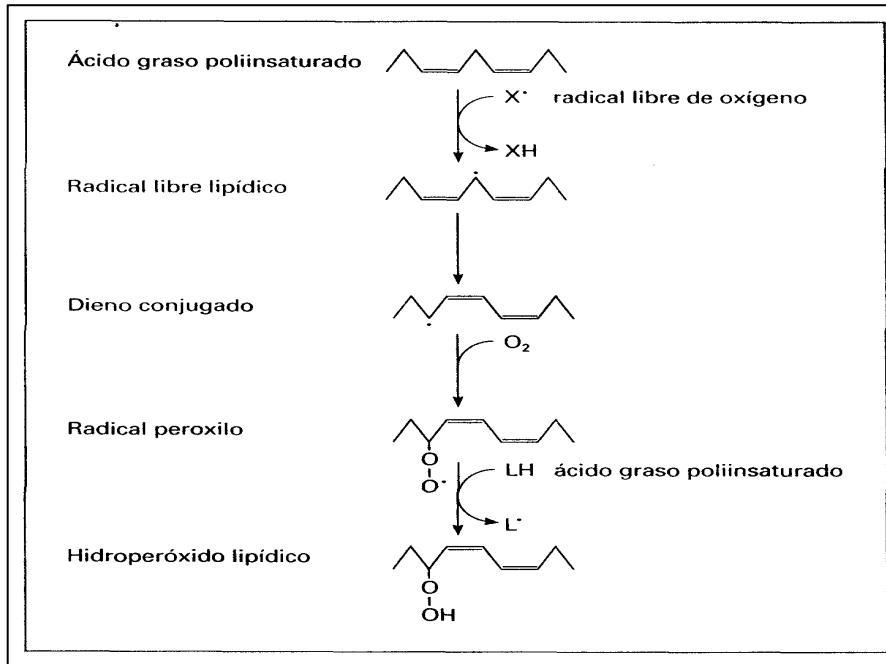


Figura 2.5.2.1.- Peroxidación lipídica

El malondialdehído (MDA), otro producto final de la peroxidación de los ácidos grasos, puede causar entrecruzamientos y polimerización entre los distintos componentes de las membranas, así como reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN (Valenzuela, 1991).

Los hidroperóxidos de los ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETE) y los isoprostanos son biológicamente activos. El HETE produce quimiotaxis en neutrófilos y facilita la captura de calcio y la movilización de la proteinaquinasa-C. El 12-HETE está relacionado con la secreción de adrenocorticotropina, los procesos de modulación mitogénéticos y la función de los linfocitos, mientras que el 15-HETE puede inhibir la migración de neutrófilos a través de la citoquina endotelial activada (Aruoma, 1998).

Los isoprostanos son una serie de prostaglandinas unidas a compuestos que se forman durante la peroxidación del ácido araquidónico, aunque probablemente se formen productos similares a partir de otros PUFA. Como consecuencia de la

similitud estructural con las prostaglandinas $F_{2\alpha}$, estas sustancias se conocen como F_2 -isoprostanos, los cuales se pueden medir en plasma (35 ± 6 pg/ml) y orina (1600 ± 600 pg/ mg creatinina) en sujetos sanos, lo que indica que son compuestos originados a partir de la peroxidación lipídica, incluso en sujetos sanos.

La mayoría de los isoprostanos plasmáticos están esterificados con fosfolípidos, pero algunos están “libres” (sin esterificar). Uno de los isoprostanos: 8-isoPGF $_{2\alpha}$, es un poderoso vasoconstrictor renal y disminuye el flujo sanguíneo renal y la filtración glomerular hasta casi la mitad de la ya de por sí bajas concentraciones (nM). Se ha sugerido que el aumento de la concentración de los F_2 -isoprostanos circulantes puede contribuir al síndrome de patología hepatorenal. La excreción urinaria de isoprostanos está incrementada en fumadores y pacientes con arterioesclerosis (Salonen *et al.*, 2003).

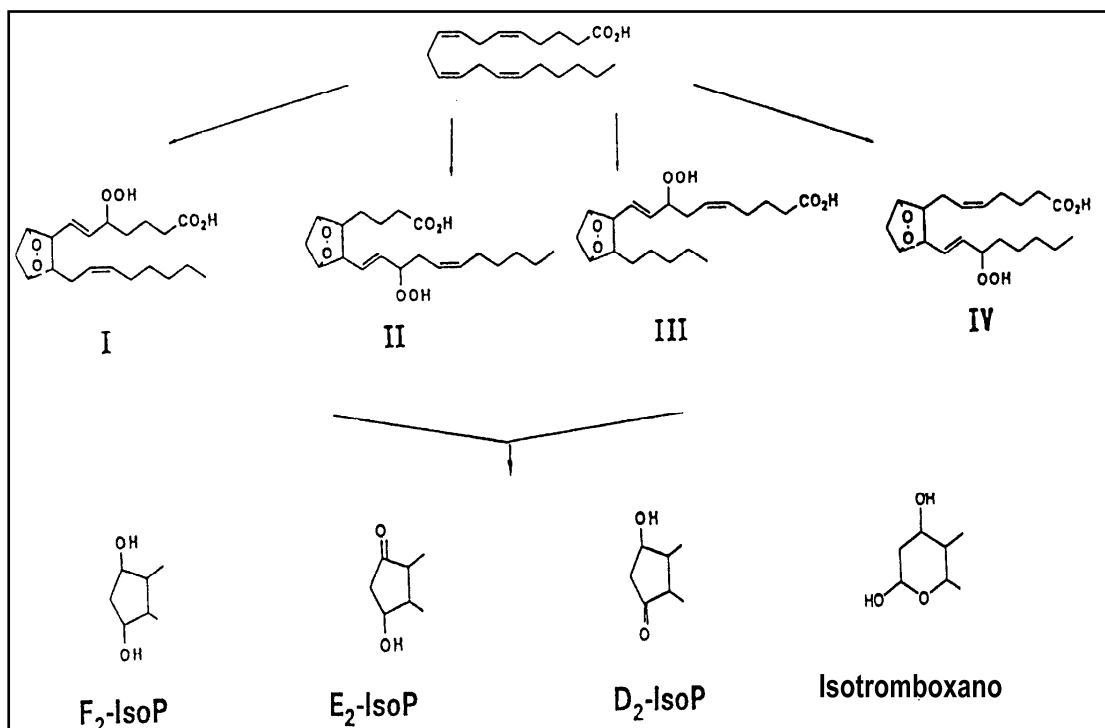


Fig. 2.5.2.2.- Esquema de la formación de isoprostanos

En general los isoprostanos y sus metabolitos se pueden cuantificar en orina, lo que constituye un ensayo válido de la peroxidación lipídica en el organismo si se puede descartar el efecto de la dieta. El mecanismo de formación de los isoprostanos se muestran en la figura 2.5.2.2. Los endoperóxidos pueden sufrir la reducción para producir F₂-isoprostanos o recolocaciones para formar E₂-isoprostanos, D₂-isoprostanos y/o isotromboxanos (Aruoma, 1998).

2.5.3.- Ácidos nucleicos

Gran parte de la citotoxicidad de las ERO es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y azúcares del ADN al reaccionar con esas especies (Demple y Linn, 1982; Harman, 1992; Higuchi y Linn, 1995).

Las ERO, reaccionan con el ADN tanto a nivel del esqueleto azúcar-fosfato, como de las bases. El ataque sobre las bases tales como timina y adenina producen el daño de la base. Esas modificaciones químicas provocan reacciones de entrecruzamiento y, en muchos casos, la ruptura de las hebras del ADN. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, entonces se produce una mutación, o produce la muerte celular (Cerutti, 1985; Davies *et al.*, 1982). Puesto que el ADN mitocondrial no tiene histonas unidas, es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Aunque se ha documentado el daño al ADN por ERO, no está claro cuál o cuáles de los oxidantes causan el daño. Ni el O₂^{•-} ni el H₂O₂, bajo condiciones fisiológicas, parecen causar roturas de cadenas del ADN o modificaciones de las bases (Lesko, *et al.*, 1980; Aruoma *et al.*, 1989). Se ha propuesto que la toxicidad in vivo del O₂^{•-} y del H₂O₂ se produce por su conversión, dependiente de una reacción no enzimática catalizada por hierro, a una especie radical altamente reactiva, el radical OH[•] (Dizdaroglu, 1991; Halliwell y Gutteridge, 1988). Como fuente exógena

la radiación ionizante, por interacción con el medio celular y tejidos, también puede inducir la formación de OH[·], ya que se ha observado que produce un espectro de daño al ADN similar al provocado por otros oxidantes.

Alrededor de un 90% de los daños producidos en el ADN por el H₂O₂, son bases alteradas; asimismo puede causar roturas de simple y doble cadena. El H₂O₂ también induce el intercambio de cromátides hermanas, presumiblemente como consecuencia directa del daño oxidativo al ADN. Las células contienen enzimas que pueden reponer las bases del ADN dañadas por oxidación tales como glicosilasas. La existencia de estas enzimas, en una amplia diversidad de organismos, sugiere que el daño oxidativo es un problema importante (Bernstein, 1991).

Las enzimas celulares superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa limitan, en parte, el daño producido por las especies reactivas del oxígeno. Las membranas celulares no son aparentemente obstáculo para los agentes oxidantes, ya que la liberación de radicales libres de oxígeno formados en leucocitos pueden inducir roturas de cadenas del ADN de células vecinas (Bernstein, 1991).

En células humanas, se producen un gran número de daños oxidativos al ADN por célula y día, debido al metabolismo celular oxidativo. Así, residuos tales como timina glicol (Tg), 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), 8-oxoguanina (8-oxoGua), timidinaglicol (dTg) y 5-hidroximetiluracilo (5-OhmU) son hidrosolubles y, por lo tanto, excretados en la orina de humanos como resultado de su sustitución durante la reparación del ADN dañado por oxidación (Bernstein y Bernstein, 1991 ; Fraga *et al.*, 1991). De ellos la 8-oxodG y los derivados de la Timina son los más estudiados; los valores de concentración y excreción de bases y nucleósidos oxidados obtenidos en diferentes laboratorios están dentro del mismo rango.

Los niveles de 8-oxodG en orina probablemente no están afectados por la dieta, ya que los nucleósidos no se absorben en el estómago. Aún no se ha tratado la

cuestión de si la 8-oxodG se metaboliza hasta otros productos en humanos. También es posible que alguna o toda la 8-oxodG excretada por orina no proceda del DNA, pero sí de la desoxiGTP (dGTP) en el pool precursor de los nucleótidos del DNA.

Rango de Valores publicados de biomarcadores urinarios del daño oxidativo de DNA en humanos

Lesión	Ensayo	Rango de Valores	Nº Total de sujetos	Nº Total de publicaciones
dTg	HPLC	390-435 pmol/kg 24 h	19	2
Tg	HPLC	100-174 pmol/kg 24 h	19	2
dTg	GC/MS	110-250 pmol/kg 24 h	3	2
5-OhmU	GC/MS	74 ± 9 nmol/24 h	14	1 ^b
8-oxodG	HPLC	170-600 pmol/kg 24 h	^a 60	6
		1.0-3.0 nmol/nmol creatinina	206	8
8-oxodG	GC/MS	110-345 pmol/kg 24 h	26	3
8-oxodG	ELISA	1600-4800 pmol/kg 24 h	4	1
		7.7 ± 3.4 nmol/nmol creatinina	52	1 ^c
8-oxodGua	HPLC	1.5-5.0 nmol/nmol creatinina	13	1

^a Datos tomados de Loft y Poulsen, (1996)

^b Datos tomados de Faure *et al.*, (1996)

^c Datos tomados de Erhola *et al.*, (1997)

Tabla 2.5.3.1.- Valores del daño oxidativo del DNA en orina de humanos. (Loft y Poulsen, 1999).

Para interpretar el uso de nucleobases oxidadas y desoxinucleósidos como biomarcadores del daño oxidativo en el DNA, y las vías de reparación de las modificaciones en el DNA (en concreto la 8-oxoGua), se aislaron partir de extractos nucleares de células humanas, dos enzimas diferentes reparadoras de DNA: una con actividad glicosilasa y otra que unicamente escinde 8-oxodG como nucleótido (Loft, 1999). Se mostró que la enzima que escinde 8-oxodG como nucleótido contribuye a la reparación de la 8-oxodG en DNA. Además la 8-oxoGTP fosfatasa y 8-oxodGMP nucleotidasa rápida y selectivamente transformaron los nucleótidos oxidados

liberados en nucleósidos listos para su excreción. Estas enzimas también permiten la eliminación de dGTP oxidado a partir del pool celular y a continuación su eliminación como 8-oxodG.

Además el metabolismo del DNA dañado a partir de células reparadas y el turnover mitocondrial liberan también 8-oxodG. Datos aún no publicados a partir de estudios en ratas indican que la inducción de 8-oxodG en el DNA nuclear en órganos diana se corresponde con el aumento en la excreción urinaria tras la administración del carcinógeno 2-nitropropano, lo que avala la idea de que la 8-oxodG es *in vivo* el producto primario obtenido tras sufrir modificaciones el DNA (Loft, 1999).

Experiencias con animales muestran que la 8-oxodG inyectada se excreta inalterada en orina, mientras que la 8-oxodG de la dieta o la oxidación de la dG durante la excreción no contribuye a la reparación del DNA.

En humanos la cantidad excretada de 8-oxodG y 8-oxoGua se encuentran dentro del mismo rango y ambas tienen valores superiores en fumadores (como ejemplo de población con estrés oxidativo). Consecuentemente la excreción urinaria de la 8-oxodG refleja por término medio, el riesgo promutagénico de un producto oxidativo en el DNA de todos los órganos y tejidos. Posiblemente la 8-oxoGua excretada por orina permita conocer la importancia total de la reparación de la 8-oxodG en el DNA.

Para usar los productos de reparación excretados por orina como biomarcadores del daño oxidativo al DNA se asume una minuciosa y amplia reparación en el DNA (Loft, 1999). Así tras una radiación ionizante en humanos, el incremento de timina – glicol y 8-oxodG excretados por orina se produce en 24 horas.

En un estudio del cerebro humano se describe un promedio de dos lesiones en DNA nuclear por célula y día. En humanos se han determinado los valores de

excreción urinaria de 8-oxodG y 8-oxoGua en el rango 15-50 nmol/24 horas. La suma de los productos de reparación de DNA está en 300-1000 lesiones/día en cada célula. Asumiendo la existencia de 5×10^5 células en el organismo, la eficiencia reparadora calculada se sitúa en el 99,4 - 99,8 %.

Como consecuencia de esta amplia y rápida reparación, la excreción urinaria de los productos de reparación reflejará el índice de daño oxidativo en todas las células del organismo. Por el contrario, los niveles de bases oxidadas en el DNA de linfocitos reflejarían los niveles en equilibrio entre daño y reparación, aunque sólo en un tejido distinto de los tejidos diana. En consecuencia los dos grupos de marcadores resultan complementarios (Loft, 1999).

2.5.4.- Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son dañados en menor proporción que otras moléculas por los radicales libres. Monosacáridos tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas como es el peróxido de hidrógeno, que contribuye a los niveles intracelulares con una concentración 10^{-8} M (Sies, 1985; Blake *et al.*, 1987; Lunec, 1990).

Los oxoaldehídos que se producen a partir de la autooxidación de los monosacáridos están implicados en la patogénesis de cáncer, diabetes y enfermedades crónicas asociadas al tabaco. Se ha postulado que la oxidación de los monosacáridos puede mediar en la formación de enlaces cruzados con las proteínas, causando agregación proteica y disminución en la fluidez de la membrana, lo que provoca cataratas en diabéticos y microangiopatía (Von Sontag, 1980). En pacientes con diabetes mellitus se han encontrado complejos IgG fluorescentes y complejos de albúmina fluorescentes. La fluorescencia se genera por radicales oxígeno, pero es mediada por el enlace covalente de la glucosa a estas proteínas. Es conocido que los monosacáridos simples se oxidan bajo condiciones fisiológicas generando O_2^- . En

las proteínas con aminoácidos aromáticos, la formación de $O_2^{\cdot -}$ puede aumentar la oxidación y la formación de enlaces cruzados entre estas proteínas. Este tipo de proteínas fluorescentes son las implicadas en el desarrollo de microangiopatía en diabetes mellitus.

Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, fragmentándose para dar unidades más sencillas. **Greenwald y Moy (1980)** demostraron que el ácido hialurónico (es un glucosaminoglicano, que consiste en repetidas unidades de ácido glucurónico y N- acetilglucosamina) se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, lo que provoca la disminución del liquido sinovial de las articulaciones. Este efecto es potenciado por las ERO generadas por neutrófilos *in vitro* (**Mc Cord, 1980**).

2.6.- RADICALES LIBRES Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Los radicales libres se ven implicados en multitud de procesos patológicos. Los radicales libres pueden predisponer al ser humano a enfermedades causadas por otros factores y ser antagonistas de los procesos curativos.

2.6.1.-Envejecimiento

Un campo de investigación sugiere que los daños de los radicales libres a las células conducen a cambios patológicos asociados al envejecimiento (**Bechman et al., 1998**). Hay evidencia extensa para implicar a los radicales libres en el desarrollo de un gran número de enfermedades degenerativas (**Cross,1987**).

El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la mayoría de las causas de las discapacidades de las personas mayores, incluyendo el debilitamiento cognoscitivo y la enfermedad de Alzheimer, la disminución de la actividad del sistema inmunitario, cataratas y degeneración macular relacionada con la edad. Así

mismo, a la luz de los resultados revisados (Tolonen *et al.*, 1985; Tolonen *et al.*, 1988; Clausen *et al.*, 1989), se pone de manifiesto que estos fenómenos adversos pueden ser paliados con la ingesta de diversos agentes antioxidantes.

2.6.2.-Procesos oncológicos

Los radicales libres intervienen en las etapas de iniciación y promoción de un tumor. El incremento de cáncer en edades avanzadas puede ser debido, al menos en parte, al incremento en el nivel de reacciones de los radicales libres con la edad, al mismo tiempo que disminuye la eficacia del sistema inmune para eliminar las células alteradas (Harman, 1992).

2.6.3.-Patologías cardíacas

En la actualidad, se están realizando algunos estudios prospectivos para determinar el efecto protector de los antioxidantes en la enfermedad coronaria y en neoplasias ya que existen evidencias que en la aparición de enfermedades cardiovasculares están implicados mecanismos oxidativos mediados por radicales libres. Con respecto a la aterosclerosis coronaria, existe la *teoría de la oxidación*. La elevación de LDL (lipoproteínas de baja densidad) es un factor de riesgo coronario bien establecido, así como el aumento del índice LDL/HDL (lipoproteínas de baja/alta densidad) es un buen detector de enfermedad coronaria. Las LDL en su forma nativa no son propiamente las culpables, sino que tienen que ser oxidadas para ser aterogénicas.

El primer paso en la oxidación de LDL es la peroxidación, produciendo hidroperóxidos de fosfolípidos y otros hidroperóxidos lipídicos. Estos se desdoblan para formar malonildialdehído y otros compuestos reactivos, los cuales pueden modificar la afinidad de la apolipoproteína B por las LDL. Esto da lugar a que la forma oxidada de LDL sea reconocida por los receptores de los macrófagos, que fijan las LDL oxidadas de forma descontrolada. Esto es debido a que, a diferencia de

las apolipoproteínas B y E, no existe una autoregulación respecto al contenido de LDL-colesterol. De esta manera los macrófagos acumulan grandes cantidades de lípidos en forma de LDL oxidada que eventualmente son convertidos en células espumosas, parte fundamental en la lesión aterosclerosa (Codina *et al.*, 1999).

Otras modificaciones inducidas por las LDL oxidadas son la estimulación de la adhesión de los monocitos al endotelio vascular y la inhibición de la vasodilatación y citotoxicidad.

2.6.4.- Enfermedades de la piel

La superficie de la piel es especialmente vulnerable al daño producido por los radicales libres generados por una gran variedad de procesos fisiológicos y biológicos (Schallreuter *et al.*, 1989). Se piensa que los radicales libres tienen un importante papel en el envejecimiento de la piel y en el desarrollo de desórdenes semejantes al cáncer de piel, también se ha demostrado que los radicales libres tienen un papel importante en los daños causados por las radiaciones ionizantes y ultravioletas a las células epidérmicas (Fuchs *et al.*, 1989).

Los estudios han mostrado que la exposición a la luz UV debilitan los sistemas antioxidantes de la piel (Potokar *et al.*, 1990), produciendo una disminución de la concentración de vitamina E después de la exposición a radiación UV debido a un incremento del estrés oxidativo (Trevithick *et al.*, 1992).

2.6.5.- Patologías del hígado

La relación entre la sobrecarga de hierro y la actuación conjunta de los radicales libres influye significativamente en el hígado. El hierro contiene electrones desapareados y puede ser considerado como un radical (Halliwell *et al.*, 1999). La oxidación de Fe^{2+} da lugar, a través de la pérdida de un electrón captado por el oxígeno, a la formación de $O_2^{\cdot-}$. La generación de $O_2^{\cdot-}$ da origen a H_2O_2 , que puede

reaccionar con Fe^{2+} y producir OH^{\bullet} , de esta forma el hierro resulta un catalizador adecuado de la producción de intermediarios de la reducción parcial del oxígeno de alta reactividad.

Entre las reacciones químicas-hierro dependientes aquellas relacionadas con la peroxidación de lípidos han sido ampliamente estudiadas (Halliwell *et al.*, 1999). Como especies responsables de la iniciación de las reacciones en cadena se han propuesto tanto al OH^{\bullet} (Halliwell *et al.*, 1999) como a hierro-oxo-especies (Fontecave *et al.*, 1993), tales como el ión perferrilo ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2\text{-Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$), el ión ferrilo (FeO_2^+) o el complejo $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2\text{-Fe}^{3+}$. En la etapa de propagación el hierro interviene incrementando la velocidad de oxidación de lípidos a través de la conversión de los hidroperóxidos lipídicos (ROOH) en radicales alcoxilos (RO^{\bullet}) o peroxilos (ROO^{\bullet}) (Gutteridge, 1987).

Las consecuencias fundamentales de la peroxidación de lípidos son:

- a) Distorsión y/o ruptura de membrana, lo que altera la permeabilidad de la misma y produce cambios en la actividad de las enzimas dependientes de lípidos
- b) La toxicidad de los peróxidos lipídicos y sus productos de ruptura (Bacon *et al.*, 1990). Se ha observado que la peroxidación precede o acompaña el daño celular en muchas patologías (Halliwell *et al.*, 1994) y el daño a los fosfolípidos de las membranas de las organelas sería el mecanismo unificador subyacente en muchas de las teorías propuestas a fin de explicar los efectos descritos en tejidos sometidos a sobrecarga de hierro (Bacon *et al.*, 1990).

Resultan particularmente susceptibles a la sobrecarga de hierro los individuos que padecen Hemocromatosis idiopática primaria (HH). Se trata de una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, donde se encuentra disminuida la capacidad de controlar la absorción de hierro debido a un defecto en la expresión de la proteína que regula su incorporación en las células de la mucosa intestinal

(Weinberg, 1990). Dado que en casos de HH la patología asociada más frecuente es el carcinoma primario de hígado (frecuencia=24%) no se descarta que el hierro en exceso actúe dañando bases del ADN (Searle *et al.*, 1986).

El hígado, por ser un importante órgano de almacenamiento de hierro, es especialmente afectado por su exceso, sin embargo, en personas que no poseen el gen de la HH, se ha observado una mayor frecuencia de cáncer correlacionada con valores incrementados de hierro (Weinberg, 1990; Stevens *et al.*, 1994; Knekt *et al.*, 1994).

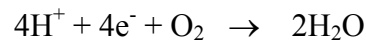
La inducción de hipertiroidismo experimental en la rata por la administración de dosis diarias de T₃ (0,1 mg/Kg de peso), produce incrementos en la actividad de enzimas hepáticas involucradas en procesos de oxidorreducción. A nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal, aumenta la generación de radicales libres, como el radical superóxido (O₂⁻) y/o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y a nivel citoplasmático aumenta la generación de especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERNS), como el óxido nítrico (NO[·]) y el peroxinitrito (ONOO⁻) (Fernández *et al.*, 1985; Fernández *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1997).

Además del incremento en la generación de radicales libres y de ERNS, se produce una importante disminución de la actividad de algunos sistemas de defensa antioxidante, como la SOD, la catalasa y los contenidos totales de equivalentes de GSH (Fernández *et al.*, 1988; Fernández *et al.*, 1991), de α -tocoferol, de licopeno y de β -caroteno (Simon *et al.*, 1998). Este aumento en el nivel de moléculas prooxidantes junto a la disminución de la actividad antioxidante, condicionan un estrés oxidativo hepático que conduce a daño celular, mediante un incremento en la respuesta lipoperoxidativa (Fernández, 1992).

2.7.- RADICALES LIBRES Y ACTIVIDAD FÍSICA

Existen diversas fuentes de producción de radicales libres durante el ejercicio (Packer, 1999):

1. Por un **escape de electrones**, probablemente a nivel de la ubiquinona – citocromo b, **en la cadena mitocondrial de transporte de electrones** con producción de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Sjodin, 1990). En esencia, lo que sucede en el sistema de transporte de electrones es que los iones hidrógeno y los electrones son transportados hasta el oxígeno por transportadores de electrones en una serie de reacciones enzimáticas, siendo agua el producto final.



Como los electrones son transportados en la cadena respiratoria, se libera energía y se resintetiza ATP en reacciones acopladas. Por cada par de electrones ($2e^-$) transportados en la cadena, se libera suficiente energía como para resintetizar un promedio de 3 moles de ATP. En total, 12 pares de electrones se eliminan a partir de la degradación de 180 g de glucógeno y por consiguiente se generan 36 moles de ATP. Por lo tanto, durante el metabolismo aeróbico, la mayor parte de un total de 39 moles de ATP son resintetizados en el sistema de transporte de electrones al mismo tiempo que se forma agua.

Considerando que durante el ejercicio el consumo total de O_2 aumenta entre 10 y 20 veces y que a nivel del músculo el flujo es aún 10 veces mayor (Child *et al.*, 1998), es razonable suponer que la producción mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$, se halla igualmente incrementada. Reacciones subsecuentes entre superóxidos originan otras especies reactivas de oxígeno, el peróxido de hidrógeno y en última instancia el radical hidroxilo (Jaeschke, 1995 ; Ji, 1995).

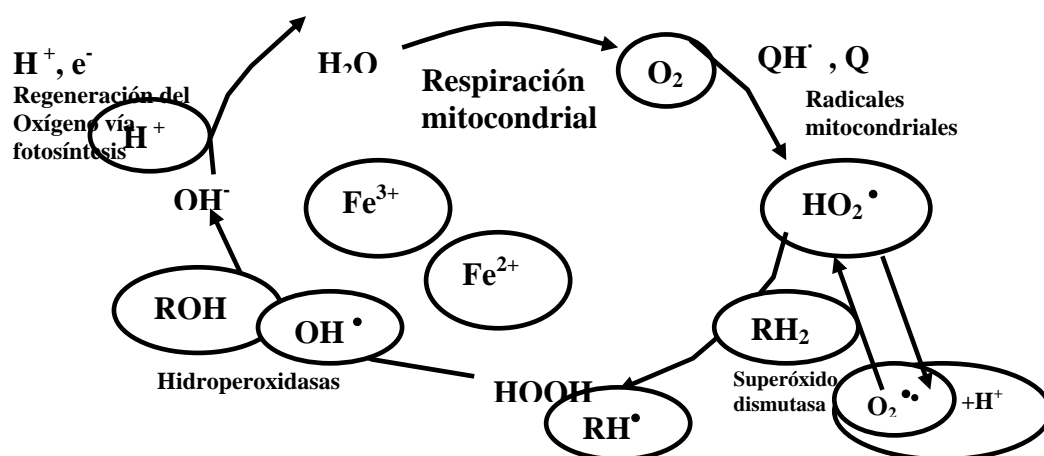


Figura 2.7.1.-_Ciclo del oxígeno_ Una porción de oxígeno (O_2), utilizada durante la respiración mitocondrial, es convertida a superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que la dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, a su vez, conduce a la formación de radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y a la peroxidación lipídica. Las hidroperoxidasas catalizan la ruptura de los hidroperóxidos, dando agua como producto final que, a su vez, es fuente de O_2 durante la fotosíntesis, completando el ciclo. R= molécula orgánica, Q= quinona.

La contracción muscular está directamente relacionada con la generación de dichas especies (Reid *et al.*, 1994; O'Neil, 1996) y la fatiga muscular que se produce durante el ejercicio (Bruto, 1996).

Es posible que la reducción prolongada de fuerza muscular pueda estar asociada, al daño que sufre el músculo tras el ejercicio por la acción del radical superóxido. En el postejercicio, se inicia una respuesta inflamatoria en la etapa inicial del proceso de reparación con la generación de especies reactivas de oxígeno originados por los neutrófilos en la explosión respiratoria (Mc.Cord, 1980; Pyne, 1994). Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa contra la invasión de sustancias extrañas a los tejidos. Las especies reactivas de oxígeno producidas durante el ejercicio pueden jugar un papel en la infiltración de neutrófilos al músculo promoviendo un aumento de la permeabilidad vascular.

La interacción con el endotelio vascular se produce a través de receptores de membrana que determinan su adherencia y migración. Estos receptores son: la molécula de adhesión interleucocitaria y la molécula de adhesión del leucocito al endotelio. Se ha demostrado que la hipertermia incrementa la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales con el daño celular subsecuente. En general, el ejercicio de intensidad moderada tiende a aumentar la explosión respiratoria mientras que el ejercicio más intenso tiende a suprimirlo (Neiman, 1997). La infiltración de neutrófilos tiene el potencial de destruir componentes del músculo como los fosfolípidos de las membranas y las proteínas estructurales y funcionales. Si su generación no es regulada, las ERO teóricamente pueden convertirse en propagadores del daño muscular en el postejercicio y la respuesta inflamatoria y que la respuesta inflamatoria en el músculo postejercicio contribuya al daño de la fibra muscular.

Uno de los más recientes descubrimientos es la liberación del factor de activación de los neutrófilos que es inducido en los monocitos/macrófagos por el lipopolisacárido de las bacterias gram negativas.

La activación de los leucocitos polimorfonucleares tiene un efecto potencialmente tóxico relacionado con la liberación de proteinasas, radicales de oxígeno y eicosanoides.

Los radicales libres superóxido no solamente se producen por los leucocitos polimorfonucleares, sino también por la estimulación de la vía xantina-oxidasa que se encuentra en la superficie de las células endoteliales y se activa durante la isquemia-reperfusión, donde el oxígeno penetra con rapidez a las células y produce una oxidación a purinas generando urato y radicales superóxido que son metabolitos de alta toxicidad (Schiller, 1991; Boros, 1993).

En relación al daño histórico, los radicales superóxido pueden estimular la acumulación, adherencia y activación de los neutrófilos, aumentando la actividad de

los leucocitos polimorfonucleares en los diferentes órganos, donde junto con las proteasas contribuyen al daño de los tejidos.

Otra vía de generación endógena de los radicales superóxidos es a través de la peroxidación lipídica del ácido araquidónico, el cual activa las vías de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa (Anderson , 1990).

Es importante considerar que no todos los efectos biológicos de los radicales libres de oxígeno son negativos, tienen efectos beneficiosos como mencionamos anteriormente (Smith , 1992).

Cuando se produce un shock séptico se genera óxido nítrico, metabolito derivado de la L-arginina que tiene un efecto vasodilatador y se produce por las células endoteliales, macrófagos activados, algunas células nerviosas, hepatocitos estimulados por las citoquinas y por los leucocitos polimorfonucleares.

Dentro de las versátiles funciones del óxido nítrico se encuentran la inmunosupresión, la neurotoxicidad y la alteración en la transmisión sensorial. Estudios en humanos revelan niveles elevados del óxido nítrico y sus metabolitos, lo que sugiere su excesiva producción durante la sepsis (Evans *et al.*, 1994).

2. En la **isquemia – reperusión**. Durante el ejercicio, el flujo sanguíneo es restringido en numerosos órganos y tejidos (riñón, región esplácnica, etc.) para aumentar el aporte a los músculos activos y estas regiones ingresan en un estado de hipoxia, mayor cuanto más intenso es el ejercicio, y más aún si se supera la capacidad aeróbica máxima (VO_2 máx). Incluso el propio músculo activo entra en un estado de hipoxia por insuficiente aporte energético. Al finalizar la actividad intensa, todas las áreas afectadas son reoxigenadas, produciéndose la isquemia – reperusión con la conocida producción de radicales libres que la acompaña (Sjodin, 1990).

La isquemia – reperfusión puede ocurrir si se practican ejercicios intensos que exigen mucho esfuerzo, como el remo de competición, en el que se utiliza más oxígeno del que se puede tomar al poner a prueba la resistencia de los hombros, los brazos, la espalda y las piernas (Kanter, 1993).

3. Por **autooxidación de catecolaminas**, cuyos niveles suelen estar aumentados durante el esfuerzo.

4.- **La xantina oxidasa cataliza reacciones que son una de las principales fuentes de producción de ERO (Mc Cord, 1995)**. La xantina oxidasa participa en el catabolismo de las purinas produciendo una oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico. Esta enzima puede encontrarse en dos formas: reducida (XDH) que utiliza NAD^+ como aceptor de electrones, y oxidada (XO) que utiliza oxígeno molecular como aceptor de electrones.

La reducción univalente del oxígeno en la reacción catalizada por la xantina oxidasa produce la formación del radical superóxido. Aunque esta enzima existe principalmente en la forma reducida (XDH) cuando vira a la forma XO, participa en el daño muscular, ya que las condiciones fisiológicas del músculo durante un ejercicio agotador se asemejan a las de un tejido isquémico.

5.- La **peroxidación lipídica del ácido araquidónico** también genera radicales superóxido (Anderson, 1990).

6.- La **alteración de la homeostasis del calcio** que se produce en el músculo estresado como consecuencia del ejercicio físico extenuante, particularmente el ejercicio anaeróbico/excéntrico que conduce a la isquemia (con formación de hipoxantina) y genera una excesiva actividad contráctil y daño muscular (con activación de proteasas) (König y Berg, 2002)

7.- Como consecuencia de la reacción de **explosión respiratoria** debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares (PMF) tras el daño muscular inducido por el ejercicio.

2.8.- MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estado redox a nivel subcelular, de las células, los tejidos y los organismos es una realidad muy compleja que no se puede medir ni definir con un sólo parámetro aislado (Pryor, 2000). La falta de acuerdo entre todos los marcadores hace pensar en dos posibilidades: 1) alguno de los marcadores no se relaciona directamente con ciertos tipos de ejercicio físico, intensidad, duración,... y 2) el nivel de estrés oxidativo generado no es suficiente para producir un aumento en todos los marcadores.

Por ello, son varias las formas que se utilizan para cuantificar el estado redox a nivel celular, como la detección específica de los radicales libres, las medidas indirectas de estrés oxidativo a través de los productos de oxidación de las macromoléculas (productos de peroxidación lipídica, proteica y del DNA), la cuantificación de los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y la proporción entre glutatión reducido y oxidado.

La determinación de la capacidad antioxidante “in vitro” proporciona una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas “in vivo”, ya que la capacidad antioxidante de una mezcla no está sólo determinada por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino que también depende del microambiente y de la interacción de los compuestos entre sí, donde pueden producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Ghiselli *et al.*, 2000).

La liberación desde las células del tejido diana donde se origina el daño oxidativo al torrente sanguíneo de los productos originados por las ERO en el organismo, permite su determinación en sangre, plasma, aire exhalado, orina ... evitando así la biopsia del tejido, que obviamente supone otra dificultad añadida en las investigaciones. Se trata pues de **determinaciones indirectas** ya que el análisis no se realiza en los tejidos directamente dañados por las ERO.

La principal dificultad de los métodos directos de análisis de los radicales libres en sistemas biológicos se debe a su elevada reactividad (corta vida media, ej. OH^\cdot 10^{-10} seg.). Su determinación y caracterización se realiza mediante **Resonancia de Spin Electrónico (ESR)**, cuya aplicación a muestras biológicas tiene el inconveniente de la elevada absorción dieléctrica de energía que presentan las disoluciones acuosas. **Dimmey et al., (1980)** mediante esta técnica demostraron que las señales de ESR producidas por la exposición de proteínas irradiadas con oxígeno molecular son debidas a los radicales peróxido.

Las dificultades que plantea la determinación directa de las ERO en los sistemas biológicos justifican que la medida del grado de estrés oxidativo en estos sistemas se realice en el laboratorio mediante determinaciones indirectas, basadas en la valoración de:

- - Productos originados por la reacción de las ERO con DNA, lípidos y proteínas.
- - Los sistemas de defensa antioxidantes, tanto de forma individual: sistemas enzimáticos (actividades enzimáticas SOD, CAT, GPx) y no enzimáticos (relación glutatión oxidado/glutatión reducido, ácido úrico, bilirrubina, vitaminas antioxidantes, etc.) ; como en conjunto, que viene representado por el estado antioxidante total (TAS).
- - Enzimas directamente implicadas en el daño muscular como son la creatina quinasa (CK) y la lactato deshidrogenasa (LDH).

Determinación del daño oxidativo en DNA

Entre los productos de las bases oxidadas de DNA excretados en orina, la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG, es el producto más utilizado para medir el daño oxidativo del DNA) y la 8-oxoguanina (8-oxoGua) se determinan por HPLC con detector electroquímico (EC), y glicol-timidina (dTg) y glicol-timina (Tg) con detector UV (Loft et al., 1993; Loft et al., 1999); no obstante todos los productos de reparación de DNA se pueden medir mediante cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC/MS) (Teixeira et al., 1995). Para medir 8-oxodG en orina, el límite de detección es de 1,8 pmol, correspondiente a una concentración 35nM.

El mayor problema que plantean todas estas técnicas reside en los procedimientos previos para conseguir una separación de pequeñas cantidades de analito a partir de la orina, como extracciones en fase sólida y utilización de distintas columnas de HPLC. Estos procedimientos conllevan problemas en los índices de recuperación y requieren el uso de estándares internos.

También se ha desarrollado la técnica ELISA para la determinación de 8-oxodG en muestras de orina humanas, basada en la utilización de anticuerpos monoclonados, los valores así obtenidos son 3-5 veces mas altos que valores publicados por otros métodos (Erhola et al., 1997).

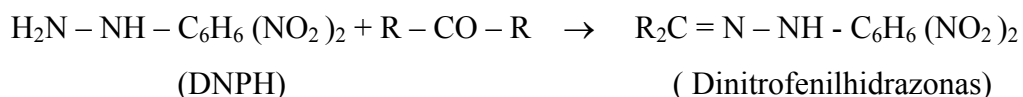
El producto de oxidación del RNA, 8-oxoguanosina (8-oxoG) también se ha usado como biomarcador en la orina y su excreción es 3-4 veces mayor que la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) (Loft et al., 1999).

Determinación del daño oxidativo en proteínas

El daño oxidativo a las proteínas tiene una química muy compleja (Dean *et al.*, 1997). Entre las especies más deletéreas se incluyen radicales de propagación como el alcoxilo. A partir de las proteínas agredidas se generan algunos productos como los hidroperóxidos proteicos que son relativamente estables y pueden generar nuevos radicales al reaccionar con metales de transición.

Los residuos de aminoácidos azufrados, así como los de lisina e histidina suelen ser muy susceptibles al daño oxidativo. En los primeros se generan disulfuros que pueden ocasionar el establecimiento de puentes covalentes cruzados entre proteínas o subunidades con formación de agregados. En los segundos se produce su oxidación a grupos aldehídos lo cual también puede ocurrir con residuos de aspártico, prolina y arginina, esto da lugar a un incremento de grupos carbonilo en las proteínas agredidas (Gracy, 1992). En los casos extremos llega a producirse incluso la fragmentación de las cadenas polipeptídicas (Grune *et al.*, 1997).

La determinación de los grupos carbonilo es generalmente el método más utilizado para cuantificar el daño oxidativo en proteínas de tejidos y fluidos corporales humanos. Se basa en la reacción de las ERO con residuos proteicos (histidina, arginina, lisina y prolina) originando grupos carbonilo, los cuales reaccionan con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para generar dinitrofenil hidrazonas (cromóforos), que se cuantifican espectrofotométricamente (Reznick *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1999).



La derivatización cuantitativa requiere que exista en el medio de reacción un exceso de reactivo, que puede ser eliminado de diferentes modos: mediante la extracción con etanol/etilacetato, cromatografía en fase reversa o mediante filtración

en gel por HPLC para la determinación espectrofotométrica de las hidrazonas (Evans *et al.*, 1999). El uso de pequeños volúmenes de muestra conteniendo pequeñas cantidades de proteína plantea problemas de reproducibilidad del método. Una modificación del método usando grandes volúmenes de reactivo hace a la técnica más reproducible para la determinación de niveles de referencia de grupos carbonilo en diversos sistemas y compararlos con los valores de grupos carbonilo obtenidos en diferentes condiciones experimentales (Reznick *et al.*, 1994).

Muchos laboratorios han desarrollado protocolos individuales para el ensayo de determinación de los grupos carbonilo, lo que explicaría las variaciones en los niveles de referencia de los grupos carbonilo. En cambio los valores de grupos carbonilo en plasma descritos por varios laboratorios son generalmente comparables (< 1 nmol / mg proteína) (Evans *et al.*, 1999).

También se han desarrollado métodos inmunoquímicos que utilizan anticuerpos anti-DNPH para identificar las proteínas oxidadas después de realizar su extracción y derivatización con DNPH (Keller *et al.*, 1993).

Determinación del daño oxidativo en lípidos

La determinación de productos de peroxidación refleja el balance entre la peroxidación lipídica y los peróxidos eliminados, y estos productos de peroxidación lipídica pueden ser detectados por varios métodos en tejidos humanos y fluidos corporales. Entre los biomarcadores capaces de medir la peroxidación lipídica en humanos se halla la determinación de los niveles circulantes de anticuerpos frente a las LDL oxidadas, análisis de isoprostanos, hidrocarburos gaseosos exhalados y el análisis de sustancias reactivas con el TBA (TBARS) por distintas técnicas: espectrofotometría, HPLC y GC. Esta última determinación está muy afectada por la dieta, lo que puede alterar los resultados de peroxidación lipídica.

El ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA) y los dienos conjugados, y las medidas directas de peróxidos plasmáticos por diferentes técnicas dan respuestas diferentes del grado de estrés oxidativo por razones que aún no han sido dilucidadas. En sujetos sanos los niveles de peróxidos plasmáticos tienden a ser $< 100\text{nM}$. Los peróxidos y los productos de peroxidación lipídica pueden, hasta cierto punto, ser absorbidos a través del intestino y los metabolitos de los aldehidos son reexcretados por orina (Halliwell, 1999).

Los gases etano y pentano exhalados en el aliento son productos de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 respectivamente. El aire espirado que contiene estos hidrocarburos puede ser recogido en un recipiente con gas inerte y medido, usando la cromatografía de gases y detectores de llama de hidrógeno. Sin embargo la estimación del pentano espirado tiene ciertos inconvenientes (Jenkins, 1988) responsables de que no se use esta técnica como ensayo único para estimar satisfactoriamente el grado de peroxidación lipídica en muestras biológicas. Dillard *et al.* (1978) observaron que el ejercicio físico en humanos ($75\% \text{VO}_2 \text{ max.}$) aumenta el nivel de pentano (un producto de la peroxidación lipídica) 1,8 veces en el aire espirado, comparado con sujetos en reposo, lo que ha sido confirmado en trabajos posteriores (Balke *et al.*, 1984).

El estrés oxidativo inducido por la actividad física se cuantifica mayoritariamente por determinación de los niveles de TBARS. Este método que no es específico para el MDA libre formado *in vivo*, es criticado por su baja selectividad respecto a la cuantificación del MDA ya que el MDA que reacciona en el ensayo TBARS se forma por descomposición de los peróxidos lipídicos y aminoácidos durante la fase de calentamiento ácido del ensayo. Además pigmentos biliares, tromboxanos, prostaglandinas, PUFA y ascorbato plasmáticos incrementan los valores de MDA (Dufaux, B. *et al.*, 1997; Halliwell, B. *et al.*, 1999; König, 2002). La dificultad que presenta la valoración de la peroxidación lipídica se debe a que la mayoría de los productos originados, incluyendo peróxidos lipídicos, dienos

conjugados y aldehídos, son químicamente inestables y desaparecen fácilmente durante el ensayo.

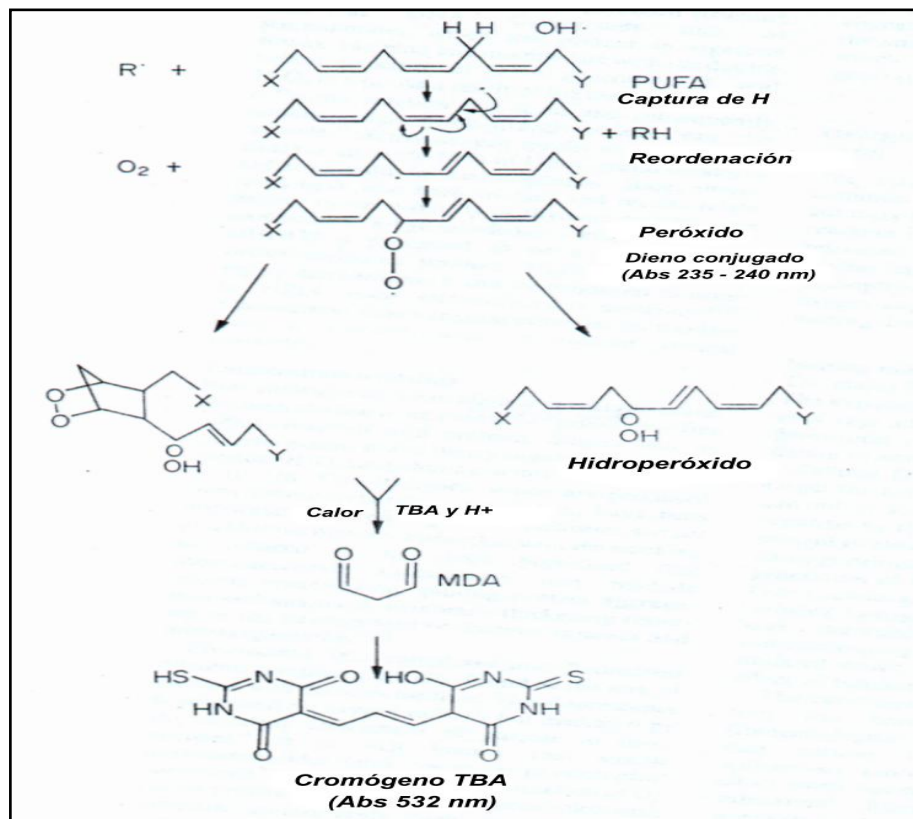


Fig. 2.8.3.1.- Esquema de la producción de dienos conjugados y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) durante la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) (Lunec, 1990).

Actualmente se considera que el biomarcador más específico de la peroxidación lipídica en humanos puede ser los F_2 -isoprostanos, que son productos específicos originados a partir de la peroxidación de residuos de ácido araquidónico (por ser un ácido graso componente de los fosfolípidos en la membrana celular). Aún son necesarios muchos ensayos de estandarización y calibración en los métodos de laboratorio, pero en la actualidad los isoprostanos plasmáticos se pueden medir con precisión y sensibilidad por técnicas de espectroscopía de masas. El aumento en los niveles de isoprostanos se asocia con el estrés oxidativo, mientras que la disminución

de los mismos se produce con la administración de antioxidantes como la vitamina E. Los isoprostanos se transforman rápidamente y son metabolizados y excretados, por lo que la detección de sus productos en orina puede, por lo tanto, ser un biomarcador útil de la peroxidación lipídica.

Con el análisis de isoprostanos también se plantea el problema (aún sin resolver) de la posible influencia de la dieta en humanos. Estudios recientes (Gopaul *et al.*, en prensa) sugieren que aunque algunas comidas contienen isoprostanos, las cantidades presentes son insuficientes para alterar los niveles plasmáticos, incluso en el improbable caso de que fueran absorbidos el 100%.

Existen otros isoprostanos originados a partir de la peroxidación de residuos de ácido eicosapentanoico (F₃-isoprostanos) y del ácido docosahexaenoico (F₄-isoprostanos, también llamados neuroprostanos). Estas familias se pueden distinguir de los F₂-isoprostanos por espectroscopía de masas, y su determinación puede ser utilizada para cuantificar la relación en que son peroxidados *in vivo* los distintos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Es conocido que el aumento en el número de dobles enlaces en un PUFA, aumenta la susceptibilidad a la peroxidación *in vitro*, y que las LDL aisladas en sujetos alimentados con dietas ricas en aceite de pescado muestran *in vitro* un aumento en la peroxidación dependiente de Cu²⁺. Estos PUFA más susceptibles a la peroxidación, se observa que se mantienen estables *in vivo*, aunque hay pruebas que muestran un incremento en la formación de F₄ isoprostanos – pero no F₂- en la corteza cerebral de pacientes con Alzheimer.

Los isoprostanos podrían considerarse como biomarcadores útiles para analizar las consecuencias de la ingesta de dietas ricas en PUFA y determinar si antioxidantes, como la vitamina E, podrían mejorar situaciones de peroxidación elevada, así como la cantidad de antioxidante necesaria (Halliwell, 1999).

Los biomarcadores del daño a DNA, lípidos y proteínas deben ser utilizados paralelamente porque es probable que en determinadas situaciones se alteren unos y

otros no. Hay compuestos, como el carcinógeno dietilestilbestrol, que incrementan el daño oxidativo *in vivo* de DNA, a pesar de que actúen como potentes inhibidores de la peroxidación lipídica (Halliwell, 1999). Por tanto cualquier trabajo de investigación que incluya pruebas de intervención ha de analizar mas de un biomarcador.

Determinación del Estado Antioxidante Total en plasma(TAS)

Los métodos desarrollados hasta la actualidad para medir la actividad antioxidante de los fluidos son esencialmente métodos de inhibición en los que se generan especies de radicales libres, hay un punto final por el que se detecta la presencia del radical, y las sustancias antioxidantes de la muestra adicionada capturan el radical inhibiendo el punto final (Rice-Evans *et al.*, 1994).

Los métodos varían en la forma de generar el radical, la reproducibilidad del proceso de generación y el punto final usado (Fig. 2.8.3.2.).

El ensayo TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) se basa en la descomposición térmica del compuesto azo- hidrosoluble: hidrocloreuro de 2,2'-azobis(2- amidopropano) (ABAP) que produce radicales peroxilo a una velocidad constante y conocida. Cada molécula de Trolox (Trolox™, Hoffman-LaRoche, Basel, Switzerland), α -tocoferol u otros antioxidantes fenólicos atrapa dos radicales peroxilo, dando el Trolox un factor de estequiometría de 2 en el ensayo TRAP. Otros antioxidantes puros tienen diferentes factores de estequiometría (ascorbato, 1.5; urato, 1.7) y éstos deben ser considerados cuando se extrapolen las concentraciones molares a partir de los valores del TRAP.

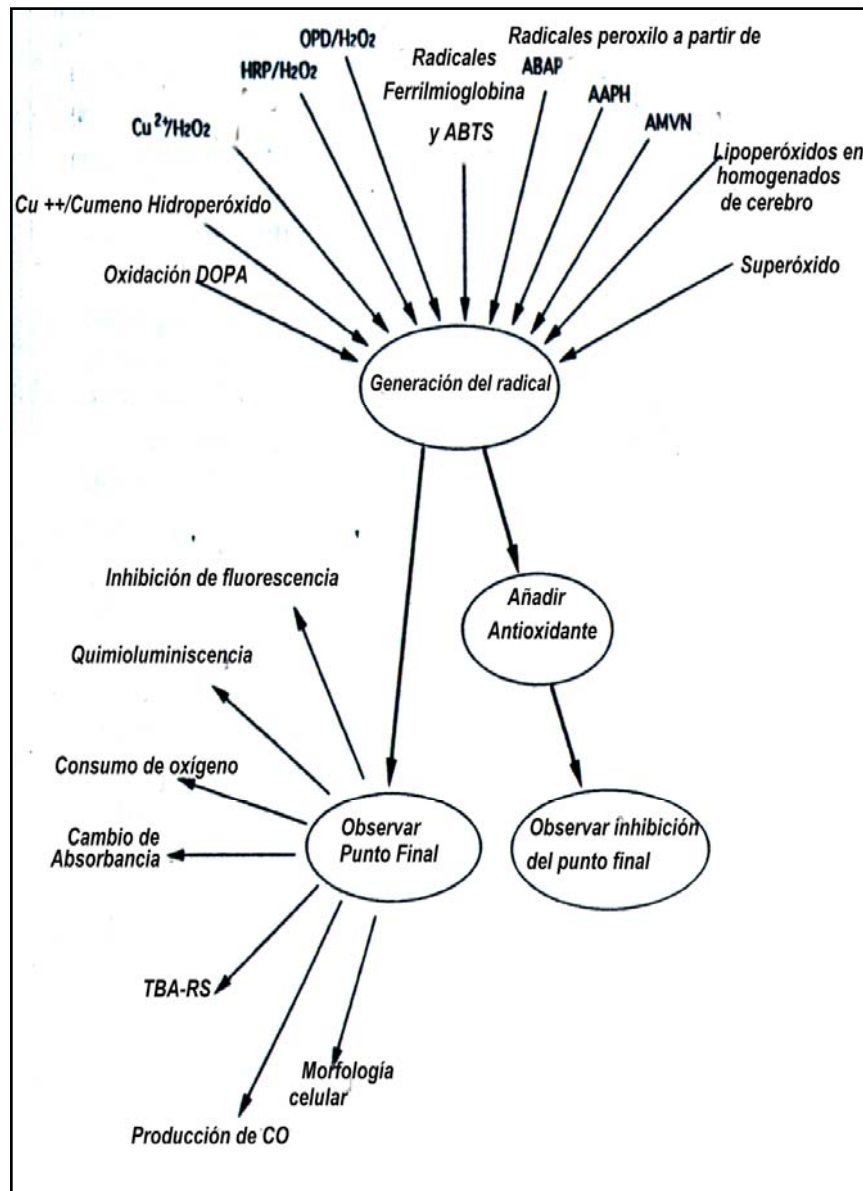


Fig 2.8.3.2.- Métodos para la medida de actividad antioxidante: *HRP*, peroxidasa de rábano; *OPD*, *o*-fenilendiamina; *ABTS*, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6- sulfonato); *ABAP*, 2,2'-azobis(2-amidinopropano)hidrocloruro; *AAPH*, 2,2'- azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro; *AMVN*, 2,2'- azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo); *TBARS*, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; *CO*, producción de monóxido de carbono (Rice-Evans et al., 1994)

El ensayo TRAP fue modificado por Metsa-Ketela (1991) (Rice-Evans *et al.*, 1996) con respecto al punto final, usando la quimioluminiscencia aumentada con luminol, que es más precisa y se presta a un mayor grado de automatización, permitiendo procesar un mayor número de muestras. La producción de radicales peróxido aumenta la reacción de quimioluminiscencia en este sistema: la adición de un antioxidante a la reacción extingue la quimioluminiscencia, la duración de la cual es directamente proporcional a la capacidad captadora de radicales libres de los antioxidantes de la muestra. Está descrito que este punto final produce en el ensayo una mayor precisión que el método TRAP original.

Una nueva modificación fue la introducción de un ensayo para antioxidantes en la fase lipídica usando 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN) como fuente de radicales peróxido. La apolaridad del AMVN genera radicales en la fase lipídica de la muestra, frente al ABAP que genera radicales en fase acuosa. También se ha usado este ensayo, usando luminol y el punto final luminométrico, para medir la capacidad antioxidante de preparaciones con lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL).

El método de Nakamura *et al.*, (1987) utiliza *o*-fenilendiamina (OPD) como sustrato de la enzima peroxidasa. Con la conversión a la forma activada (radical libre), la OPD mostrará un incremento de absorbancia a 430 nm (Rice-Evans *et al.*, 1996).

En el ensayo de DeLange y Glazer (1989) (Rice-Evans *et al.*, 1996) que utiliza ficoeritrina (pigmento para el marcaje con fluoresceína), los antioxidantes (como el ascorbato, urato y α -tocoferol) que reaccionan rápidamente con los radicales peróxido protegen la ficoeritrina del daño por los radicales libres y por eso inhibe el cese de su fluorescencia. El Dicloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), que se descompone térmicamente para producir radicales peróxido al calentar a 37°C, se usa como fuente constante de radicales peróxido. La β -ficoeritrina se usa como agente detector, y es una sustancia muy fluorescente (excitación 540 nm; emisión

565 nm), pero la intensidad de fluorescencia disminuye cuando reacciona con los radicales peroxilo.

McKenna *et al.*, (1991) (Rice-Evans *et al.*, 1996) desarrollaron un ensayo de fluorescencia basado en el fluoróforo lipofílico ácido *cis*- parinárico, una sustancia fluorescente en medio lipídico. El fluorescente ácido *cis*- parinárico (excitación 324 nm, emisión 413 nm) reacciona con los radicales libres y la velocidad constante de pérdida de fluorescencia disminuye por adición de antioxidantes como el α -tocoferol.

El método de Cooper y Engel (1991) mide la formación de monóxido de carbono a partir de DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) y también se ha aplicado en la medida de la capacidad antioxidante de sustancias y soluciones de antioxidantes puros, mejor que para fluidos extracelulares. La oxidación de 3,4-dihidroxifenilalanina producirá monóxido de carbono si no existen antioxidantes en la incubación de la mezcla. Las medidas de CO se realizan por cromatografía gas-líquido (Rice-Evans *et al.*, 1996) .

En otro método se genera radicales libres con peroxidasa de rábano picante y peróxido de hidrógeno o perborato, que se transforman inicialmente en *p*-yodofenol y finalmente en luminol, que puede ser monitorizado por quimioluminiscencia. La adición de antioxidantes en la mezcla de incubación inhibe la fluorescencia. Esta nueva técnica luminométrica se puede calibrar con Trolox y tiene un coeficiente estequiométrico de 2.

Finalmente el método de Rice-Evans y Miller (1994) se basa en la inhibición por antioxidantes de la absorbancia del radical catión 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺) que tiene un espectro de absorción característico con unos máximos a 660, 734 y 820 nm de longitud de onda. El radical catión ABTS⁺ se origina (Fig.13) al reaccionar el ABTS con especies radicales de ferrilmioglobina, generadas por la activación de metamioglobina con H₂O₂ .

Los antioxidantes disminuyen la absorbancia del radical $ABTS^{+\cdot}$ hasta un punto y en una escala de tiempo dependiente de la capacidad antioxidante de la sustancia que se investiga. En este ensayo son evidentes diferentes estrategias analíticas: a) ensayo de decoloración del radical, b) ensayo de inhibición (se fija el tiempo final), c) inhibición del ensayo (velocidad de reacción).

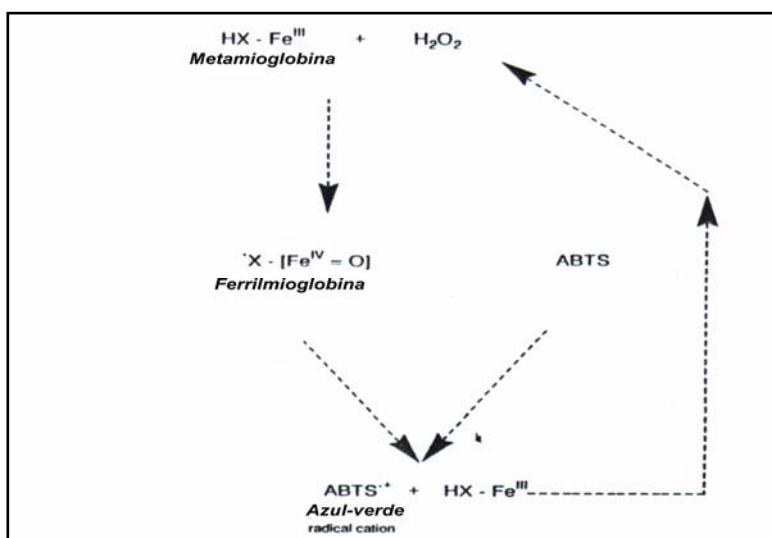


Fig. 2.8.3.3.- Formación del radical catión $ABTS^{+\cdot}$ a partir de mioglobina activada

a) Para el ensayo de decoloración, la reacción entre el $ABTS$ y el peróxido de hidrógeno debe continuar hasta que permanezca estable el color de la mezcla de incubación. Esta reacción requiere la presencia de mioglobina para que reaccione con la peroxidasa originando el radical ferrilmioglobina, al que el $ABTS$ le cede un electrón formando el cation radical $ABTS^{+\cdot}$. El porcentaje en la disminución de color (frente al blanco medido a 734 nm : Absorbancia con la muestra), o el porcentaje de color que permanece en el punto final, se puede usar como un índice de la actividad antioxidante plasmática.

b) Para el ensayo de inhibición con un punto final fijado se mezclan ABTS, mioglobina y la muestra, y la reacción se inicia por adición del peróxido de hidrógeno o metamioglobina. Tras el tiempo fijado, se mide la absorbancia de la solución junto con el tampón, que se utiliza como blanco. La absorbancia del blanco menos la absorbancia de la muestra dividido por la absorbancia del blanco (expresado como porcentaje) es el porcentaje de inhibición de la reacción:

$$\% \text{ Inhibición} = ((\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) / \text{Abs}_{\text{blanco}}) \times 100$$

Este valor (porcentaje de inhibición), define la respuesta del sistema y es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra de plasma.

c) Para el ensayo de inhibición midiendo las velocidades de reacción se sigue el procedimiento trazado en (b), con la adición de todos los reactivos a la vez y la reacción comienza con el peróxido de hidrógeno, pero se determinan en este caso las velocidades de reacción de la muestra y del blanco (tampón). El resultado se obtiene por comparación de las cinéticas de reacción.

La determinación de la capacidad antioxidante total por los métodos anteriores asume en los resultados obtenidos los efectos de sinergismo y antagonismo que existen cuando varios antioxidantes se hallan presentes en una misma muestra. Estos efectos no se pueden cuantificar cuando se determinan de forma individual. Los métodos analíticos utilizados para cuantificar los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos se revisarán en el capítulo siguiente.

Análisis de Creatina quinasa y Lactato Deshidrogenasa

1.- El análisis de **CK** en suero fue usado por **Ebashi *et al.* (1959)** por primera vez como ayuda en el diagnóstico en la distrofia muscular progresiva y desde entonces se ha convertido en un importante marcador del daño muscular (**Agarwal *et al.*, 1999**). La actividad CK es estable durante 7 días a 4° C y 1 mes a -25° C.

Existen principalmente 4 isoenzimas de la CK:

- CK-1-BB: isoenzima que se haya mayoritariamente en el cerebro. El daño en el tejido cerebral puede incrementar el valor de la CK-BB en CSF, pero raramente produce una elevación de la actividad CK total en suero.
- CK-2-MB: isoenzima que se haya mayoritariamente en el músculo cardíaco, con bajas concentraciones en el músculo esquelético.
- CK-3-MM: isoenzima que se localiza en el músculo esquelético, y en pequeña cantidad en el músculo cardíaco. La elevación de esta isoenzima produce en la mayoría de los casos un incremento en la la actividad CK total en suero.
- CK-4-Mt: se localiza en las membranas mitocondriales y representa un 15% de la actividad total en la CK cardíaca.

Las diferentes isoenzimas pueden ser caracterizadas y cuantificadas por métodos electroforéticos o inmunológicos. El nivel de CK sérica depende de la edad, raza, IMC y actividad física. La CK está presente en altas concentraciones en el citoplasma de los miocitos liberándose al torrente circulatorio en determinadas situaciones.

Entre las causas que pueden provocar un incremento en la actividad CK están:

- a) La hemolisis incrementará los valores de CK en eritrocitos. Cuando se afecta involuntariamente el músculo durante la punción venosa puede causar incrementos de 3-4 veces de la actividad CK en la muestra.
- b) La edad, los valores de CK en niños son mucho mayores que en adultos.
- c) El ejercicio extenuante, se conoce un aumento de 2-3 veces en la actividad CK tras un ejercicio extenuante. En el estudio de **Hunt et al. (1989)** un elevado número de pacientes con valores altos de CK tienen una historia de ejercicio extenuante antes de presentar severas crisis dolorosas. Tras el daño muscular los niveles de CK aumentan significativamente alrededor de las dos o tres horas alcanzando su pico máximo a las 24 horas, pero la elevación no es específica de la causa (**Ebashi et al., 1959; Brozovic et al., 1984**). Child et al., (1999) observaron una elevación en la CK sérica tras la realización de ejercicio excéntrico, en días posteriores al ejercicio respecto a los valores CK previos al ejercicio, sin encontrar variaciones significativas en los valores de MDA y TAC en músculo y plasma.
- d) Infarto de miocardio.
- e) Distrofia muscular.
- f) Hipotiroidismo.
- g) Infarto cerebral.

2.- La **LDH** es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del organismo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones.

En el ejercicio las células musculares transforman la glucosa en lactato, que se libera a la sangre, y es recogido por el hígado que lo vuelve a transformar en glucosa que se vierte a la sangre para que pueda utilizarse como energía por los tejidos.

La LDH tiene una gran variedad de isoenzimas con pequeñas diferencias en su estructura, que indican su tejido de origen (LDH1 del corazón, LDH2 del sistema retículo endotelial, LDH3 de los pulmones, LDH4 de los riñones, LDH5 del hígado y músculo). La LDH2 en humanos es el mayor constituyente del LDH total.

Cuando se lesiona un tejido que contiene LDH se vierte más cantidad de LDH a la sangre, por ello el ejercicio físico intenso produce aumento normal del LDH.

La determinación de la actividad lactato deshidrogenasa, en suero, tiene una gran variedad de aplicaciones clínicas. Por ser una enzima intracelular, su elevación es índice de daño tisular con la consecuente liberación de ésta a la circulación. El daño puede ser desde una simple anoxia hasta una necrosis celular severa, produciéndose por lo tanto, diversos grados de elevación de la actividad enzimática en suero. Los valores normales de LDH en adultos son 100-200 UI/L. Además, cuando se alteran los niveles séricos de LDH total, la determinación de la isoenzima predominante posibilita la identificación del órgano comprometido

2.9. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL EJERCICIO FÍSICO

2.9.1.- Estrés oxidativo inducido por el ejercicio extenuante

El aumento del consumo de energía durante el ejercicio físico, hace que se incremente el suministro de oxígeno a los tejidos activos, que puede aumentar hasta 20 veces con relación al estado de reposo (Brooks *et al.*, 1984). El flujo de oxígeno en el tejido muscular esquelético periférico puede, sin embargo, aumentar hasta 200 veces, incrementándose 30 veces de la circulación sanguínea y la diferencia de oxígeno en sangre arteriovenosa se incrementa 3 veces. Este reparto de las cantidades

aumentadas de oxígeno por los tejidos activos durante el ejercicio, potencia el metabolismo oxidativo, maximizando la energía producida por unidad de sustrato y evitando la acumulación de lactato (Keul *et al.*, 1972). Sin embargo, los organismos aeróbicos tienen que pagar un precio por tal ventaja metabólica. Recientes avances en la Bioquímica de la toxicidad del oxígeno, tienen un considerable interés en los efectos en diferentes estructuras biológicas del aumento en el consumo de oxígeno que acompaña al ejercicio (Sen *et al.*, 1994).

Dillard *et al.*, (1978) describen por primera vez que el ejercicio físico extenuante induce daño en los lípidos de varios tejidos desde entonces un considerable número de investigaciones han estudiado los efectos del ejercicio y el entrenamiento en los índices de toxicidad del oxígeno y las defensas frente al mismo. La hipótesis más aceptada es que la toxicidad del oxígeno puede estar implicada en la etiología de una amplia variedad de situaciones patológicas, como ya se ha revisado en capítulos anteriores.

La comprensión de los posibles mecanismos asociados a respuestas fisiológicas que explican cómo el ejercicio aumenta la toxicidad del oxígeno, y el diseño de las medidas apropiadas para minimizar dicha toxicidad, son fundamentales para:

- 1) Aumentar la eficacia del ejercicio físico como instrumento preventivo y terapéutico en la práctica clínica.
- 2) Controlar el daño tisular inducido por el ejercicio (Sen, 1995).

El estrés oxidativo es una situación en la que las células están expuestas a un ambiente prooxidante y los mecanismos de defensa antioxidante son sobrepasados, de forma que se llega a afectar el estado redox celular, lo que se produce durante y/o en una fase posterior al ejercicio de alta intensidad. De ahí se deduce la importancia del aporte nutricional de antioxidantes como vitaminas C y E, betacarotenos y polifenoles en la dieta (König, 2002).

En humanos las defensas antioxidantes en el músculo esquelético y en el corazón son escasas, por lo que estos órganos son muy susceptibles al estrés oxidativo. El metabolismo basal en el corazón es casi el 100% superior al metabolismo basal en el hígado, por lo que el corazón tiene un mayor riesgo de daño oxidativo (Kumar *et al.*, 1992). En reposo, un Kg de corazón e hígado humanos se ha estimado que consumen 94 y 44 ml/min. de oxígeno respectivamente (Diem *et al.*, 1970). En el adulto, las actividades de SOD (superóxido dismutasa) y catalasa se han estimado en 40 veces la catalasa y 16 veces la SOD menores en músculo gastrocnemius comparadas con las del hígado (Jenkins *et al.*, 1984).

Davies *et al.*, (1982) comprobaron mediante resonancia de spin electrónico (ESR) que el ejercicio físico exhaustivo aumenta la concentración de radicales libres en hígado y músculo, e induce daño oxidativo en estos tejidos. También demostraron que el ejercicio físico exhaustivo conlleva una disminución de los niveles de antioxidantes y propusieron que el daño de los radicales libres inducido por el ejercicio, podía estar implicado en la biogénesis mitocondrial.

Jackson *et al.*, (1985) observaron el efecto que tiene una actividad muscular contráctil intensa durante 30 min. en la concentración de radicales libres y las señales de ESR obtenidas indicaron un aumento del 70% en la concentración de RL en el músculo activo, respecto al músculo en reposo.

La teoría en la que el daño muscular, particularmente tras un ejercicio muscular excéntrico, es responsable del estrés inflamatorio en el postejercicio se basa en que inmediatamente después del daño muscular inducido por el ejercicio los neutrófilos, monocitos y macrófagos que acuden a la zona dañada provocan la eliminación de proteínas degradadas y restos celulares. Estas células son capaces de producir EROs y secretar citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α o IL-8, produciendo estrés oxidativo y eventualmente sobre-inflamación. El ejercicio de carrera concéntrico se asocia con un aumento significativo en los parámetros de inflamación (IL-6), mientras que no se aprecia un aumento significativo en las

señales de daño muscular (CK). Sin embargo, el trabajo muscular excéntrico muestra un incremento típico en la actividad CK tras 72 horas de finalizar el ejercicio, pero no aumenta la IL-6 (König,2000).

Barclay *et al.*(1991) sugieren que el estrés oxidativo está implicado en la generación de la fatiga muscular, ya que no se han observado los efectos del radical superóxido en presencia de captadores de radicales hidroxilo, bloqueando la actividad de la xantina oxidasa y con quelantes del ión ferroso. Kondo *et al.*, (1994) observaron una relación entre el estrés oxidativo y la atrofia muscular.

El primer factor desencadenante de la contracción muscular es una señal eléctrica basada en la entrada de Na^+ a la célula, seguida de una salida de K^+ de la célula. Estudios en animales y en humanos han revelado que se produce un aumento en la concentración plasmática de K^+ tras la contracción muscular. Como consecuencia de este aumento de K^+ que escapa al exterior celular, y del agua que se introduce en la célula, la contracción muscular intensa disminuye la concentración de K^+ intracelular en un 6-20 %. Esta considerable salida de K^+ intracelular puede perjudicar la excitación del sarcolema y los túbulos-T- de las membranas, y finalmente contribuir al inicio de la fatiga (Sjogaard, 1990).

Sen *et al.*, 1995 estudiaron el efecto que tiene la exposición a agentes oxidantes de los sistemas de transporte del K^+ en cultivos celulares de músculo esquelético y observaron que bajas dosis de hidróperóxido (H_2O_2) tienen efectos específicos en los diferentes componentes de los transportadores de K^+ , los mecanismos y la significación biológica aún no están dilucidados.

La **oxidación del glutatión** (GSH) en varios tejidos ha demostrado ser un índice adecuado para valorar el estrés oxidativo, ya que en esta situación el glutatión intracelular se oxida rápidamente a GSSG. El GSSG producido intracelularmente puede ser reducido hasta glutatión en presencia de la glutatión reductasa activa que requiere NADPH como cofactor. No obstante, si el grado de estrés oxidativo es

severo, la relación entre la formación de GSSG puede superar la capacidad de las células de reducirlo y en esta situación, se ha observado que las células del corazón y del músculo esquelético vierten GSSG fuera de ellas por un mecanismo acoplado a la energía (Ishikawa *et al.*, 1986; Sen *et al.*, 1993).

En el ejercicio extenuante se ha observado un aumento del nivel de GSSG y una disminución del nivel de glutatión total (GSSG + GSH) en los tejidos del músculo esquelético, corazón e hígado (Lew *et al.*, 1991; Ji *et al.*, 1992; Sen *et al.*, 1992; Ji, 1994; Sen *et al.*, 1994). Este aumento en la generación de GSSG, excede la capacidad de la glutatión reductasa para reducir el grupo disulfuro, lo que explicaría el vertido de GSSG del tejido al plasma (Sen, 1995). El aumento de la concentración de glutatión oxidado plasmático como consecuencia del ejercicio ha sido demostrado en numerosos trabajos (Viguie *et al.*, 1993; Sen *et al.*, 1994). Gohil *et al.*, 1988 observaron que un ejercicio submaximal al 65% de VO_{2max} aumentaba la oxidación del glutatión en sangre durante los primeros 15 minutos de ejercicio. En otro estudio el nivel de GSSG en sangre aumentó significativamente después de un test maximal en cicloergómetro durante 14 minutos, o tras pedalear 30 minutos en el umbral anaeróbico o después de pedalear 30 minutos en el umbral aeróbico los respectivos individuos (Sen *et al.*, 1994). Por el contrario Ji *et al.*, 1994 no observan cambios significativos de GSSG en sangre a los 60 y 120 min tras finalizar el ejercicio en un trabajo realizado con ciclistas sanos sometidos a un ejercicio al 70% de VO_{2max} durante 134 min. Sen *et al.* (1995) observan que 24 horas de recuperación son suficientes para restablecer los valores de GSSG en sangre existentes antes del ejercicio.

La capacidad para la síntesis del glutatión en el hígado es muy alta y el ejercicio induce una disminución del glutatión hepático, lo que se ha interpretado como una respuesta protectora (Sen *et al.*, 1992). Los datos a partir de ratas hepactetomizadas revelan que el nivel de glutatión en el músculo cardíaco es muy dependiente del suministro hepático, sin embargo no sucede igual en el músculo esquelético (Kretzschmar *et al.*, 1992), ya que las células del músculo esquelético

son muy activas en la síntesis del glutatión, se estima que las células musculares son capaces de mantener una concentración aproximada 3mM de glutatión (Sen *et al.*, 1995).

Al usar la oxidación del glutatión como parámetro para detectar el daño causado por los radicales libres en el deporte, Gómez-Cabrera y col.,(2002) observan que sólo se produce daño cuando se llega al agotamiento, es decir, los efectos de los radicales libres sólo ocurren cuando el sujeto realiza ejercicio físico a un grado que supera el umbral anaeróbico.

Como ya se indicó anteriormente la mieloperoxidasa dependiente de la producción de superóxido en neutrófilos es un proceso fisiológico que tiene una actividad bactericida. Los neutrófilos representan el 50-60% de los leucocitos circulantes, y Smith *et al.*, (1990) mostraron que una única prueba de ejercicio puede aumentar extraordinariamente la producción de ERO por los neutrófilos.

En mamíferos el **daño oxidativo del DNA** se relaciona con el ritmo metabólico (Ames *et al.*, 1993), lo que se manifestó al observar que tras una carrera de maratón de 10 horas la relación de nucleósidos oxidados/creatina aumenta 1,3 veces respecto al reposo (Alessio *et al.*, 1990); sin embargo Viguie *et al.*, (1993) no observaron cambios significativos de 8-hidroxiguanosina en orina tras 90 minutos de ejercicio.

Los oxidantes como el radical hidroxilo y el radical peroxilo, pueden unirse también a las proteínas. **Las proteínas oxidadas** son rápidamente degradadas hasta sus aminoácidos constituyentes por el ATP o por la vía independiente de la ubiquinona. Constituyentes de las proteínas como metionina, triptófano, histidina y residuos sulfhidrilo, cruciales para la función proteica, son muy sensibles al daño oxidativo. La significación fisiológica de la oxidación proteica es amplia e incluye la modificación de receptores, alteración de señales de traducción y otros procesos.

Reznick *et al.* (1992) fueron los primeros en observar que el ejercicio físico intenso incrementa la oxidación proteica del músculo esquelético en ratas. **Rajguru *et al.* (1994)** comprueban que después del ejercicio disminuye la cantidad de grupos sulfhidrilo en los microsomas del músculo esquelético, lo que resulta importante en la formación de enlaces cruzados entre las proteínas.

2.9.2.-Entrenamiento físico como protector frente al estrés oxidativo

Hasta ahora nos hemos centrado en los efectos nocivos de las ERO generadas durante el ejercicio físico agotador. Sin embargo, el ejercicio físico, sobre todo cuando no es agotador resulta una práctica claramente sana y beneficiosa para la prevención de muchas enfermedades.

El estrés oxidativo producido por el ejercicio depende del tipo, intensidad y duración del ejercicio, sin embargo y en mayor grado la variabilidad interindividual se atribuye a las diferencias en el nivel de entrenamiento, género, nutrición y factores genéticos (**König, 2000**).

Los efectos indeseables del ejercicio agotador se evitan, al menos en parte, con el entrenamiento. **Salminen *et al.*, (1983)** muestran que el entrenamiento reduce la susceptibilidad del músculo a los radicales libres. Por otro lado, **Leeuwenburgh *et al.*, (1994)**, demostraron que el entrenamiento induce el aumento de enzimas antioxidantes. **Gómez-Cabrera *et al.*, (2002)** han observado que el entrenamiento protege contra la oxidación del glutatión asociado al ejercicio físico agotador. El ejercicio físico regular genera una adaptación frente al estrés oxidativo evidenciado por un descenso del daño al ADN, niveles mantenidos de oxidación proteica y un aumento de la resistencia frente a la administración crónica de peróxido de hidrógeno (**Radak *et al.*, 1999; Radak *et al.*, 2000**).

En músculo esquelético, corazón e hígado, las defensas antioxidantes parecen estar reguladas por el efecto del entrenamiento físico (Jenkins *et al.*, 1984; Leeuwenburgh *et al.*, 1994). Caldarera *et al.* (1973) fueron los primeros en mostrar que el ejercicio agudo aumenta la actividad catalasa en hígado, músculo esquelético y corazón en ratas. Desde entonces un gran número de trabajos han comprobado el efecto de varios regímenes de ejercicios de entrenamiento de resistencia en las defensas antioxidantes (Ji, 1994; Ohno *et al.*, 1994; Sen and Hänninem, 1994).

El ejercicio diario de intensidad moderada y larga duración (entrenamiento de resistencia) produce un aumento del contenido mitocondrial en músculo, pero una prueba única de ejercicio de alta intensidad se ha demostrado que conlleva un daño muscular derivado entre otras causas, de un incremento de la sensibilidad a agentes oxidantes, de una liberación de enzimas proteolíticas en músculo e hígado, y de un deterioro en la integridad de las membranas, retículo endoplásmico y retículo sarcoplásmico (Davies *et al.*, 1982).

Jenkins *et al.* (1984) hallaron una buena correlación entre el consumo de oxígeno y las enzimas antioxidantes a nivel muscular (biopsias de tejido muscular). Los sujetos sometidos a estudio se dividieron en dos grupos:

- 1) $VO_{2max} > 60 \text{ ml/ Kg. min}$ y
- 2) $VO_{2max} < 60 \text{ ml/ Kg. min}$

El grupo de alta capacidad aeróbica tuvo un aumento significativo de las actividades catalasa y SOD en músculo, apreciándose una correlación positiva entre el VO_{2max} y la catalasa muscular ($r = 0.72$, $p < 0.01$), y la SOD ($r = 0.60$, $p < 0.05$).

Ginsburg *et al.* (1996) describen en un grupo de atletas entrenados, sometidos a una única prueba de ultrarresistencia, una disminución del 47%, ($p < 0.001$) de la peroxidación lipídica en plasma respecto a los valores medidos antes de iniciar la prueba. En el mismo trabajo se observó que los valores de peroxidación lipídica en reposo eran menores ($p < 0.01$) en el grupo de atletas entrenados que en un grupo de sedentarios. Estos resultados indican que los efectos acumulativos del entrenamiento tienden a disminuir la peroxidación lipídica en plasma.

Criswell et al.(1993) estudiaron el efecto del entrenamiento durante 12 semanas y observaron cambios favorables en el músculo esquelético en ratas. Los autores proponen que un período de 5 minutos de entrenamiento de alta intensidad, fue superior en la regulación de las defensas antioxidantes musculares al ejercicio continuo de intensidad moderada.

El ejercicio físico habitual es crucial para mantener y promover la capacidad natural para defender al organismo frente a la toxicidad del oxígeno reactivo. En los procariotas se conocen algunos mecanismos dependientes de las ERO en la inducción de las proteínas de defensa antioxidantes (**Sen, 1994**). En células de mamíferos se ha identificado el factor de transcripción activador de la proteína-1 y NF-kB como susceptible al equilibrio redox (**Schreck et al., 1991; Amstad et al., 1992; Sen,1995**). El estado redox – tiol en distintos compartimentos de estas células parece influir en la regulación de estos factores de transcripción. Por ejemplo una alta concentración citosólica de GSSG induce la activación de NF-kB, pero una baja concentración citosólica de GSSG inhibe la fijación del dímero activado a la secuencia de oligonucleótidos diana. El ejercicio físico que induce cambios en el estado redox-tiol de los tejidos, puede influir en la señal intracelular del proceso de traducción provocando la expresión de proteínas de defensa antioxidante (**Mihm et al., 1995**).

Hay numerosos trabajos que apoyan que el ejercicio crónico incrementa las defensas antioxidantes:

- La actividad de la eritrocito catalasa y de la glutation reductasa muestran incrementos significativos después de 10 semanas de entrenamiento (**Ohno et al., 1988**).

- En otro estudio se examinó el estado antioxidante de corredores altamente entrenados (128- 230 Km./semana), corredores baja y medianamente entrenados (26-70 Km. / semana) y de individuos sedentarios, y se encontró que

existía una relación directa entre la distancia recorrida semanalmente y la actividad eritrocitaria de las enzimas antioxidantes. Se observó que los corredores de maratón entrenados parten de unos niveles de MDA y dienos conjugados (DC) en reposo superiores a los de los sujetos sedentarios. Al finalizar la prueba de medio maratón los sujetos entrenados muestran un aumento significativo en los valores de MDA y CD, pero estos niveles disminuyen en el periodo de recuperación (24-48 horas) hasta valores inferiores incluso a los que se determinaron en reposo. Estos resultados sugieren que el entrenamiento aeróbico mejora la actividad enzimática antioxidante en eritrocitos tanto en reposo como en el periodo de recuperación post-ejercicio. Esta mejora junto con el aumento del flujo sanguíneo muscular y la actividad aldehido-deshidrogenasa mitocondrial en el músculo, pudieran ser responsables de la significativa disminución de los índices de peroxidación lipídica tras el ejercicio en sujetos entrenados (Robertson *et al.*, 1991).

- La peroxidación lipídica en sangre disminuye en respuesta al incremento del tiempo de entrenamiento en mujeres de 60 años, indicando un efecto de adaptación (Yagi, 1992).

- En otro estudio con ratones se demostró que tras controlar durante 5 días su entrenamiento, se podía eliminar el daño muscular inducido por una prolongada carrera. En varias experiencias se relataron reducciones significativas en la sensación de dolor y proteólisis después del entrenamiento. Los autores sugieren que el entrenamiento puede inducir un efecto protector parcial contra el daño muscular, a condición de que la intensidad y la duración del ejercicio no sean enormemente aumentados (Komulainen y Vinko, 1995).

- Child *et al.*, (1998 y 1999) estudiaron corredores entrenados que fueron sometidos a un ejercicio físico intenso, lo que sugiere un considerable incremento de ERO y observaron que las variaciones en el consumo de oxígeno

pueden hacer subestimar el verdadero aumento en la formación de radicales libres durante el ejercicio intenso, como consecuencia de que se reduce el control respiratorio mitocondrial (Davies *et al.*, 1982) y se incrementa la formación de radicales libres a partir de fuentes no mitocondriales (Sjödín *et al.*, 1990). Se observó una correlación significativa entre el consumo de oxígeno y TAC plasmática, lo que sugiere que el incremento en la protección antioxidante plasmática sea una consecuencia del aumento en la capacidad para consumir oxígeno. Los cambios bioquímicos que producen este efecto pueden representar una respuesta de adaptación al entrenamiento de resistencia (Child *et al.*, 1998).

- Brites *et al.* (1999) observan un aumento en los niveles plasmáticos de antioxidantes de bajo peso molecular (ácido ascórbico, ácido úrico y α -tocoferol) en un grupo de futbolistas entrenados, respecto a controles sedentarios. Este aumento puede ser atribuido a una movilización de estos antioxidantes desde los tejidos hacia el plasma, lo que justificaría la mejora del estado antioxidante total plasmático con el entrenamiento.

Son diversos los autores que sugieren que el entrenamiento físico induce, en el contenido de enzimas antioxidantes, adaptaciones paralelas al incremento de la capacidad oxidativa de las enzimas mitocondriales que participan en el metabolismo muscular. No obstante, en un trabajo de Laughlin *et al.* (1990), al estudiar la relación entre la capacidad oxidativa y las enzimas antioxidantes musculares, realizando un análisis de regresión lineal; no se encontró ninguna relación entre la capacidad oxidativa y la actividad SOD y catalasa. Además aunque el entrenamiento físico induce un aumento en la capacidad oxidativa muscular, no se observa ningún efecto en la actividad SOD y provoca una disminución significativa en la actividad catalasa, resultados que concuerdan con los hallados por Ji *et al.*, (1992).

2.10.- DEFENSAS ANTIOXIDANTES

La demostrada contribución de las ERO al daño y la fatiga muscular como consecuencia de la actividad física intensa o prolongada, desequilibrando la homeostasis muscular hace que no sea sorprendente que dentro y fuera de las células del músculo esquelético existan mecanismos de defensa para reducir el riesgo del daño oxidativo (Barclay *et al.*, 1991). Los dos tipos principales de mecanismos protectores (enzimáticos y no enzimáticos) actúan como un único sistema antioxidante para reducir los efectos perjudiciales de las ERO en las células. Los antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) existen en los medios intra y extracelulares y para dotar de una protección intracelular máxima, estos captadores están estratégicamente compartimentados dentro de la célula (Powers *et al.*, 1999).

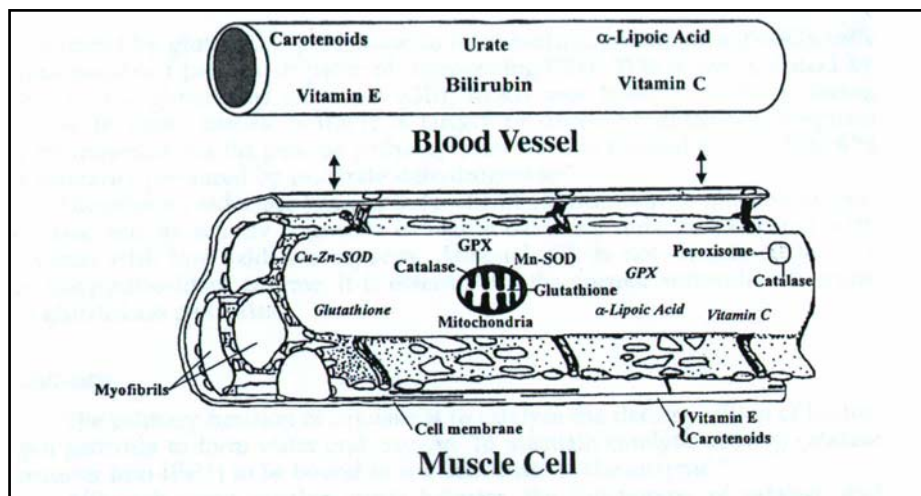


Fig. 2.10.1.- Defensas antioxidantes musculares. Localización de los antioxidantes más importantes intracelulares y extracelulares en el miocito del músculo esquelético (Powers *et al.*, 1999)

Entre las estrategias utilizadas por los antioxidantes para proteger al organismo sometido a una actividad física cuando el equilibrio, antioxidantes ⇌ prooxidantes, se desplaza hacia la derecha; se encuentra la conversión de las ERO en

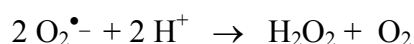
moléculas menos reactivas y la prevención de la transformación de las ERO menos reactivas en formas más perjudiciales (p.e. prevención de la transformación del peróxido de hidrógeno hasta radical hidroxilo) (Ghiselli *et al.*, 2000).

2.10.1.- ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Las principales enzimas antioxidantes celulares son : superóxido-dismutasa (SOD), catalasa (Cat) y glutatión-peroxidasa (GPx).

A) Superóxido-dismutasa

Constituye la defensa celular más importante frente a los radicales superóxido, dismutándolos hasta formar peróxido de hidrógeno y oxígeno.



Esta reacción transcurre normalmente a baja velocidad ($t_{1/2} = 7 \text{ s}$) y depende del pH; en presencia de SOD $0.35 \mu\text{M}$ la velocidad de dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ se acelera hasta alcanzar un $t_{1/2} = 0.5 \text{ ms}$ (Ji, 1995).

En humanos existen dos isoenzimas de Superóxido-dismutasa en músculo esquelético que varían en la localización celular y en el cofactor metálico unido a ellas.

La Superóxido-dismutasa Cu-Zn, es un dímero de $\text{Mr} = 32.000 \text{ u.m.a.}$, que se localiza principalmente en el citosol, mientras que la isoenzima Superóxido-dismutasa-Mn se encuentra principalmente en la matriz mitocondrial. Ambas isoenzimas catalizan la dismutación del radical superóxido con una eficiencia similar (Ji, 1995).

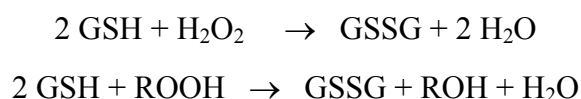
La distribución de las isoenzimas superóxido dismutasa varía en los distintos tejidos: en músculo esquelético la actividad superóxido dismutasa se distribuye en un 15-35% en la mitocondria, mientras que el resto 65-85% se localiza a nivel citosólico; siendo esta actividad mucho mayor en los músculos con alta capacidad oxidativa (alto porcentaje de fibras tipo I y IIa) que en los músculos con baja capacidad oxidativa (alto porcentaje de fibras tipo IIb) (Criswell, 1993).

La actividad SOD muestra un incremento significativo con el entrenamiento y hay evidencia de que la SOD-Mn es la principal responsable de ese aumento. El incremento en la actividad de la SOD-Mn producido con el entrenamiento es relativamente pequeño comparado con los aumentos en la actividad de otras enzimas mitocondriales y además no se relaciona con una mejora significativa de la protección antioxidante (Ji, 1995). Se ha observado como el entrenamiento aumenta la actividad SOD sólo en las fibras tipo I, y que la actividad SOD aumenta más en función de la duración del ejercicio que con la intensidad. Una prueba de ejercicio intenso provoca un aumento en la actividad SOD en tejidos como el corazón, hígado, pulmón, plaquetas sanguíneas y músculo esquelético (Ji, 1995).

La actividad SOD fue muy superior (en un 52%, $p < 0.01$) en futbolistas entrenados respecto a sujetos sedentarios (Brites *et al.*, 1999). En un estudio con sujetos controles sedentarios, corredores de maratón y atletas velocistas entrenados, se observó que la actividad SOD era significativamente superior en los deportistas respecto a los controles ($p < 0.01$), y también fue superior tras finalizar las pruebas físicas en los dos grupos de deportistas respecto a los valores obtenidos en reposo antes de realizar las pruebas (Marzatico *et al.*, 1997).

B) Glutation peroxidasa

La Glutation-peroxidasa (GPx) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno o los hidroperóxidos orgánicos hasta agua y alcohol, respectivamente, utilizando el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones:



La Glutation-peroxidasa es una enzima selenio-dependiente que existe en una isoforma (EC 1.11.1.9). Aunque la Glutation-peroxidasa es muy específica con el donante de electrones (GSH), tiene una baja especificidad con los hidroperóxidos. La Glutation-peroxidasa reduce un amplio rango de hidroperóxidos (desde el peróxido de hidrógeno hasta complejos hidroperóxidos orgánicos) y esta característica hace de la Glutation-peroxidasa un importante protector celular frente a las ERO.

La actividad Glutation-peroxidasa varía según el tipo de fibras musculares: es muy alta en las fibras tipo I y muy baja en las fibras tipo IIb (Ji *et al.*, 1992). Respecto a su localización intracelular, en músculo esquelético el 45% de la actividad Glutation-peroxidasa está en el citosol y el 55% restante en la mitocondria. El hecho de que la Glutation-peroxidasa se encuentre tanto en el interior de la mitocondria como en el citosol permite eliminar el peróxido de hidrógeno o los hidroperóxidos orgánicos producidos a partir de diversas fuentes.

La Glutation-peroxidasa necesita un suministro de GSH, (que es oxidado por esta enzima hasta glutatión oxidado, GSSG), por lo que las células deben poseer una vía capaz de regenerar el glutatión reducido (GSH). Esta función se consigue mediante la enzima Glutation- reductasa (GR) que utiliza NADPH como agente reductor. En muchos tejidos el NADPH se produce mayoritariamente a través de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa por la vía de las pentosas, pero en el músculo esquelético, el NADPH se produce mayoritariamente a través de la isocitrato-deshidrogenasa (Criswell *et al.*, 1993).

La GR tiene una distribución celular similar a la Glutation-peroxidasa, y su actividad es mucho mayor en músculos con alta capacidad oxidativa que en músculos con baja capacidad oxidativa. Aunque la GR no se considera un enzima antioxidante primario, es esencial para la correcta función antioxidante de la Glutation-peroxidasa.

El efecto de una prueba de ejercicio físico intenso sobre la actividad de la Glutation peroxidasa es controvertido.

La actividad de la GPx aumenta con el entrenamiento sólo en las fibras tipo II y esta adaptación al entrenamiento depende de la duración más que de la intensidad del ejercicio. Tras un ejercicio físico intenso la actividad GR aparece aumentada en músculo esquelético de rata. También aumenta dicha actividad en eritrocitos de humanos después de un ejercicio prolongado. En un estudio realizado con sujetos controles sedentarios, corredores de maratón y atletas velocistas entrenados, se observó que la actividad GPx era significativamente superior en los deportistas respecto a los controles ($p < 0.01$) (Marzatico *et al.*, 1997).

C) Catalasa

Es un tetrámero de $M_r \approx 240.000$ u.m.a. (Ji, 1995) cuya función principal es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno hasta agua y oxígeno.



Para mantener la actividad catalítica la catalasa requiere que el Fe^{3+} se una al sitio activo del enzima. Aunque la función de la catalasa y de la Glutation-peroxidasa podrían solaparse, las dos enzimas tienen diferente afinidad por el peróxido de hidrógeno, como sustrato: la Glutation-peroxidasa de mamíferos tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones, comparada con la catalasa ($K_m_{\text{GPx}} = 1 \mu\text{M}$ y $K_m_{\text{catalasa}} = 1 \text{mM}$). Esto hace que a bajas

concentraciones la Glutacion-peroxidasa juegue un papel más activo en la eliminación del peróxido de hidrógeno en las células musculares.

La catalasa está extensamente distribuida en la célula, se han encontrado altas concentraciones en peroxisomas y mitocondrias (Halliwell *et al.*, 1999). Tal y como sucede con la Glutacion-peroxidasa y Superóxido-dismutasa, la actividad de la catalasa es mucho mayor en músculos con alta capacidad oxidativa que en músculos con un gran porcentaje de fibras tipo II (Powers *et al.*, 1999).

El efecto del entrenamiento en la actividad catalasa es controvertido ya que existen estudios que muestran aumento, disminución y ausencia de variación en la actividad catalasa con el ejercicio crónico. Calderera *et al.*, (1973) observaron un aumento significativo de la actividad CAT en corazón, hígado y músculo esquelético tras una prueba de ejercicio físico intenso. Se podría esperar que la actividad CAT aumentase como consecuencia del aumento en la producción de H₂O₂ durante el ejercicio; no obstante la CAT se localiza principalmente en los peroxisomas, mientras que la fuente principal de H₂O₂ es la mitocondria en condiciones fisiológicas. La Glutacion-peroxidasa mitocondrial y citosólica son probablemente más efectivas en la competición por el H₂O₂ producido en esos dos compartimentos celulares que la CAT (Ji, 1995).

En un estudio con sujetos controles sedentarios, corredores de maratón y atletas velocistas entrenados, se observó que la actividad CAT era significativamente inferior en los atletas velocistas entrenados respecto a los controles (p<0.05), y era significativamente superior (p<0.01) en los corredores de maratón respecto a los controles sedentarios (Marzatico *et al.*, 1997).

D) Otras enzimas que participan en el sistema de defensa antioxidante

La Citocromo-c-oxidasa es la enzima terminal en la cadena respiratoria mitocondrial, catalizando la transferencia de electrones del citocromo a₃ al oxígeno

molecular. La importancia de esta enzima radica en que previene el escape de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 fuera de la cadena respiratoria al unirse estas ERO al enzima.

Las enzimas lipolíticas, como la fosfolipasa A_2 , juegan un importante papel en la eliminación de lípidos oxidados, lo que previene la peroxidación lipídica.

La degradación de las proteínas oxidadas es importante para evitar la acumulación en la célula de residuos alterados o dañados, ya que en determinadas condiciones oxidativas, ciertas proteasas se activan para degradar proteínas oxidadas, incluidas las moléculas enzimáticas (Ji, 1995).

La activación de las defensas antioxidantes enzimáticas tras la realización de un ejercicio físico intenso puede reflejar un aumento en la producción de ROS en esta situación, basada en las propiedades cinéticas de estas enzimas. Sin embargo, por las diferentes magnitudes del incremento en el consumo de oxígeno y por las diferencias intrínsecas en las actividades enzimáticas, el músculo esquelético puede estar sometido a un mayor grado de estrés oxidativo durante el ejercicio que el hígado y el corazón. Los tejidos de mamíferos no muestran una rápida regulación de la expresión genética en las enzimas antioxidantes como respuesta a un estrés oxidativo intenso, aunque tal mecanismo de regulación sí se ha hallado en los procariontes (Ji, 1995).

Aunque se ha producido un incremento en la evidencia que el entrenamiento físico regula las enzimas antioxidantes en aquellos tejidos involucrados activamente en el ejercicio, existe aún controversia al respecto. En general las enzimas antioxidantes en músculo esquelético muestran la mayor respuesta de adaptación al entrenamiento. En humanos existe una correlación entre una elevada actividad en las enzimas antioxidantes con el consumo máximo de oxígeno, y los atletas entrenados tienen una mayor actividad SOD y CAT en músculo esquelético. Los autores describen que ciclistas amateur y profesionales tienen mayor actividad SOD en eritrocitos que sujetos controles; y también describen que los ciclistas profesionales

tienen mayores actividades CAT y GPx que sujetos controles y ciclistas amateur (Ji, 1995). Se puede pensar que el entrenamiento de resistencia reduce el daño oxidativo por un aumento en las enzimas antioxidantes mitocondriales y consecuentemente con una disminución del flujo de oxígeno en la cadena respiratoria.

2.10.2.- ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

A) Glutation

El glutatión (GSH) o γ -glutamilcisteinglicina es la mayor fuente no proteica de grupos tiol en las células. Se sintetiza principalmente en el hígado y es transportado por la circulación hasta los tejidos. Debido a su estructura peptídica, el GSH es degradado en el intestino delgado cuando se ingiere, por consiguiente en los niveles celulares de GSH no influye directamente la dieta.

La concentración celular de GSH está en el rango milimolar para la mayoría de los tejidos, pero el contenido en GSH varía mucho en los distintos órganos dependiendo de su función. Por ejemplo los mayores niveles de GSH se encuentran en el cristalino (10 mM) y en el hígado (5-7 mM) (Halliwell et al., 1999). Otros órganos como pulmón, riñón y corazón contienen aproximadamente 2-3 mM de GSH. En el músculo esquelético la concentración de GSH varía dependiendo del tipo de fibra muscular y de la especie animal (Ji, 1995).

El glutatión cumple varias funciones en la defensa antioxidante celular. En primer lugar, el GSH interacciona fácilmente con una variedad de radicales, incluidos los radicales hidroxilo y los peróxidos orgánicos, como donante de átomos de H. En segundo lugar, una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es eliminar el hidrógeno y los peróxidos orgánicos (como los lipoperóxidos) durante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, formando agua y alcohol respectivamente. Por donación de dos átomos de H, dos moléculas de GSH se oxidan

hasta GSSG. La reducción del GSSG es catalizada por la glutathion reductasa (GR), una enzima que contiene flavina, usando el NADPH como reductor. Esta reacción tiene lugar junto a la catalizada por la glutathion peroxidasa, lo que permite la regeneración del GSH mediante un ciclo redox.

Se ha descrito que el GSH actúa como reductor de varios antioxidantes celulares. Por ejemplo se ha postulado que el glutathion reduce los radicales de la vitamina E (radical α -tocoferoxil) que se forman en la cadena de reacciones con los radicales alcoxilo o con los radicales lipoperoxilo. El glutathion también puede ser usado para reducir el radical de la vitamina C (semidehidroascorbato) producido en el reciclado de la vitamina E y en la reducción del ácido lipoico a dihidrolipoato. Esta última reacción juega un papel importante en la recuperación del ácido ascórbico (Packer, 1991).

En un estudio tras someter a los sujetos a 90 minutos de ejercicio se muestra una disminución significativa de GSH sanguíneo mientras que aumentan los niveles sanguíneos de GSSG (Gohil *et al.*, 1998).

Sen *et al.*, (1994) someten a individuos a un test maximal durante 14 minutos, tras el que no varían los niveles sanguíneos de glutathion total (GSH+GSSG) ni de GSH, pero existe un incremento del GSSG y del 100% de la relación GSSG/(GSH+GSSG). Cuando los sujetos se someten durante 30 minutos a un test submaximal (50% del VO_2 max.) de ejercicio aeróbico se obtienen los mismos resultados. Cuando los sujetos se someten durante 30 minutos a un test (77% del VO_2 max.) de ejercicio anaeróbico no varían los niveles sanguíneos de GSH, pero existe un incremento del GSSG, del glutathion total y de la relación GSSG/(GSH+GSSG). Tras un período de 24 horas todos los niveles se recuperan alcanzando los mismos valores encontrados antes de la pruebas.

Como los niveles plasmáticos de GSH son casi indetectables en humanos ($<0.01 \mu\text{M}$), la oxidación del GSH puede tener lugar principalmente en los

eritrocitos, que tienen un sistema específico dependiente de la energía para exportar el exceso de GSSG intracelular. Como en el test anaerobio no se observa un incremento de GSH en sangre, el incremento del glutathion total podría ser debido al GSSG exportado de los tejidos además del GSSG sanguíneo (Sen *et al.*, 1994).

El nivel plasmático de GSH es aproximadamente tres veces menor que el nivel en sangre. Además es probable que los cambios en el GSH plasmático debidos al flujo acelerado de GSH hepático, que se produce durante el ejercicio, no sean detectados a nivel sanguíneo de GSH o del glutathion total. El estrés oxidativo debido a una actividad física intensa produce una rápida oxidación en el GSH intracelular en las células musculares y de una producción de GSSG que es liberado al torrente sanguíneo. En conjunto se observa una disminución del nivel de glutathion total intracelular, lo que sugiere que el flujo de GSSG de las células musculares a la sangre sea por un mecanismo dependiente de energía (Sen *et al.*, 1992).

El efecto del entrenamiento en el contenido de GSH parece variar entre los tipos de fibras musculares y los diferentes tejidos. El contenido de GSH en eritrocitos aumenta significativamente, acompañado de un aumento en la actividad glutathion reductasa, tras 20 semanas de entrenamiento físico en humanos que previamente eran sedentarios. Está descrita una elevación en la concentración de GSH sanguíneo tras una sesión de entrenamiento en corredores de largas distancias frente a sujetos controles no entrenados (Ji *et al.*, 1995). En sujetos moderadamente entrenados, sometidos a una carrera durante 2.5 horas, se observa tras la prueba una disminución de GSH plasmático y del cociente GSH/GSSG, mientras que el nivel de GSSG muestra un incremento significativo al final de la prueba respecto al pre-ejercicio (Dufaux *et al.*, 1997).

El entrenamiento a corto plazo no produce una mejora en la adaptación del sistema antioxidante, tal y como se refleja en un estudio realizado con humanos de ambos sexos sometidos durante 8 semanas a un entrenamiento aeróbico (3veces/semana), en el cual no se observaron variaciones en las actividades de las

enzimas SOD, CAT y GPx. Tampoco cambiaron las concentraciones de vitamina E en músculo, ni los niveles de glutatión (GSH, GSSG, Glutatión total y cociente GSH/GSSG) (Tiidus *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que el entrenamiento protege frente a la oxidación del glutatión asociada al ejercicio agotador (Gómez-Cabrera *y col.*, 2002).

En otro estudio un grupo de sujetos moderadamente entrenados se sometieron a una primera prueba de ejercicio maximal seguida de un ejercicio submaximal prolongado (3 días consecutivos de ejercicio al 65% VO₂ max). Tras los tres días de prueba submaximal no se observó variación en los valores de glutatión total respecto a los medidos antes de la prueba, sí aparece una disminución del GSH acompañado de un aumento del GSSG respecto a los valores en reposo previos al ejercicio (Viguie *et al.*, 1993).

B) Vitamina E

La vitamina E es el principal antioxidante que actúa frente a las reacciones de lipoperoxidación en cadena en la membrana celular. El término genérico vitamina E se refiere a varios isómeros estructurales de tocoferoles y tocotrienoles, siendo el α -tocopherol el más conocido y el que posee mayor actividad antioxidante. Debido a su alta liposolubilidad la vitamina E se asocia con los lípidos de membranas, como en mitocondrias, retículo sarcoplásmico y en plasma. En la mayoría de las condiciones dietéticas, la concentración de vitamina E en los tejidos, es relativamente baja. Por ejemplo el cociente de vitamina E / lípidos en membranas puede variar de 1 : 1000 en eritrocitos a 1 : 3000 en otros tejidos y órganos (Packer, 1991), sin embargo los niveles de vitamina E en tejidos y órganos aumentan con la suplementación dietética.

Como antioxidante, la vitamina E es particularmente importante por su capacidad de transformar los radicales superóxido, hidroxilo y lipoperóxidos en formas poco reactivas. También es capaz de romper las reacciones en cadena de

lipoperoxidación que se producen como consecuencia del ataque de los radicales libres a las membranas.

Aunque la vitamina E es un eficaz captador de radicales libres, la reacción de la vitamina E con estos radicales produce una disminución funcional de la vitamina E y la formación de radicales-vitamina E. El estrés oxidativo produce una disminución significativa de los niveles tisulares de vitamina E; sin embargo el radical-vitamina E puede ser regenerado hasta su estado nativo con la cooperación de otros antioxidantes. Por lo tanto algunos investigadores postulan que la capacidad de la vitamina E para actuar como un antioxidante está relacionada sinérgicamente con otros antioxidantes que sean capaces de reciclar la vitamina E durante períodos de estrés oxidativo (Packer, 1991).

Se ha descrito, con cierta controversia, que el ejercicio induce una alteración en los niveles plasmáticos de vitamina E. Durante el ejercicio en humanos se observó un aumento en la concentración de vitamina E en plasma y en eritrocitos, sugiriendo que el ejercicio podría promover la movilización de vitamina E de los tejidos al plasma, y que el músculo esquelético podría usar la vitamina E circulante para proteger frente al daño oxidativo (Ji, 1995). Otros autores no hallaron variaciones en los niveles de vitamina E en humanos tras realizar una carrera de medio maratón (Duthie *et al.*, 1990). En jugadores de fútbol entrenados se observó que los niveles de vitamina E eran superiores (en un 10%) a los medidos en sujetos controles no entrenados (Brites *et al.*, 1999).

Los cambios en los niveles de vitamina E se aprecian mejor cuando se expresan por unidad de ubiquinona mitocondrial. La reducción de la concentración de vitamina E en el interior de la membrana mitocondrial puede justificar que la mitocondria sea muy susceptible al daño de los radicales libres. El contenido de vitamina E en el corazón sufre una pequeña disminución tras un programa de ejercicio de entrenamiento crónico en treadmill, comparada con la disminución en músculo esquelético. Las diferencias en la respuesta al entrenamiento de la vitamina E entre el corazón y el músculo esquelético se pueden explicar en parte por el alto

contenido de vitamina E en el corazón (≈ 70 nmol/g), solamente cercano al tejido adiposo marrón. (Ji, 1995). En un estudio realizado con sujetos entrenados sometidos a una única prueba de ejercicio de ultrarresistencia (Triatlón) no se observaron variaciones en las concentraciones de vitamina E en plasma antes y después de la prueba (Ginsburg *et al.*, 1996).

C) Vitamina C

La vitamina C es hidrofílica y actúa mejor en medio acuoso que la vitamina E. Como el pK_a del ácido ascórbico es 4.25, la forma predominante a pH fisiológico es el anión ascorbato. El ascorbato está muy distribuido por los tejidos en mamíferos y se encuentra en mayor concentración en las glándulas adrenal y pituitaria (Yu, 1994).

La vitamina C tiene un doble papel como antioxidante. Por un lado, puede capturar directamente radicales superóxido, hidroxilo y lipoperóxidos; y por otro lado la vitamina C juega un importante papel regenerando la vitamina E; no obstante, en el proceso de regeneración de la vitamina E se consume la forma nativa de la vitamina C, lo que da lugar a la formación del radical semiascorbilo, el cual se puede reducir hasta la vitamina C nativa mediante la acción de la NADPH-semiascorbilo reductasa o de los grupos tiol, tanto del glutatión como del ácido dihidrolipoico.

El aumento de los niveles de vitamina C puede proteger frente al daño de los radicales libres, sin embargo a altas concentraciones (aprox. 1 mM) la vitamina C actúa como prooxidante en presencia de metales de transición como Fe^{2+} o Cu^{2+} . La acción pro-oxidante del ascorbato se basa en su capacidad de reducir el Fe^{3+} hasta Fe^{2+} que es un potente inductor de radicales libres (reacción de Fenton). Por ello la administración de megadosis a través de suplementos de vitamina C ha sido cuestionada por muchos investigadores (Powers *et al.*, 1999).

Duthie *et al.*, (1990) al estudiar la respuesta antioxidante plasmática tras una carrera de medio maratón observaron un aumento en los niveles de vitamina C. Sin embargo **Ginsburg *et al.*, (1996)** en un estudio realizado con sujetos entrenados sometidos a una única prueba de ejercicio de ultrarresistencia (Triatlón) no observaron variaciones en las concentraciones plasmáticas de vitamina C antes y después de la prueba. Respecto al efecto del entrenamiento se describe un incremento en los niveles de vitamina C plasmáticos en futbolistas entrenados respecto a los individuos sedentarios (**Brites *et al.*, 1999**).

D) Ácido α -lipoico

El ácido α -lipoico también conocido como ácido tióctico, por su bajo peso molecular difunde fácilmente a través de las membranas, participa en los mecanismos de redox y por su facilidad en ceder electrones es un importante antioxidante. Tiene capacidad de regenerar las vitamina E y C. Es un cofactor de la piruvato decarboxilasa y otras enzimas del ciclo de Krebs, y se localiza en la membrana mitocondrial interna.

El ácido α -lipoico es un tiol endógeno que actúa como cofactor del complejo α -deshidrogenasa y normalmente está presente en pequeñas cantidades en tejidos animales (5 – 25 nmol/g) generalmente unido a un complejo enzimático siendo así inactivo como antioxidante , sin embargo el ácido α -lipoico exógeno libre puede ser efectivo como antioxidante y participar en la regeneración de las vitaminas E y C. Puede ser consumido a través de la dieta y no muestra efectos tóxicos conocidos. Tras la ingesta dietética, el ácido α -lipoico se reduce a ácido dihidrolipoico (DHHLA), que es un potente antioxidante frente a todas las especies oxiradicales. Además el DHHLA resulta muy eficaz en la recuperación de la vitamina C durante períodos de estrés oxidativo y puede ser un eficaz sustituto del GSH (**Packer, 1994**).

El radical-vitamina E puede ser reciclado por la vitamina C, a costa de la formación del radical-vitamina C. Este radical puede ser reducido hasta vitamina C por el DHLA, que se transforma en ácido lipoico en este proceso, y puede reconvertirse en DHLA mediante mecanismos celulares enzimáticos (Fig. 2.9.2.1).

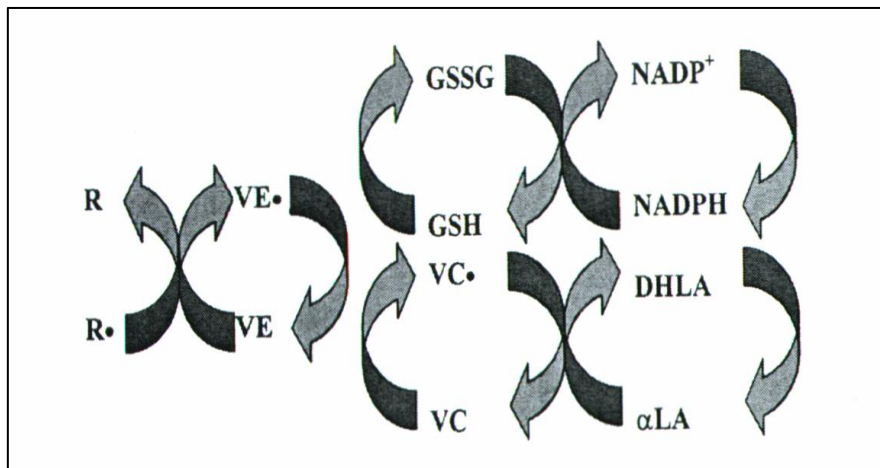


Fig. 2.10.2.1.- Interacción entre ácido α -lipoico (α -LA), glutatión (GSH) y vitamina C (VC) en la recuperación de vitamina E (VE). VC• = radical ascorbato; VE• = radical vitamina E; DHLA = ácido dihidrolipoico; GSSG = glutatión oxidado. (Powers et al., 1999. Modificado a partir de Ji, 1995)

E) Carotenoides

Los carotenoides son antioxidantes liposolubles localizados principalmente en las membranas celulares. Los carotenoides tienen una efectiva actividad antioxidante

biológica como evidencia su capacidad para reducir el índice de peroxidación lipídica inducida por sistemas generadores de radicales (Krinsky, 1982). Las propiedades antioxidantes de los carotenoides se derivan de su estructura de largas cadenas con dobles enlaces conjugados, lo que permite capturar la mayoría de ERO, incluidos los radicales superóxido y peroxilo (Yu, 1994).

Como la vitamina C, el β -caroteno puede actuar como antioxidante y como pro-oxidante. A una presión parcial de oxígeno fisiológica (< 100 mm Hg) el β -caroteno muestra una actividad capturadora de radicales, sin embargo la exposición a presiones parciales hiperóxicas (> 150 mm Hg) hace que el β -caroteno actúe como prooxidante (Palozza, 1997).

F) Ubiquinonas

Las ubiquinonas son sustancias liposolubles derivadas de las quinonas que contienen la estructura del isopreno. Las ubiquinonas naturales contienen entre 1 y 12 unidades de isopreno. La forma reducida de la ubiquinona, el ubiquinol es el que realmente tiene actividad antioxidante (Mellors *et al.*, 1996).

La forma predominante de la ubiquinona en humanos es la ubiquinona-10 (también conocida como coenzima Q). Las fuentes de ubiquinona-10 en la dieta son aceite de soja, carne, pescado, frutos secos, trigo, espinacas, berza, alubias y ajos.

La concentración de ubiquinona-10 en plasma humano varía entre 0,4 y 1 μ M y aproximadamente el 80% está presente en el estado reducido (ubiquinol). En tejidos humanos la ubiquinona-10 se encuentra en niveles relativamente altos (60-110 μ g/g) en corazón, hígado y riñón, existiendo en forma reducida entre el 70 y 100% (Aberg *et al.*, 1992).

En cuanto a su localización intracelular el 40-50% de la ubiquinona total se halla en la mitocondria, el 25-30% en el núcleo, 15-20% en el retículo sarcoplásmico y el resto (5-10%) en el citosol.

El efecto antioxidante de la ubiquinona se describió en 1966 y desde entonces numerosos trabajos han estudiado el papel antioxidante de la ubiquinona observando que sus propiedades antioxidantes derivan del anillo fenólico de su estructura. Las ubiquinonas reaccionan con los radicales del oxígeno y oxígeno singlete previniendo la peroxidación lipídica en las membranas y otras estructuras lipídicas celulares (Karlsson, 1997). También algunas ubiquinonas juegan un papel importante en la recuperación de la vitamina E durante períodos de estrés oxidativo por vía dependiente del sistema NADPH.

G) Oligoelementos : Se, Zn, Cu.

a) Selenio

El Selenio (Se) es un elemento esencial para los humanos. Se presenta en dos formas diferentes: selenometionina y selenocisteína, la forma más importante para la actividad biológica del selenio, ya que es la que se encuentra en el centro activo de las selenoproteínas. Se han identificado once selenoproteínas: cuatro formas de glutathion peroxidasa, selenoproteína P, selenoproteína W, tres tipos de yodotironina-desyodinasas, tioredoxina reductasa y selenofosfato sintetasa. Varias de estas proteínas intervienen en la defensa antioxidante del organismo contra las lesiones oxidativas. La selenoproteína P es una proteína plasmática con múltiples residuos de selenocisteína. No se conoce su función, pero se cree que podría participar en los sistemas de defensa antioxidante extracelulares del organismo o como transportador de Se. Otras selenoproteínas que podrían participar contra el estrés oxidativo son la tioredoxina reductasa y la selenoproteína W (Holben *et al.*, 1999).

La función del Se como antioxidante no sólo se debe a su papel en la glutathion-peroxidasa y otras selenoproteínas, sino también a la interacción con determinados nutrientes, como la vitamina E. La glutathion-peroxidasa reduce el

peróxido de hidrógeno, disminuyendo así la generación de radicales libres, mientras que la vitamina E está implicada en la eliminación de los productos derivados del ataque de los radicales libres a los lípidos. Se ha visto que las necesidades de Se se reducen cuando la ingesta de vitamina E está aumentada, y viceversa. Además, el Se tiene un papel directo en el reciclaje del tocoferol, ya que el radical tocoferoxilo también puede ser reducido a tocoferol por el glutatión en una reacción catalizada por una selenoenzima.

Un estudio realizado con población rural malnutrida en China demostró que un suplemento combinado de Se, vitamina E y β -caroteno reduce la mortalidad global del cáncer, pero no se han obtenido los mismos resultados en poblaciones occidentales normonutridas (Blot *et al.*, 1993).

La deficiencia de Se produce mayor susceptibilidad a las lesiones oxidativas, un incremento en la concentración de glutatión plasmático y un aumento en la actividad de la glutatión S-transferasa.

a) **Cinc**

El cinc participa en varias funciones del sistema de defensa antioxidante, pero no hay un mecanismo común a todas ellas. Su intervención en la prevención de la peroxidación lipídica podría ser a través de la enzima Cu-Zn-SOD, donde el metal tienen un papel estructural. También podría deberse a su interacción con la metalotioneína, proteína que actúa capturando radicales hidroxilo. Además el Zn estabiliza las membranas, por lo que una deficiencia de Zn puede ocasionar daños oxidativos a éstas. Los iones cinc pueden unirse a los grupos sulfidrilo de las proteínas, protegiéndolas contra la oxidación. [referencia](#)

b) **Cobre**

El cobre interviene en la defensa antioxidante a través de su papel en cuatro enzimas: la Cu-Zn-SOD intracelular, en la que el cobre tiene un papel catalítico, la SOD extracelular; la metalotioneína que une Cu, que puede tener actividad como atrapador de radicales libres; y la ceruloplasmina, que puede eliminar diferentes radicales de oxígeno protegiendo los PUFA de las membranas del daño oxidativo.

La deficiencia de cobre se ha asociado con una reducción de la actividad de la Cu-Zn-SOD y de la ceruloplasmina y un incremento del daño oxidativo en los lípidos y de los niveles de LDL oxidadas, por lo que podría incrementar el riesgo de aterosclerosis y cáncer. Sin embargo un exceso de cobre también puede ser perjudicial por el aumento en la producción de radicales de oxígeno a través de la reacción de Fenton.[referencia](#)

H) Otras sustancias con actividad antioxidante

a) El **manganeso** forma parte de la SOD mitocondrial, por lo que también es fundamental para eliminar los radicales libres que se producen en la mitocondria.

b) La **taurina** puede actuar como captador de radicales libres y oxidantes, inhibir la peroxidación lipídica y la activación de neutrófilos. Este aminoácido es muy abundante en los neutrófilos y su función como antioxidante la realiza a través de su reacción con el ácido hipocloroso. También puede formar complejos con cinc, protegiendo los tejidos de las lesiones oxidativas producidas por las ERO ([Miján de la Torre y col., 1998](#)).

c) La **melatonina** captura radicales libres y es un antioxidante que dona electrones para eliminar el radical hidroxilo y otros radicales. Se ha visto que esta molécula protege a las células, tejidos y órganos contra el daño oxidativo, sobre todo evita la oxidación del ADN, lípidos de membrana y proteínas citosólicas. Parece que también tiene algún efecto sobre las enzimas antioxidantes SOD, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y óxido nítrico sintasa. Se han realizado algunos

estudios en los que se suplementaba melatonina para proteger contra el estrés oxidativo, y se ha visto que puede ser beneficiosos, sobre todo teniendo en cuenta su baja toxicidad (Miján de la Torre y col., 1998).

d) Los aminoácidos azufrados **metionina** y **cisteína** también pueden participar, secundariamente, en la defensa antioxidante, pues permiten la síntesis *de novo* de glutatión, por lo que reducen la necesidad de reciclaje y la reducción del glutatión oxidado. La actividad de la glutatión peroxidasa puede estar disminuída por una limitación tisular de cisteína, ya que se reduce la síntesis de glutatión. La N-acetilcisteína interviene en el sistema de defensa antioxidante no sólo como precursor del glutatión, sino que también puede actuar directamente como scavenger para determinadas ERO, como el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, y como antioxidante, al proteger los grupos sulfidrilo de las proteínas (Miján de la Torre y col., 1998).

e) La **bilirrubina** y el **urato** son buenos captadores de radicales de oxígeno y el urato puede captar iones hierro, minimizando la reacción de Fenton.

f) Algunas proteínas plasmáticas pueden actuar como antioxidantes, como **ceruloplasmina**, **albúmina** y **transferrina**, que pueden secuestrar iones hierro y cobre, impidiendo su participación en la generación del radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Miján de la Torre y col., 1998).

g) La oxidación de los **flavonoides** puede proteger a los nutrientes del daño oxidativo, tanto en los alimentos como en el intestino y posiblemente también en los tejidos y en el plasma, ya que reducen la cantidad de OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y radicales peroxilo. Se ha postulado una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y riesgo de enfermedades cardiovasculares y un posible papel beneficioso en el tratamiento y prevención de estas enfermedades y cáncer (Miján de la Torre y col., 1998).

2.11.-COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias químicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se encuentran en todas las plantas superiores, localizándose principalmente en frutos y órganos aéreos jóvenes disueltos en líquidos vacuolares y se consumen diariamente en la dieta en cantidades significativas.

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados en tres grupos:

1.- **Fenoles simples y ácidos fenólicos:** Los fenoles simples incluyen monofenoles tales como el p-cresol, aislado de varios frutos, y difenoles como la hidroquinona (Mayer & Harel, 1979). El ácido gálico es un trifenol que puede aparecer en las plantas de forma soluble o como ésteres del ácido quínico o taninos hidrolizables (Okuda *et al.*, 1991). Un derivado del ácido gálico es el ácido elágico, que se libera de la pared celular a través de la hidrólisis de los elagitaninos para dar ácido hexahidroxidifénico, el que forma una dilactona espontáneamente que es el ácido elágico (Bate-Smit, 1972; Wilson & Hagerman, 1990).

2.- **Ácidos hidroxicinámicos y sus derivados:** Son ácidos casi exclusivamente derivados del ácido cafeico, p-cumárico y ferúlico, ya que el ácido sinápico es bastante raro en la naturaleza. Se encuentran generalmente en formas conjugadas como ésteres más que como glicósidos. El metabolito más importante de este grupo es el ácido clorogénico, que es un sustrato clave en el proceso de pardeamiento enzimático (Eskin, 1990)

3.- **Flavonoides:** Forman el grupo de compuestos fenólicos más importante por la gran variabilidad estructural y su presencia en la mayoría de los alimentos de origen vegetal. En los flavonoides se incluyen los siguientes tipos de compuestos:

3.1) Catequinas (Flavan 3-oles)

3.2) Proantocianidinas o taninos condensados no hidrolizables (Flavan 3,4-diol)

3.3) Antocianos

3.4) Flavonas

3.5) Flavonoles

3.6) Flavanonas

Los flavonoides poseen una alta afinidad para unirse con proteínas, otras macromoléculas biológicas (hormonas, ácidos nucleicos) y con iones divalentes de metales, así como una alta capacidad para catalizar el transporte de electrones y captar radicales libres. Estas propiedades pueden dar lugar a efectos fisiológicos muy diversos, muchos de los cuales sólo han podido ponerse de manifiesto en ensayos *in vitro*. Todos estos posibles efectos hacen de los flavonoides un grupo de sustancias con un importante potencial terapéutico, especialmente por sus propiedades antioxidantes que se relacionan con la prevención de enfermedades cardiovasculares y con algunos tipos de cáncer. Por las mismas razones, ha aumentado su interés como componentes de los alimentos y justifican su inclusión dentro del término genérico de fitoquímicos, y su papel dentro de alimentos funcionales (Rivas Gonzalo, 2002).

2.11.1.-FLAVONOIDES: ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Los flavonoides constituyen una amplia familia de compuestos que a su vez incluye varios grupos, caracterizados por poseer un esqueleto funcional C₆-C₃-C₆.

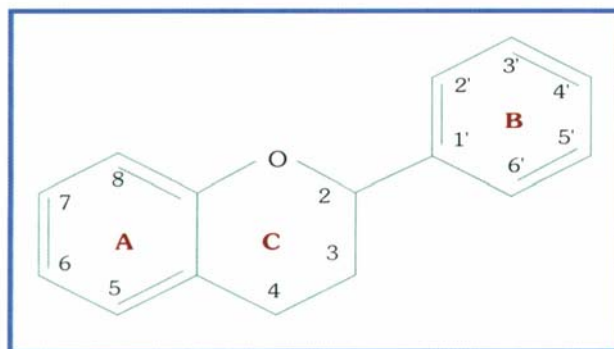


Fig. 2.11.1.1- Esqueleto estructural de los flavonoides (Rivas Gonzalo, 2002)

Estos grupos se diferencian entre sí por el grado de insaturación y sustituyentes del anillo C (Fig. 2.10.1.2.), distinguiendo entre compuestos que poseen una función cetona en el heterociclo (flavonas, flavonoles, flavanonas o dihidroflavonas y chalconas) y los que no la poseen (flavonoles y antocianinas). La existencia de un hidroxilo en posición 3 es otra característica común a antocianidinas y flavonoles. Dentro de cada grupo los compuestos se diferencian entre sí por los sustituyentes en el anillo B y por los sustituyentes en los diferentes hidroxilos de la molécula (metilos, azúcares y/o ácidos orgánicos, más habitualmente).

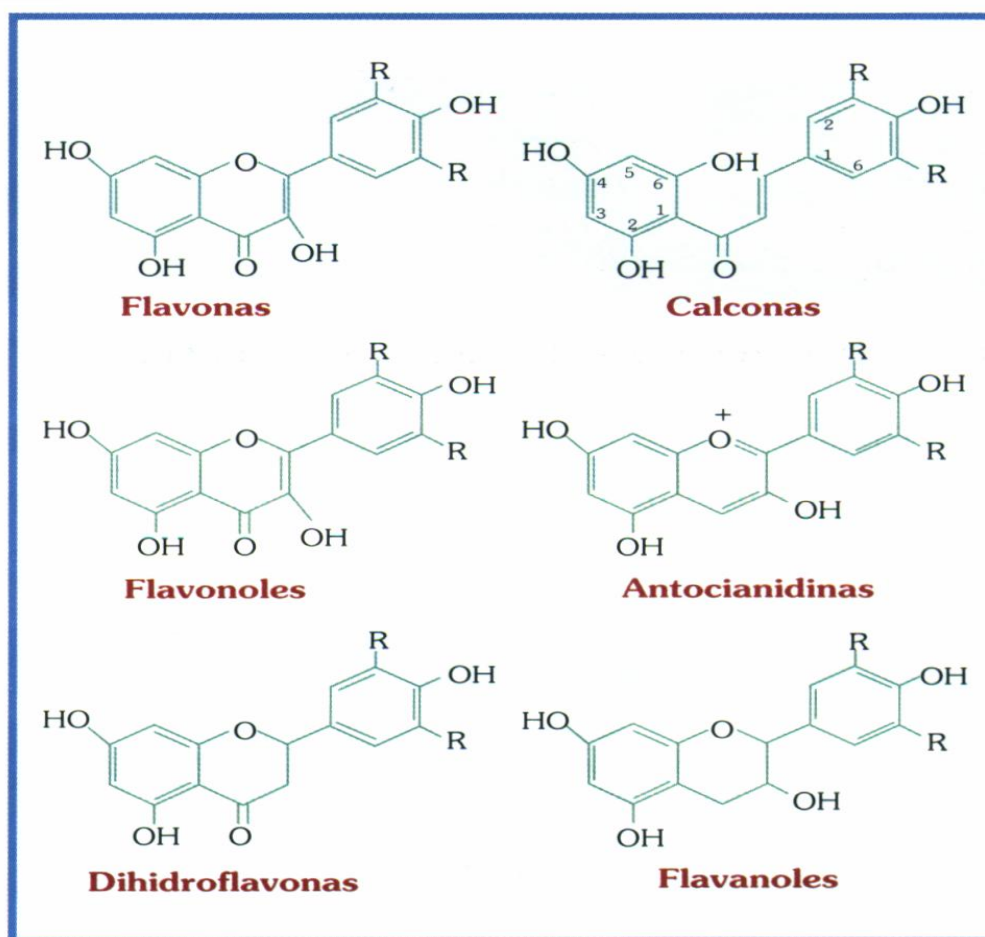


Fig. 2.11.1.2.- Estructura de distintos flavonoides

2.11.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE FLAVONOIDES

El estudio de las propiedades beneficiosas de los flavonoides se puede considerar que se inicia en 1936, tres años después de haber identificado el ácido ascórbico como vitamina C, Szent Gyorgyi avanza la noción de vitamina P como segundo factor antiescobuto. Los estudios realizados por este investigador observaron que el principio activo de esta nueva vitamina podrían ser uno o varios flavonoides, que denominó “citrina”, al haberse aislado del zumo de limón.

La actividad vitamínica de la citrina, así como el concepto de vitamina P, estuvieron desde un principio sujetos a controversia; sin embargo, rápidamente se observó que ciertos flavonoides, aún careciendo del efecto antiescorbuto, presentaban actividad sobre la permeabilidad y resistencia de los capilares sanguíneos y podían actuar como factor de economía de la vitamina C. En 1995, la Academia de las Ciencias de Nueva York decidió denominar a todos estos flavonoides con actividad biológica como “bioflavonoides”. El concepto de vitamina P fue rechazado por la FDA y se aprobó el término “sustancias con actividad vitamínica P”.

A) ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Un importante número de especies reactivas de oxígeno (como $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , NO^{\bullet} y radicales libres alquil-peroxilo) se producen regularmente en nuestro organismo. La ingestión de flavonoides en la dieta favorece los procesos de defensa fisiológicos frente al daño generado por estas ERO, a dos niveles:

- Son capaces de prevenir la formación de radicales libres, o bien,
- Actúan como captadores de estos radicales una vez formados

Actualmente las defensas antioxidantes pueden ser categorizadas en defensas primarias, constituidas por una variedad de enzimas, y defensas secundarias, que comprenden una amplia gama de enzimas, pequeñas moléculas y sustancias vegetales:

<u>Defensas-primarias</u>	<u>Defensas-secundarias</u>
Superóxidodismutasa (SOD)	Enzimas-proteolíticas
Catalasa	Enzimas-lipolíticas
Glutación peroxidasa	Enzimas reparadoras de ADN
	α -tocoferol
	Ácido-ascórbico
	Carotenoides
	Coenzima-Q
	Ácido-úrico
	Melatonina
	Polifenoles-flavonoides
	Ácido- α -lipoico
	Aminoindoles, etc.

Con estas defensas antioxidantes secundarias, es difícil determinar un mecanismo único que explique su actividad antioxidante. Sin embargo se pueden determinar tres tipos de mecanismos:

- Que la transferencia de electrones determine que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa;
- Que la transferencia de electrones determine la formación de una molécula radical antioxidante inactiva o estable;
- Que pequeñas moléculas actúen como enzimas antioxidantes (Cadenas, 1998).

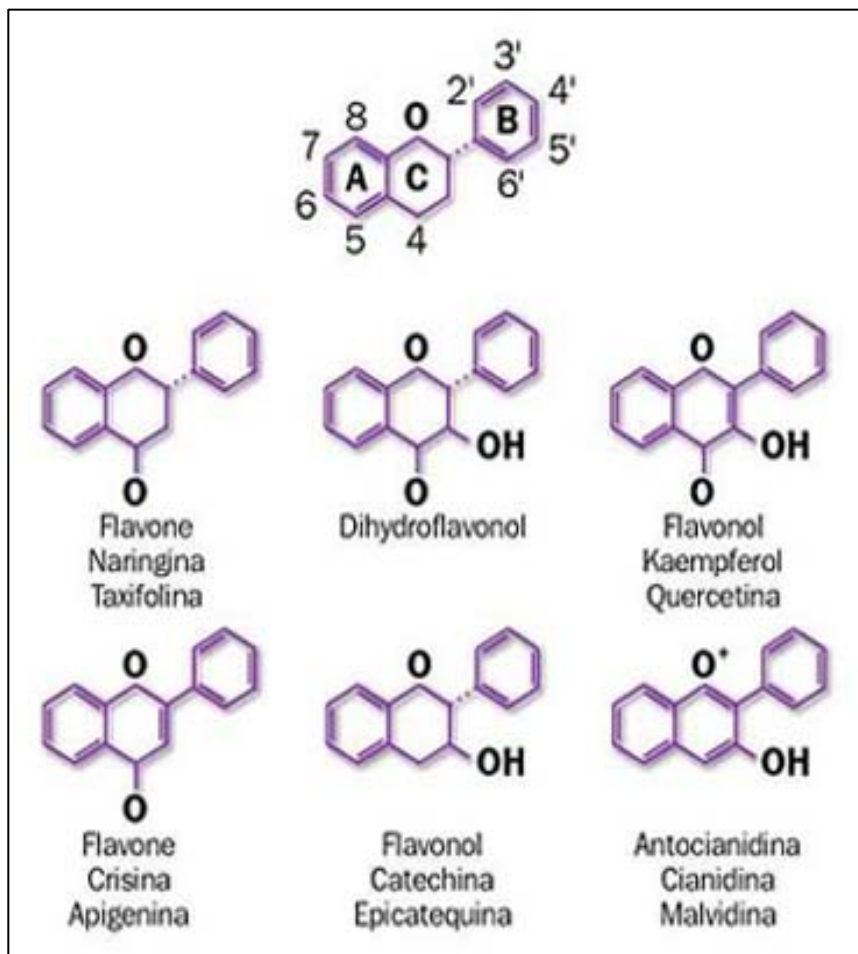


Fig. 2.11.2.1.-Estructura básica de los principales flavonoides

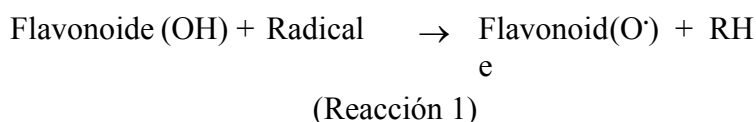
Los flavonoides suprimen el daño tisular producido por los RL sobre las células del hámster Chino V79, las células cardiovasculares humanas y las neuronas. De la misma forma, los flavonoides protegen los eritrocitos y los miocitos contra el daño producido por la hipoxia en los corazones sometidos a isquemia-reperfusión.

Los flavonoides inhiben un amplio rango de enzimas como ATPasa, aldolasa-reductasa, fosfodiesterasas, proteína tirosina-quinasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, monooxigenasa microsomal, glutatión-transferasa, y óxido nítrico sintasa (Kyriakidis *et al.*, 1986; Vernet *et al.*, 1992; Ursini *et al.*, 1994), además, los

flavonoides estimulan la SOD, como se ha observado en pacientes con cirrosis hepática en los que ejercieron una acción hepatoprotectora (Huang *et al.*, 1992).

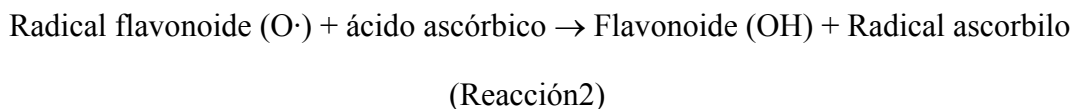
En resumen, las propiedades antioxidantes de los flavonoides radican en su acción captadora de RL y en su capacidad quelante de metales, que son la base del efecto que ejercen disminuyendo el daño oxidativo producido por los RL, a través de la inhibición de la peroxidación lipídica, la protección de las LDL contra la oxidación, la inhibición de actividades enzimáticas, y probablemente la acción antimutagénica que se le atribuye a algunos de estos compuestos.

El concepto básico de la actividad antioxidante de varios compuestos naturales y sintéticos comprende una transición redox mediante la cual la molécula antioxidante dona un electrón (o átomo de hidrógeno, equivalente a la donación de un electrón y un H⁺ al radical libre (R[•]). Durante el transcurso de esta transferencia de electrones, el carácter radical (inestabilidad), es transferido al antioxidante, formándose un antioxidante radical-derivado :



Cualquiera que sea el mecanismo inherente a los efectos antioxidantes de los flavonoides, estos compuestos –al igual que todos los antioxidantes– deben reunir dos requisitos básicos para ser considerados como tales : en primer lugar, aún a bajas concentraciones deben proteger los compuestos contra la oxidación o el daño por RL y, en segundo lugar, el radical flavonoide –radical aroxil – debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. La falta de estabilidad que pueda tener el radical aroxilo es la base del efecto prooxidante de algunos flavonoides. A su vez, el radical aroxilo puede ser recuperado por otros

antioxidantes, como el ascorbato (reacciones 1 y 2) (Kandaswami *et al.*, 1993; Bors *et al.*, 1995).



Se han fijado algunos criterios estructurales necesarios para la eficacia de la captación de radicales libres en las moléculas de flavonoides llevando a cabo los ensayos con el radical del catión ABTS 2,2'- azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS⁺), expresando los resultados como capacidad antioxidante total en equivalentes de Trolox (TEAC) (Rice Evans y Miller,1998). Entre ellos se citan:

1. La presencia de la estructura 3',4'- *o*-dihidroxi en el anillo aromático B (catecol), lo que confiere mayor estabilidad al radical formado
2. La existencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 7 del anillo A.
3. El doble enlace localizado en la posición 2,3 en conjunción con el grupo 4-oxo y 3-hidroxi del anillo C, responsables de la deslocalización desde el anillo B (los radicales peroxilos producidos son estabilizados por el efecto de resonancia de los núcleos aromáticos).
4. La existencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 con función 4-oxo en los anillos A y C, y con doble enlace entre las posiciones 2,3 generan el máximo potencial captador de radicales libres.

Se han realizado estudios cinéticos que miden las constantes de velocidad de reacción de flavonoides con radicales de nitrógeno generados por radiolisis, y sugieren que las dos características principales para el control del potencial redox son el grupo catecol en el anillo B y el doble enlace en el anillo C. La quercetina cumple todos estos requerimientos y por esta razón es un antioxidante más eficaz que la catequina, por ejemplo, que sólo cumple el primero (Rice-Evans *et al.*, 1998).

En la Tabla 2.11.2.1. Se muestran los datos de actividad antioxidante de flavonoides expresados como TEAC (Rice-Evans *et al.*, 1998).

	TEAC ⁽¹⁾
Quercetina	4,7
Epigallocatequin-30-galato	4,8
Epigallocatequina	3,8
Taxifolina	1,9
Catequina	2,4
Luteolina	2,1
Rutina	2,4
Kaempferol	1,3

(1) concentración mM de una solución de Trolox que tiene capacidad antioxidante igual a una concentración 1 mM de la sustancia problema.

Tabla 2.11.2.1.-Actividad antioxidante de algunos flavonoides

Además, las propiedades antioxidantes de los flavonoides dependen en parte de su capacidad de unirse con el hierro o el cobre (Crawford *et al.*, 1961), metales que aceleran o catalizan las reacciones químicas (de Fenton), generadoras de RL.

Los mecanismos descritos explican algunos efectos de los flavonoides, tales como la inhibición de la peroxidación lipídica, la supresión de las reacciones de RL y la inhibición de algunas enzimas. En este sentido los flavonoides actúan inhibiendo los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico, de las LDL, de los fosfolípidos de las membranas; de peroxidación de los glóbulos rojos y de la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (Ursini *et al.*, 1994; Laughton *et al.*, 1989). Estas funciones se hallan ilustradas en la Fig. 2.11.2.4.

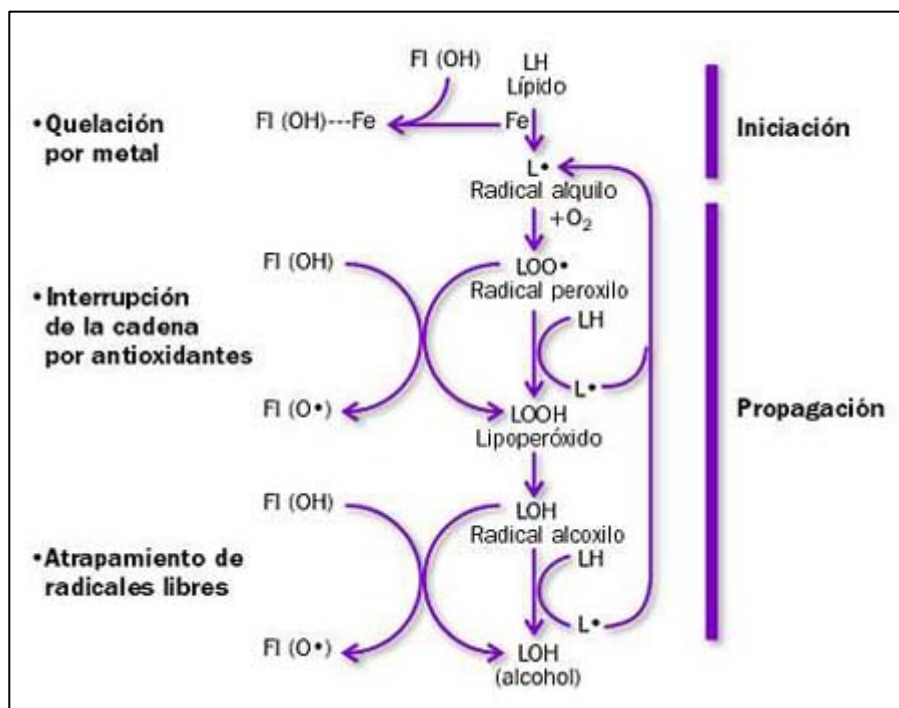
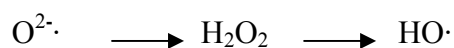


Fig. 2.11.2.4.- Diversos mecanismos de los flavonoides para inhibir los procesos de lipoperoxidación (Cadenas, 1989).

Acción prooxidante de los flavonoides

Los flavonoides no constituyen un grupo homogéneo de compuestos y las mismas propiedades que caracterizan su actividad antioxidante, determinan que tengan efectos prooxidantes. Los mecanismos moleculares que determinan la actividad de los flavonoides en ese sentido, se basan en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo redox lábil flavonoide - hierro. En el primer caso, la autooxidación del radical aroxilo genera el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, siguiendo la secuencia conocida, genera el radical hidroxilo ($HO\cdot$):



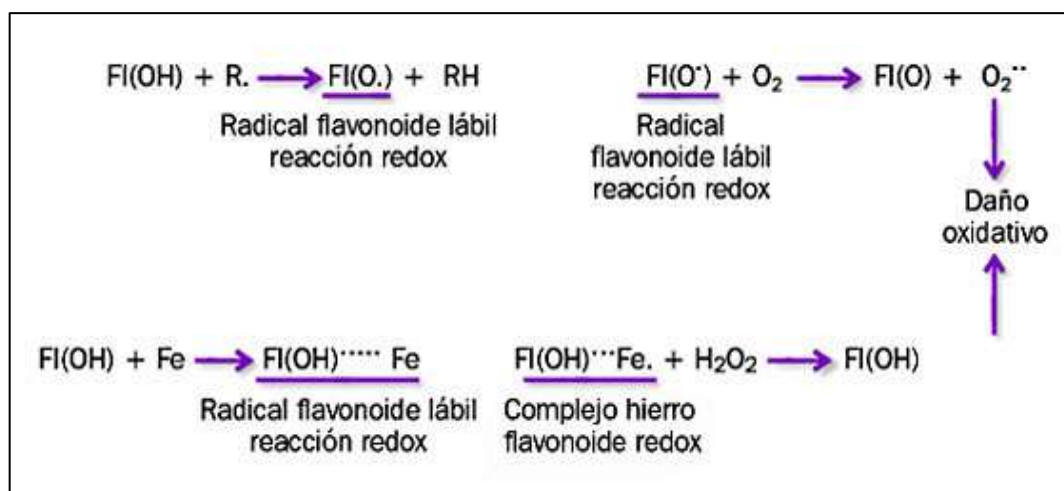


Fig. 2.11.2.5.- Mecanismos de la acción prooxidante de las flavonoides

(Cadenas, 1998)

Estos mecanismos (Fig. 2.11.2.5) pueden constituir la base de algunas acciones mutagénicas y citotóxicas de los flavonoides (Hodnick *et al.*, 1988).

Debe destacarse que las propiedades prooxidantes y mutagénicas de los flavonoides se relacionan con la acción captadora de RL que tienen estos compuestos. Sin embargo, lo que determina el carácter antioxidante o prooxidante de esta reacción inicial es, como ya se mencionó previamente, la estabilidad / labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original. La autooxidación del radical aroxilo o la formación de compuestos ternarios entre el ADN, el cobre y los flavonoides, son posibles explicaciones de la mutagenicidad mediada por los flavonoides (Ahmad *et al.*, 1992).

Generalmente, se requieren altas concentraciones de flavonoides para desarrollar mutagenicidad, ya que es en tales concentraciones cuando se genera el radical hidroxilo (HO \cdot) (Aruoma *et al.*, 1991; Laughton *et al.*, 1991).

B) RELACIÓN ESTRUCTURA -ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Existen una serie de características que determinan la efectividad de las moléculas como antioxidantes (van Acker *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1997):

1. La presencia de sustituyentes con capacidad donadora de hidrógeno/electrones, y con apropiados potenciales de reducción
2. La capacidad para deslocalizar el radical resultante
3. El potencial de quelación de metales de transición, que depende de la naturaleza y disposición de los grupos funcionales en la molécula
4. La accesibilidad del antioxidante al lugar de acción, que viene definido por el carácter lipofílico o hidrofílico o coeficiente de reparto
5. La interacción de los radicales con otras moléculas antioxidantes

En el caso de los flavonoides se cumplen los dos primeros requisitos: son antioxidantes hidrógeno donadores, en virtud de las propiedades reductoras de los múltiples grupos hidroxilos sustituyentes de los anillos aromáticos y además tienen capacidad para deslocalizar el radical resultante dentro de su estructura.

La mayoría de los problemas encontrados para cuantificar la capacidad antioxidante de los flavonoides son inherentes a las distintas formas de generar los radicales libres en los ensayos. Estos radicales pueden ser generados tanto enzimáticamente, por ejemplo por la xantina/xantina oxidasa o la reductasa, como no enzimáticamente, por un metal de transición, sólo o combinado con un agente reductor como el ascorbato. En ambos tipos de ensayos los flavonoides pueden interferir no sólo las reacciones de propagación de los radicales libres, sino también la formación de los radicales, por quelación de metales de transición o por inhibición de las enzimas involucradas en la reacción de iniciación.

2.11.3.- BIODISPONIBILIDAD DE FLAVONOIDES

La biodisponibilidad, desde el punto de vista de la nutrición, se expresa frecuentemente como la proporción de la dosis ingerida que es excretada en orina comparada con la excretada en heces. Sin embargo, los compuestos liposolubles, no serán directamente excretados en orina sino que aparecerán como metabolitos hidrosolubles. Los flavonoides no son muy solubles en disolventes orgánicos ni acuosos y generalmente se encuentran presentes en alimentos en combinaciones con azúcares en forma de glicósidos, que son más solubles que las correspondientes agliconas, y que pueden necesitar una hidrólisis enzimática de la porción glicídica mediante glicosidasas bacterianas o humanas antes de la absorción (Rechner *et al.*, 2002). La solubilidad y destino metabólico de los polifenoles debido a transformaciones endógenas y exógenas y la interacción con otros componentes de la dieta determinan la biodisponibilidad de estas sustancias (Birt *et al.*, 2001).

Principalmente basado en estudios con animales, está descrito que los flavonoides presentes en los alimentos no pueden ser absorbidos en el intestino delgado porque están en forma de glucósidos unidos a azúcares, con la excepción de las catequinas; sólo los flavonoides libres, también llamados agliconas, pueden atravesar la membrana intestinal (Ref. art de BDisponiibilidad.).

Tras la absorción de los flavonoides, los grupos hidroxilo se conjugan a través de UDP-glucuronosiltransferasas con el ácido glucurónico o por sulfotransferasas con el grupo sulfato en el hígado, y además se pueden conjugan con la glicina (Shargel *et al.*, 1992) y pueden ocurrir reacciones de metilación (Birt *et al.*, 2001). Estos conjugados son más fácilmente transportados en sangre y excretados en bilis u orina que sus correspondientes agliconas. El tipo de conjugados depende de la especie e incluso del género. Las isoflavonas, flavonoles y flavonas pueden conjugados con el ácido glucurónico en la mucosa intestinal; conjugaciones posteriores como sulfataciones pueden llevarse a cabo en el hígado (Peterson *et al.*, 1998) .

La actividad biológica de los polifenoles también se puede ver afectada por biotransformaciones en el intestino grueso tras un proceso de fermentación bacteriana, que están sujetas a una considerable variabilidad dependiendo de los individuos, debido a diferencias en la flora microbiana del colon. Los microorganismos del colon hidrolizan los conjugados y los glicósidos, lo que supone que permite la absorción de las agliconas liberadas. Por ello, los conjugados pueden ser reabsorbidos y entrar en el ciclo enterohepático. No obstante, estos microorganismos también degradan sustancialmente la mitad de los flavonoides por apertura del anillo heterocíclico. Hay tres tipos principales de apertura del anillo, dependiendo de la estructura. Éstos principalmente producen ácidos fenólicos, que son susceptibles de sufrir reacciones secundarias como β -oxidación, desmetilación y deshidroxilación. Los ácidos fenólicos son absorbidos y posteriormente son excretados por orina (Hollman, 1997).

Los primeros ensayos para determinar la biodisponibilidad de antocianidinas fueron realizados con marcadores isotópicos del tipo Carbono-14. Tras administrar una dosis oral en ratas se determinó que la absorción gastrointestinal del producto es rápida, con un pico máximo a los 45 minutos. Los tejidos que demostraron una mayor capacidad de captación fueron aquellos ricos en glicosaminoglicanos, como el existente en las paredes vasculares. La vida media fue estimada en 5 horas. El 70 % de la dosis administrada es eliminada en las primeras 24 horas: el 6 % por vía respiratoria, el 20 % por orina, 45 % por materia fecal. La eliminación biliar tarda aproximadamente 11 horas y supone el 14 % de la dosis administrada (Masquelier et al., 1979).

En un estudio reciente de Rechner *et al.*, (2002) se observa que la mayoría de los metabolitos presentes *in vivo* derivan de productos de degradación bacteriana y su posterior metabolismo en el hígado. Estos incluyen los glucurónidos de 3-hidroxifenilacético, homovalínico, isoferúlico, 3-(3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico y 3-hidroxihippúrico, como es el caso de la quercetina. Por el contrario los conjugados de polifenoles naturales, como los glucurónidos de quercetina,

naringenina y ácidos ferúlico, cafeico y sinápico se detectan en niveles muy inferiores. Los autores sugieren que estos productos de hidrólisis deben tener un papel fisiológicamente relevante como constituyentes bioactivos *in vivo*.

Otros componentes de la dieta que acompañan a los polifenoles y la matriz del alimento en que se encuentran también pueden afectar a su biodisponibilidad, por ello es necesario conocer la capacidad de extracción de los polifenoles a partir del alimento en las condiciones fisiológicas, su estabilidad y transformación a pH fisiológico, la acción de enzimas digestivas sobre estas sustancias y los tejidos vegetales en los que se hallan inmersos, etc. (Tomás-Barberán, 2003).

2.11.3.1.- FACTORES QUE AFECTAN A LA BIODISPONIBILIDAD DE FLAVONOIDES

La estructura de hidroxilación de los flavonoides determina su susceptibilidad a la degradación microbiológica en el colon y el tipo de ruptura de los productos formados:

- La ausencia de grupos hidroxilo previene la hidrólisis del anillo.
- La ausencia de hidroxilos en 5, 7 o en 4', o la presencia de un radical *o*-metil en estas posiciones reduce la susceptibilidad a la hidrólisis.
- La metilación del grupo hidroxilo en la posición 3 de la (+)catequina también incrementa la resistencia a la escisión del anillo.

La mayoría de los flavonoides de la dieta tienen una estructura polihidroxilada en las posiciones 5, 7, 3' y 4', que potenciará la división del anillo tras la hidrólisis de los glucósidos en el colon. Por ello, la hidrólisis de los glucósidos es necesaria para su absorción, y como los flavonoides de la dieta son muy susceptibles a la división del anillo sólo una pequeña fracción de las agliconas liberadas estarán disponibles para su absorción en el colon (Hollman, 1997).

Respecto al metabolismo de las antocianidinas, el glicósido de la pelargonidina (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavilio) es degradado por los microorganismos intestinales en ratas tras la administración oral, mientras que la cianidina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxiflavilio) resulta ser estable, contrariamente a lo previsto ya que por la estructura polihidroxilada de la cianidina se podría predecir una sustancial división del anillo (Hollman, 1997). En general se puede decir que los flavonoles son menos biodisponibles que las isoflavonas.

La cantidad de efectos potencialmente beneficiosos de los flavonoides justifican una minuciosa comprensión de la biodisponibilidad de estos componentes de la dieta. Esta biodisponibilidad puede ser muy diferente dependiendo del tipo de compuesto y de su estructura concreta, por ejemplo existen diferencias de biodisponibilidad ente la quercetina y la catequina dependientes del metabolismo, habiéndose demostrado que las concentraciones plasmáticas de los metabolitos de quercetina tienen una vida media más larga que los metabolitos de la catequina (Manach *et al.*, 1999). La quercetina experimenta una mayor metilación en plasma que la catequina; además los metabolitos de la catequina son unicamente glucuronidados, mientras que los metabolitos de la quercetina son tambien sulfatados (Martínez-Flores *et al.*, 2002). Estos factores podrían afectar a la solubilidad de los metabolitos en los fluidos orgánicos y ser responsables de la diferente via de eliminación de ambos flavonoides, ya que la catequina se elimina fundamentalmente por la orina mientras que la quercetina se elimina por la bilis (Manach *et al.*, 1999). Estas sustancias se pueden encontrar en plasma en concentraciones micromolares y los efectos biológicos de estos compuestos se deberían estudiar dentro de este rango de concentraciones para que tengan relevancia nutricional.

Se precisan métodos analíticos muy selectivos y sensitivos para determinar los flavonoides y sus metabolitos en sangre, plasma, orina y tejidos; que permitirán conocer la absorción, distribución, metabolismo y excreción en humanos para valorar su actividad en determinadas situaciones en el organismo (Hollman, 1997).

2.11.4.- ANTOCIANOS

Entre los pigmentos naturales, los antocianos son un tipo de flavonoides solubles en agua, etanol y metanol e insolubles en disolventes lipídicos. Los antocianos contribuyen a los colores atractivos naranjas, escarlatas, malvas y azules (Harborne, 1973). Se encuentran en el reino vegetal desde la aparición de la floración de las plantas, hace unos cien millones de años, pero el hombre solamente los ha investigado con detalle desde el principio del siglo XX, por lo que continúan proporcionando un desafío a los investigadores, debido a la variación química intrínseca y a la complejidad de su biosíntesis, metabolismo, actividad biológica y regulación (Timberlake and Bridle, 1980). En la naturaleza se presentan en forma de heterósidos, cuyo aglucón (o antocianidina) es un derivado del catión flavilio o 2-fenilbenzopirilio, diversamente hidroxilado (Fig. 2.10.4.1)

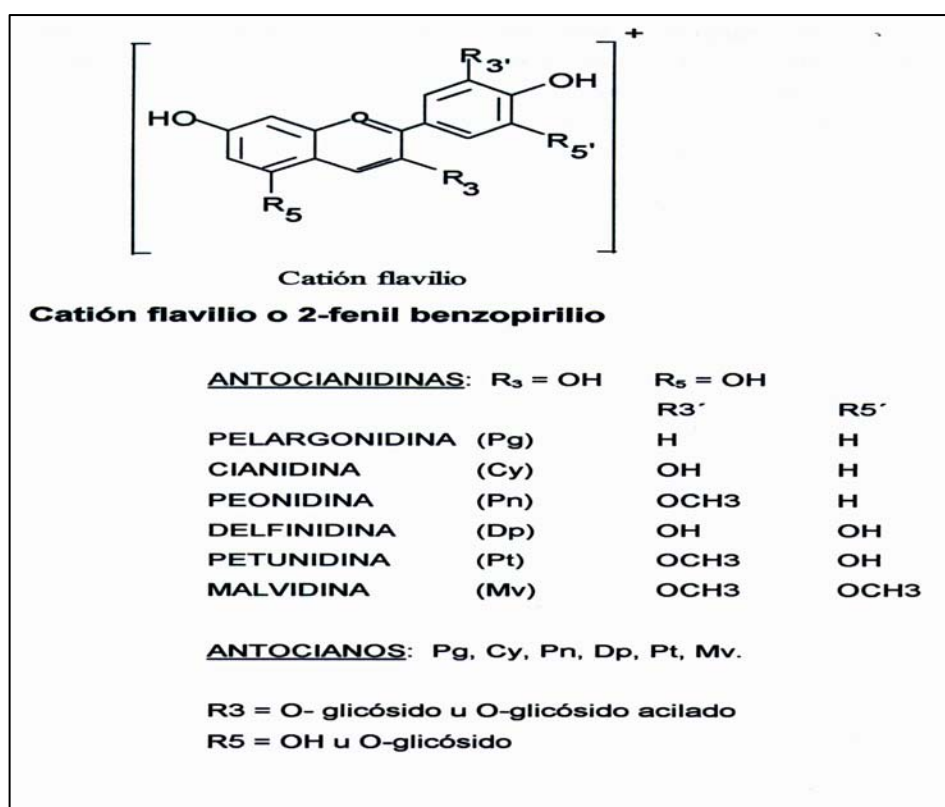


Fig. 2.11.4.1.- Estructura del catión flavilio o 2-fenilbenzopirilio y principales antocianidinas

Los antocianos se diferencian del resto de los flavonoides en que en medio ácido se encuentran en forma de cationes que se estabilizan por resonancia con numerosas formas mesoméricas. Como consecuencia de esta estructura presentan propiedades especiales de color.

Hay 6 antocianos mayoritarios en la naturaleza cuyas estructuras se diferencian entre sí por los sustituyentes que presentan en su anillo bencénico lateral o anillo B. La aglicona, se encuentra unida a una o varias moléculas de azúcar, que a su vez, pueden estar o no esterificadas con diferentes ácidos orgánicos.

Entre los azúcares que pueden ir unidos a la aglicona los más frecuentes por orden de importancia en la naturaleza son: glucosa, ramnosa, xilosa galactosa, arabinosa y fructosa. Normalmente estos azúcares se encuentran unidos al aglucón como monosacáridos, pero también pueden estar como di- o trisacáridos. Las posiciones más frecuentes de unión de los azúcares al aglucón son : 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. Cuando el aglucón lleva un sólo azúcar éste se suele encontrar en la posición 3, cuando hay dos uno de ellos ocupa la posición 3 y el otro suele colocarse en la posición 5, y, adicionalmente en 7, 3', 4' o 5'.

Los restos ácidos que más frecuentemente forman parte de las moléculas de antocianos son: ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido sinápico, ácido malónico, ácido acético, ácido succínico, ácido oxálico y ácido málico. Estos ácidos se unen a la posición 6 de la molécula de azúcar. También se han descrito antocianos con cadenas del tipo azúcar-grupo acilado-azúcar y con estructuras poliaciladas.

Los antocianos son muy reactivos en diferentes condiciones (pH, temperatura, en presencia de oxígeno, de dióxido de azufre, de compuestos carbonílicos, de metales, etc.) lo que hace que no sean muy estables y, consecuentemente, se modifiquen sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Desde el punto de vista del color, son interesantes las interacciones que tienen con otros compuestos, especialmente con otros polifenoles (ácidos fenólicos, flavanoles o flavonas), para producir fenómenos de copigmentación que tienen como resultado las variaciones en el tono y la intensidad propios de los antocianos implicados (Rivas-Gonzalo *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista de sus propiedades biológicas, las reacciones de condensación que se producen con otros sustratos (aldehídos, flavanoles,...) pueden cambiar la actividad al modificar la estructura del flavonoide .

En la alimentación humana, son importantes fuentes de antocianos las frutas rojas (uvas, arándanos, fresas, grosellas, ciruelas, cerezas, etc.), aunque es posible encontrarlos en legumbres (judías pintas), hortalizas (cebolla, rábano) y verduras (repollo, lombarda). Se localizan principalmente en aquellas partes de la planta vinculadas a la perpetuación de la especie (flores y frutos).

Las antocianidinas y sus derivados protegen frente a los oxidantes a través de numerosos mecanismos. Rice-Evans, (1995) afirmó que los antocianos son 4 veces más potentes como antioxidantes que la vitamina E. En otros estudios con animales se observó que los antocianos protegen de la oxidación a los lípidos de la membrana celular de una gran variedad de sustancias perjudiciales (Tsuda, 1998). Los antocianos encontrados en la mayoría de las antocianidinas de origen frutal ejercen una función como potentes antioxidantes “in vivo”, según recientes estudios japoneses en animales (Tsuda, 2000a). La pelargonidina protege al aminoácido tirosina del oxidante peroxinitrito, altamente reactivo (Tsuda., 2000b).

Los antocianos tienen propiedades antiinflamatorias sobre el tejido conectivo y el sistema nervioso: durante la inflamación, las enzimas dañan los capilares en el tejido conectivo, provocando la salida de sangre a los tejidos circundantes, donde se liberan los oxidantes que dañan los vasos sanguíneos. Las experiencias con animales han demostrado que la suplementación con antocianos previene la inflamación y el

daño en los capilares (Bertuglia *et al.*, 1995). Investigadores búlgaros administraron a animales histamina y serotonina, provocando reacciones alérgicas con aumento de permeabilidad vascular. Cuando estos animales fueron suplementados con una variedad de flavonoides se observó que los antocianos tenían el mayor efecto antiinflamatorio. Demostraron así que los antocianos protegen la integridad de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Borissova *et al.*, 1994). En un estudio realizado en la Universidad de Boston se observó que los antocianos de la baya del sauce previenen la oxidación del peróxido de hidrógeno y de otros oxidantes en las membranas de las células endoteliales (Tsuda, 1998). El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo, previniendo la nitración de la tirosina, la pelargonidina protege frente a las enfermedades neurodegenerativas. Los suplementos con arándanos (muy ricos en antocianos) en animales han resultado tener efectos beneficiosos en la prevención de las deficiencias neurológicas relacionadas con la edad (Joseph, 1999).

Los antocianos también presentan propiedades vasodilatadoras. En un ensayo realizado con las aortas de animales tratados con norepinefrina, la presencia de delfinidina relajó la aorta un 89 %, mientras que la malvidina se mostró ineficaz. Por tanto la delfinidina se podría relacionar con la reducción de la mortalidad cardiovascular atribuida al vino y las frutas (Andriambeloson, 1998).

Los antocianos también previenen la oxidación de las LDL relacionada con la formación de placas de ateroma (Wang *et al.*, 2000). En un estudio europeo los investigadores encontraron que en 55 mujeres con retraso en el crecimiento intrauterino (índice de crecimiento fetal disminuido) que tomaron antocianos disminuyeron los niveles de LDL oxidadas, mientras que los niveles de LDL oxidadas aumentaron en el grupo control (Pawlowicz, 2000).

2.11.4.1.- FACTORES QUE AFECTAN A LA ESTABILIDAD DE LOS ANTOCIANOS EN ALIMENTOS

El núcleo flavilio de los antocianos es deficiente en electrones, y por tanto, muy reactivo, lo que confiere a estos pigmentos una baja estabilidad tanto en los tejidos vivos, como en los productos procesados derivados de ellos (Markakis, 1982). Estas reacciones generalmente suponen la decoloración de los mismos y casi siempre son indeseables en el procesado de frutas y hortalizas. La degradación puede ocurrir durante la extracción, purificación, procesado normal de los alimentos y almacenamiento. El conocimiento de los factores que afectan a la estabilidad de los antocianos y los mecanismos de su degradación, es vital para la eficiente extracción-purificación de los antocianos y su uso como aditivos de los alimentos.

Los principales factores que influyen en la estabilidad de los antocianos son : pH, temperatura, y la presencia de oxígeno y luz, pero la degradación enzimática y las interacciones con otros componentes de los alimentos (por ejemplo el ácido ascórbico, metales, azúcares, copigmentos) son menos importantes.

La velocidad de degradación de los antocianos depende del pH y es rápida a valores elevados de pH. También se relaciona la velocidad de degradación con la cantidad de pigmento existente en forma de pseudo-base carbinol incolora y es dependiente de la temperatura.

Seguidamente se exponen los factores físico-químicos más importantes implicados en la degradación de los antocianos, concretamente los relacionando con su estabilidad a diferentes temperaturas durante el almacenamiento.

a) Estructura química

No todos los antocianos presentan la misma resistencia a los efectos degradantes de los distintos agentes. Diversos autores han comprobado que los antocianos diglucósidos son mucho más estables a la decoloración por efecto de la luz y el calor que los monoglucósidos, y que estos últimos son mucho menos propensos al pardeamiento (Francis, 1989). Hrazdina *et al.* (1970) confirmaron que la estabilidad de los antocianos 3,5-diglucósidos de la uva, se incrementaba al aumentar el grado de metoxilación, pero disminuía al incrementarse el grado de hidroxilación de las agliconas.

Asimismo, los grupos hidroxilo y metoxilo, los azúcares y azúcares acilados tienen un marcado efecto en la intensidad del color y en la estabilidad de los antocianos (Brouillard, 1982; Mazza y Brouillard, 1987).

b) Temperatura y Tiempo de almacenamiento

El efecto de la temperatura en la estabilidad de los antocianos en los sistemas modelo y en productos alimenticios ha sido estudiado por numerosos investigadores, entre los que destacan los trabajos realizados por Nebeski *et al.* (1949), Adams & Ongley (1972). Markakis (1974) reunió la opinión de todos ellos, concluyendo que los pigmentos antocianos son fácilmente destruidos por el calor durante el procesado y almacenamiento de los alimentos.

Posteriormente Havlikova y Mikova (1985) y Shenoy (1993) señalaron que se produce un incremento logarítmico de la destrucción de los antocianos con un aumento aritmético de la temperatura. Otros investigadores (Calvi & Francis, 1978; Maccarone *et al.*, 1985) apuntaron que la velocidad de degradación se duplica por cada diez grados de aumento de temperatura. No se ha conseguido aclarar completamente el mecanismo exacto por el que se produce la degradación de los

antocianos en sistemas acuosos, si bien, [Markakis et al \(1957\)](#), apuntaron que el primer paso de la degradación era la apertura del anillo heterocíclico y la formación de una chalcona.

Con pocas excepciones, la degradación de antocianos sigue una cinética de primer orden. El mecanismo de degradación de los antocianos parece ser dependiente de la temperatura. Se ha demostrado que la concentración de pigmentos poliméricos se incrementa con la temperatura y con el tiempo de almacenamiento, y contribuyen a la coloración de zumos, mermeladas y vino tinto ([Somers, 1971](#); [Bakker and Timberlake, 1986](#)). Varios autores han recomendado un tratamiento de alta temperatura durante corto tiempo para alcanzar la máxima retención de pigmentos antociánicos en alimentos procesados. El tiempo corto puede ser suficiente para prevenir una degradación significativa de los antocianos y/o transformaciones a especies incoloras (([Markakis et al., 1957](#); [Adams and Ongley, 1973a,b](#); [Rommel et al., 1992](#)).

La degradación de antocianos es pH-independiente en condiciones anaerobias ([Adams, 1972](#)), sin embargo, en presencia de oxígeno el incremento de las sustituciones metoxilo, glicoxilo y/o acilo, generalmente conduce a un incremento en el pH, en el que se produce la máxima estabilidad térmica ([Hrazdina et al. 1970](#), [Calvi y Francis, 1978](#)); la desprotonación del catión flavilio por un solvente es una reacción exotérmica ($AH^+ \rightarrow A \rightarrow A^-$), mientras que la hidratación del catión ($AH^+ \rightarrow C$) y la apertura del anillo pirilio son ambas reacciones endotérmicas y están asociadas a un cambio de entropía positiva ([Brouillard and Delaporte, 1977](#)). Por eso, a menos que características estructurales de otros factores logren revertir el equilibrio hacia la formación del catión flavilio o la base quinoidal, el incremento de la temperatura favorece la formación de la chalcona (por ejemplo durante el almacenamiento y el procesado).

El efecto de la temperatura se debe a dos factores fisico-químicos:

1.- La propia naturaleza endotérmica de la reacción de equilibrio de la estructura del antociano que se desplaza desde el catión flavilio (rojo) hacia la forma chalcona (incolora (Timberlake,1980) (Figura 2.10.4.1.1.)

2.- La influencia en la disociación del complejo catión flavilio-copigmento y de las condensaciones mediadas por acetaldehído.

Por lo que a medida que se incrementa la temperatura de almacenamiento la concentración del color rojo disminuye debido a una disminución de la concentración del catión flavilio y a una disociación de los complejos antociano-copigmento.

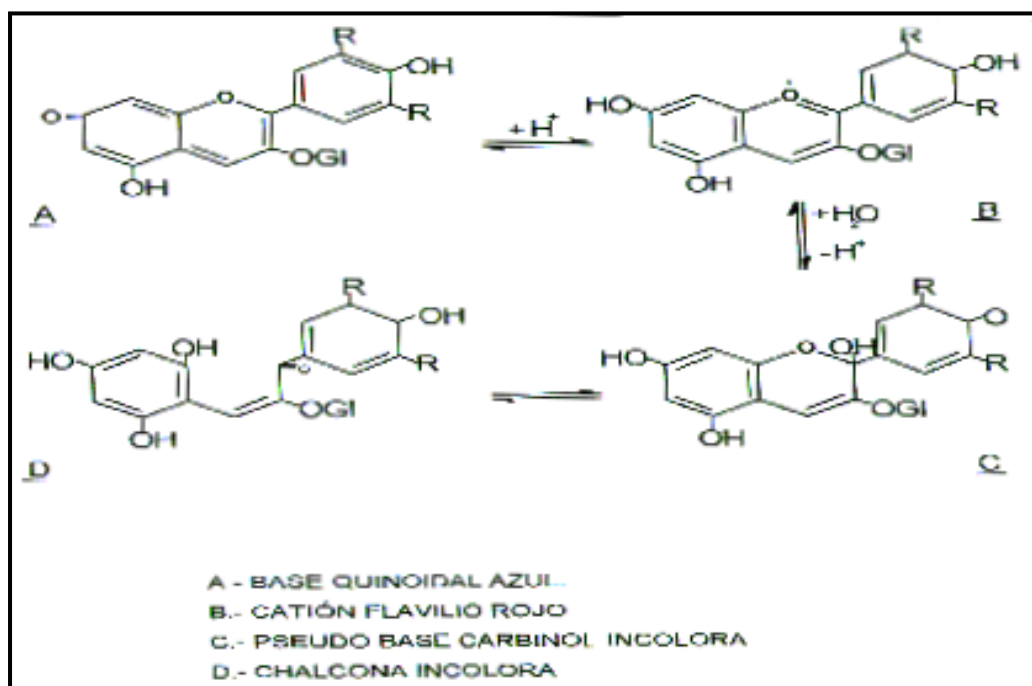


Figura 2.10.4.1.1.- Transformaciones de la estructura de la malvidina 3-glucósido con el pH (Brouillard y Delaporte, 1977)

2.10.4.2.- ANTOCIANIDINAS: COMPARACIÓN CON FLAVONOLES E INFLUENCIA DE LA GLICOSILACIÓN

En un estudio de [Elliot \(1992\)](#) se observó que el poder antioxidante de las antocianidinas fue el mayor entre 150 flavonoides estudiados (de los aproximadamente 4000 flavonoides identificados hasta la actualidad).

La mayor capacidad antioxidante de antocianidinas y antocianos la proporciona la estructura *o*-dihidroxi del anillo B, como en la cianidina, con un valor de TEAC de 4,0 mM, similar al de la quercetina, que posee también cinco grupos hidroxilos. Si quitamos el grupo 3'-OH del anillo B, como en pelargonidina, se reduce el valor a 1,3 mM, valor comparable con el del kaempferol, lo que demuestra la contribución del grupo 5,7-dihidroxi del anillo A. La glicosilación del grupo hidroxilo en posición 3 como en keracianina, el rutinósido de la cianidina, disminuye la actividad antioxidante a 3,2 mM. La sustitución de cianidina con grupos metoxi en posiciones 3' y 5' proporciona una actividad antioxidante de 2,1 mM. La glicosilación de la posición 3, da lugar a una pequeña disminución del poder reductor, probablemente debido a que esta agrupación no contribuye significativamente sin la presencia de *o*-dihidroxi en el anillo B. [referencia](#)

Actividad antioxidante en frutas

Las frutas tienen propiedades antioxidantes debido a la presencia de diversos compuestos como vitaminas C y E, β -caroteno y flavonoides, principalmente.

Estos compuestos aislados tienen también actividad *in vivo*, pero es difícil evaluar su contribución porque no se consumen aislados, sino combinados. Este es el principal motivo por el que no existe demasiada bibliografía sobre este tema. Además los extractos utilizados como muestras pueden tener diferentes propiedades antioxidantes dependiendo del ensayo realizado, de los diferentes parámetros cuantificados y de la forma de expresar los resultados ([Cao et al., 1997](#)).

Rivas Gonzalo *et al.*, (2002) determinaron la actividad antioxidante de 28 muestras de frutas frente a dos sustratos de diferente naturaleza: en un medio lipídico (método de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico, TBARS) y en un medio hidrosoluble (método TEAC), frecuentemente usados para tal fin. Los resultados obtenidos tras la aplicación del ensayo de la peroxidación lipídica, muestran la mayor capacidad antioxidante de los extractos de frutas con elevado contenido en antocianos como fresas, frambuesas, cerezas, moras y arándanos. Sin embargo, otras muestras como granada, grosella y uva tinta, que también poseen antocianos no presentaron una actividad tan elevada. Las frutas con menor capacidad antioxidante fueron plátano, uva moscatel, kiwi, y aguacate. La realización del método TEAC mostró que las muestras con mayor capacidad antioxidante en medio acuoso eran caqui (debido posiblemente a su elevado contenido en compuestos galoilados), mora y arándano; y las de menor contenido antioxidante eran el aguacate, la breva verde y la pera blanquilla. Cuando se relacionan los resultados de ambos métodos se observa que, en general, las frutas de coloración roja como la fresa, el arándano y la mora son las que presentan mayor capacidad antioxidante tanto en medio acuoso como lipídico (Rivas Gonzalo *et al.*, 2002).

Las uvas negras, frambuesas y grosellas, componentes de la bebida que se estudia, se caracterizan por poseer antocianos de forma mayoritaria respecto al resto de las sustancias fenólicas.

Efectos adversos - tóxicos de antocianidinas

Las antocianidinas han sido testadas en diferentes pruebas de toxicidad aguda y crónica, demostrando una alta seguridad. La dosis letal 50 (DL₅₀) fue calculada en ratas y cobayas, siendo la misma de 4.000 mg/Kg. La administración oral de 60 mg/Kg diarios de antocianidinas durante 6 meses a ratas y durante 12 meses a perros no produjo efectos tóxicos, teratogénicos ni mutagénicos (Bertelli, 1982)

CAPÍTULO III

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE UNA BEBIDA DE REPOSICIÓN CON COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

*“Se pueden aprender muchos procedimientos para investigar,
pero eso sirve de muy poco si no se ha aprendido a pensar”
(Ezequiel And er-Egg)*

CAPÍTULO III.- PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE UNA BEBIDA DE REPOSICIÓN RICA EN ANTIOXIDANTES

3.1.- COMPOSICIÓN DE LA BEBIDA

Para el diseño de la bebida se recurrió a las últimas novedades de consenso en la elaboración de bebidas de reposición, especialmente la publicación del “Report of the Scientific Committee on Food on composition and specification of food intended to meet the expenditure of intense muscular effort, especially for sportsmen” (28 february, 2001) aunque con la importante novedad, en comparación con otras fórmulas existentes en el mercado, de emplear zumos de frutas rojas ricas en antioxidantes del tipo de los compuestos fenólicos. Se han superado complejas etapas de desarrollo para diseñar la fórmula de esta bebida, como:

- La utilización de zumo como base de esta bebida supone la selección de las frutas más adecuadas para obtener un sabor agradable, sin comprometer la concentración final de solutos que determina la osmolaridad.
- La obtención de concentraciones relativas apropiadas que consigan una solución de compromiso entre una alta disponibilidad de carbohidratos y minerales y la osmolaridad resultante deseada.
- La adición de proteína, que supone problemas de solubilidad relacionados con el pH resultante, dando lugar a precipitados que no contribuyen a la estabilidad del producto.

La composición de la bebida del estudio, cuyos ingredientes son agua y zumo de frutas (20%), incluye uva (8%), frambuesa (6%) y grosella (6%) (procedentes de concentrado), maltodextrina, vitamina B₁, pectina, proteína láctea, citrato sódico, ácido ascórbico, cloruro sódico, edulcorantes (ciclato sódico y sacarina sódica) y

aroma. Todo ello con una osmolaridad de 318 mOsmol/L. En la siguiente tabla se muestra la composición nutricional de la bebida:

Tabla 3.1.1.- Composición nutricional de la bebida: Componentes nutritivos por 100 ml de bebida.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL DE LA BEBIDA	
Valor energético	180 KJ 42 Kcal
Proteínas	0.3 g
Hidratos de Carbono	10.4 g
Grasas	0,0 g
Sodio	102.9 mg
Potasio	18 mg
Cloruros	37.9 mg

Los flavonoides son los compuestos fenólicos mayoritarios que están presentes en la composición de la bebida y pertenecen al grupo de los fitoquímicos. Se trata de sustancias derivadas de los vegetales, con acción potencialmente beneficiosa para la salud. En este sentido, los flavonoides han mostrado su eficiencia para prevenir los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico, la oxidación de las LDL, de los fosfolípidos de las membranas, de la peroxidación de los glóbulos rojos y de la autooxidación de los homogeneizados de cerebro. Es posible que estas funciones de los flavonoides se deban a su capacidad quelante de metales, y captadora de RL (Ursini *et al.* 1994; Laughton *et al.* 1989)

Los objetivos de este capítulo son:

- Analizar la composición de compuestos fenólicos de la bebida y
- Determinar el efecto del almacenamiento a distintas temperaturas sobre la capacidad antioxidante de la bebida de reposición diseñada para deportistas.

3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.- Materiales y Reactivos:

El análisis de los polifenoles se realiza mediante inyección directa de la bebida recién fabricada, en un equipo de HPLC (Merck-Hitachi) equipado con una bomba L-7100 (Merck), un detector DAD y empleando una columna de fase reversa Lichrochart 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany) (25 x 0.4 cm, con un tamaño de partícula de 5 μ m).

Se analiza la capacidad antioxidante de la bebida (de un mismo lote de fabricación) en tres bloques, conservando cada uno de ellos en oscuridad y a diferentes temperaturas: 20°C, 30°C y 37°C. Las medidas de la capacidad antioxidante de la bebida se realizan durante 1 año de almacenamiento, por triplicado, en un espectrofotómetro Varian, mod. Cary Bio-50 UV-Vis. Los reactivos utilizados son:

1.- Tampón acetato: 0,082 g de acetato sódico, disolver en agua destilada en c.s.p. 100 ml de disolución. En agitación constante, adicionar HCl 0,5 N hasta obtener pH= 5 - 5,5.

2.- Solución stock de ABTS: 0,055 g ABTS (Sigma) + 10 ml agua destilada. Agitar y guardar en frío protegido de la luz. Así se conserva durante 1 semana.

3.- Solución para generar ABTS*: 5 ml agua dest. + 500 μ l Tampón Acetato + 500 μ l de Solución stock ABTS + 500 mg MnO₂. La solución se filtra con ayuda de una jeringa y filtro de 45 μ m PTFE Membrane (PURADISC TM 25 TF). Así preparada tiene un color verde azulado y es estable 24 h.

4.- Solución madre de Trolox (10.000 μ M): 25 mg de Trolox en 10 ml de metanol. A partir de ésta se preparan las soluciones de la curva patrón.

5.- Muestra: la bebida se diluye en agua destilada (1:1, v/v).

3.2.2.- Procedimientos:

- **Extracción de los compuestos fenólicos de la bebida.-** Los compuestos fenólicos de la bebida se cuantifican directamente mediante el análisis de la bebida por HPLC una vez filtrada a través de una membrana Type Millex HV13 (Millipore Corp, Bedford, MA, USA) de 0.45 μm de tamaño de poro

- **Análisis de los compuestos fenólicos de la bebida por HPLC.-** 20 μl de muestra se analizan por cromatografía líquida en un aparato HPLC Merck-Hitachi con una bomba L-7100 y empleando una columna de fase reversa Lichrochart 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany) (25 x 0.4 cm, con un tamaño de partícula de 5 μm) utilizando como fase móvil agua para HPLC con 5% de ácido fórmico (solvente A) y metanol (solvente B). La elución se realiza con una velocidad de flujo de 1 ml/min empleando el gradiente que se especifica a continuación: 2% B inicial, incremento a 32% de B en 30 min., 40% de B a los 40 min. y 95% de B a los 50 minutos, retorno a las condiciones iniciales a los 55 minutos y dejando un tiempo de acondicionamiento de la columna de 10 minutos. Todos los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan como valores medios \pm desviación estándar.

Los diferentes compuestos fueron caracterizados por comparación cromatográfica con patrones comerciales y por su espectro visible registrado con el detector de red de diodos. Los antocianos se cuantificaron como cianidina 3-rutinósido a 510 nm, los derivados del ácido hidroxicinámico se cuantificaron a 320 nm como ác. clorogénico y los flavonoles a 360 nm, como rutina.

- **Análisis de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).**- La concentración de fenoles totales de la bebida se ha determinado con el reactivo Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar. 40 μl de la bebida, 500 μL de Folin-Ciocalteu, 2 mL de carbonato sódico al 20% y agua destilada hasta un volumen de 10 mL. La solución se

homogeniza por agitación y se procede a la medida al cabo de 30 min. La absorbancia se mide a 765 nm y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico. El análisis se ha realizado por triplicado y los resultado se expresan como valores medios \pm SD.

• **Análisis de la Capacidad Antioxidante Total de la bebida.**- La capacidad captadora (neutralizadora) de radicales libres de la bebida se evalúa haciendo reaccionar la muestra problema (bebida rica en antioxidantes) con el radical ABTS* (Espín *et al.*,2000).

La capacidad antioxidante (CAT) de la bebida hace disminuir la concentración de ABTS*, y por tanto del color verde que presenta este radical, a lo largo del tiempo. Esta disminución, que se mide por lecturas de Absorbancia a 414 nm., depende de la concentración de antioxidantes presentes en la bebida, ya que la concentración de radical (ABTS*) es constante en todas las determinaciones.

La CAT de la bebida se expresa referida a la CAT del Trolox, un derivado hidrosoluble de la vitamina E, y los resultados de la capacidad antioxidante se expresan como Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC).

Se prepara una solución que actuará de solución blanco, con 900 μ l agua destilada. A ésta se adicionan 100 μ l ABTS* para conseguir una Absorbancia inicial $A_i = 1-1.1$, que se mide a 414 nm.

Para obtener la curva patrón de Trolox se mezclan 900 μ l agua destilada, 100 μ l ABTS* y 5 μ l solución de Trolox de distintas concentraciones conocidas.

La medición de la muestra se lleva a cabo mezclando 900 μ l agua destilada, 100 μ l ABTS* y 5 μ l bebida diluida. Se usa la bebida diluida en agua destilada (1:1), para que la disminución sea gradual en el tiempo, y no instantánea; de este modo se obtiene una representación de tipo cinético. La lectura al adicionar la muestra ha de ser inmediata y se mantiene durante 60 min., la absorbancia en el minuto 60 (A_f) es la que se usa para obtener los resultados.

3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Análisis de la concentración inicial de compuestos fenólicos de la bebida:

Tabla 3.3.1.- Análisis de los compuestos fenólicos de la bebida

Compuestos fenólicos en la bebida	mg/L
Antocianos	758.6
Flavonoles	80.5
Dvdos. hidroxicinámicos	245.7
Estilbenos	10
Ácido elálgico	167.7
Totales	1262.5

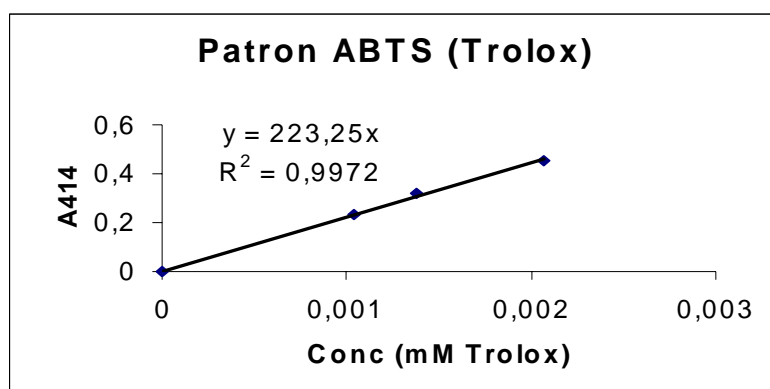
Los compuestos fenólicos mayoritarios de la bebida son los antocianos y los derivados hidroxicinámicos.

2.- El análisis de los compuestos fenólicos totales de la bebida por el método Folin-Ciocalteu es de 1.43 ± 0.1 g/L, este valor es superior al observado cuando cuantificamos los compuestos individualmente, ya que existen otros compuestos fenólicos no identificados que contribuyen al perfil fenólico total.

3.- Capacidad antioxidante:

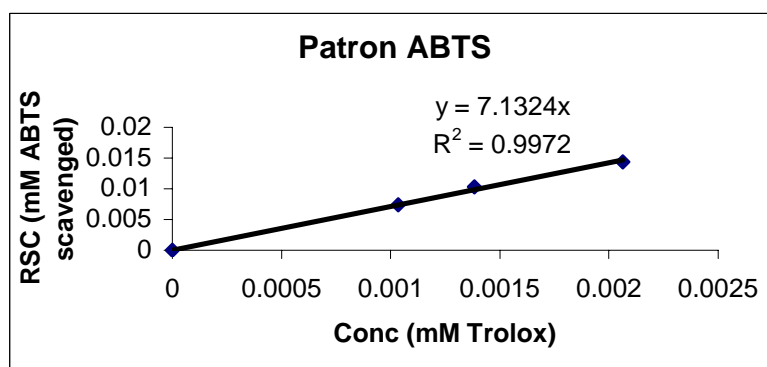
Curva patrón: Se establece la ecuación de la recta a partir de la cual se calculará la TEAC. Para cada muestra se calcula $(A_i - A_f) \cdot 2$, y este dato se sustituye en la ecuación de la recta (A) para obtener la TEAC (mM Trolox).

(A)



Para expresar la capacidad antioxidante de la muestra como RSC (Capacidad Captadora de Radicales), se sustituye el valor obtenido en (A), en la ecuación de (B):

(B)



En los resultados obtenidos se puede observar (Fig. 3.3.1 y Tabla 3.3.2) una tendencia a la disminución en la capacidad antioxidante de la bebida a medida que aumenta la temperatura y el tiempo de conservación, debido fundamentalmente a la inestabilidad de los antocianos (compuestos polifenólicos mayoritarios de la bebida) como ya se ha considerado en el capítulo II. Nuestros resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía. Markakis, (1974) observó que los pigmentos antocianos son fácilmente destruidos por el calor durante el procesado y el almacenamiento de los alimentos. Posteriormente Havlikova *et al.*,(1985) y Shenoy

(1993) encontraron que se produce un incremento logarítmico de la destrucción de los antocianos con un aumento aritmético de la temperatura. No obstante, se puede apreciar como en el plazo de 6 meses de almacenamiento, la disminución de capacidad antioxidante es mínima, por lo que la efectividad de la bebida almacenada durante 6 meses será aproximadamente igual que al principio de la conservación. Sin embargo, al cabo de un año sí se produce una enorme disminución de la capacidad antioxidante de la bebida a las tres temperaturas consideradas en el estudio.

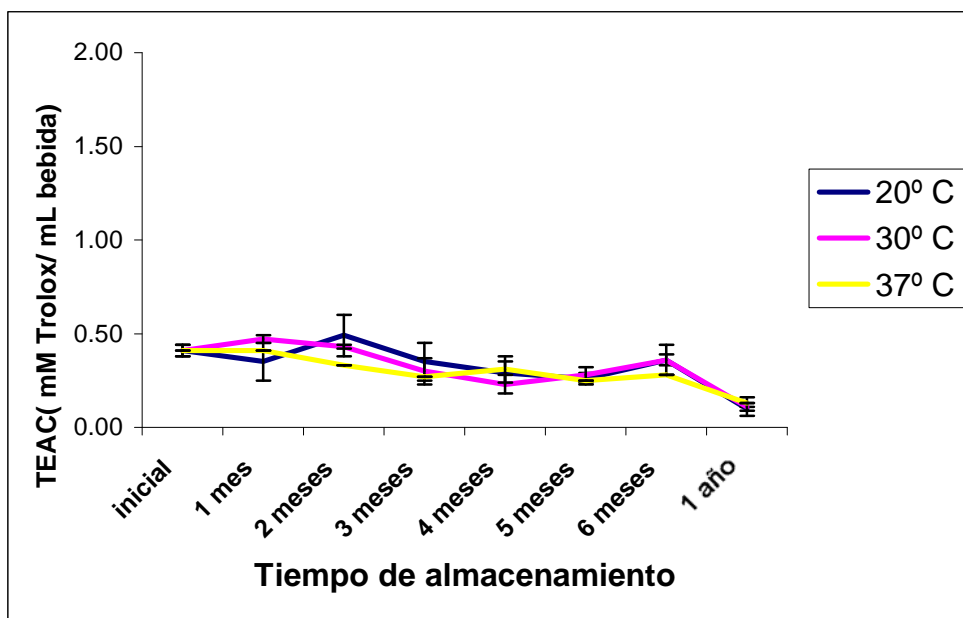


Fig 3.3.1.- Variación de la capacidad antioxidante de la bebida equivalentes Trolox (TEAC) durante 1 año de almacenamiento en oscuridad a diferentes temperaturas. Los resultados se expresan como media \pm SD.

Tabla 3.3.2.- Variación de la capacidad antioxidante de la bebida expresada como RSC (Radicals Scavenger Capacity) /ml de bebida, durante 1 año de almacenamiento en oscuridad a diferentes temperaturas. Los resultados se expresan como media \pm SD (n \geq 3).

RSC/ml	20°C	30°C	37°C
inicial	2.95 \pm 0.21	2.95 \pm 0.21	2.95 \pm 0.21
1 mes	2.47 \pm 0.71	3.35 \pm 0.18	2.95 \pm 0.27
2 meses	3.49 \pm 0.81	3.06 \pm 0.09	2.34 \pm 0.13
3 meses	2.48 \pm 0.71	2.14 \pm 0.52	1.93 \pm 0.08
4 meses	2.10 \pm 0.43	1.64 \pm 0.37	2.18 \pm 0.18
5 meses	1.87 \pm 0.18	1.98 \pm 0.27	1.77 \pm 0.05
6 meses	2.57 \pm 0.22	2.59 \pm 0.57	1.97 \pm 0.09
1 año	0.72 \pm 0.08	0.75 \pm 0.36	0.93 \pm 0.10

En el estudio univariante se ha demostrado que el tiempo influye en la capacidad antioxidante de la bebida, siendo ésta significativamente inferior al cabo de un año de almacenamiento (Tabla 3.3.3).

Tabla 3.3.3.- ANOVA Capacidad antioxidante de la bebida (TEAC/mL) / Tiempo almacenamiento (meses)

ANOVA			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	(Combinados)		.683	7	.098	22.316	.000
	Término lineal	Ponderado	.580	1	.580	132.722	.000
		Desviación	.103	6	.017	3.915	.002
Intra-grupos			.306	70	.004		
Total			.989	77			

De modo análogo también en el estudio univariante se ha demostrado que la temperatura no influye en la capacidad antioxidante de la bebida, lo que indica que a

las tres temperaturas analizadas (fácilmente alcanzables en los procesos de transporte o almacenamiento de las bebidas hasta que llegan al consumidor) no existe una disminución estadísticamente significativa en la capacidad antioxidante de la bebida (Tabla 3.3.4).

Tabla 3.3.4.- ANOVA Capacidad antioxidante de la bebida (TEAC/mL) / Temperatura de almacenamiento (° C).

ANOVA			Suma de cuadrado	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	(Combinados)		.019	2	.009	.717	.491
	Término lineal	Ponderado	.017	1	.017	1.327	.253
		Desviación	.001	1	.001	.107	.744
Intra-grupos			.970	75	.013		
Total			.989	77			

Desde el punto de vista del análisis multivariante la conclusión es muy similar, el único factor que influye en la disminución de la capacidad antioxidante es el tiempo de almacenamiento (Tabla 3.3.5).

Tabla 3.3.5.- Análisis multivariante (Regresión). Variable dependiente: Capacidad antioxidante de la bebida (TEAC/mL) y variables independientes: Tiempo almacenamiento (meses) y Temperatura de almacenamiento (° C).

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	.454	.035		12.985	.000
Tiempo de almacenamiento(meses)	-.025	.002	-.761	-10.311	.000
Temperatura de almacenamiento (°C)	-.001	.001	-.083	-1.122	.266

La ecuación de regresión deducida de la Tabla 3.3.5 que permite predecir la media de la capacidad antioxidante es:

$$\overline{\text{TEAC}} = 0.454 + (- 0.025) \times \text{Tiempo (meses)}$$

De esta expresión se deduce que a mayor tiempo de almacenamiento, como el coeficiente –B- es negativo, menor capacidad antioxidante.

En el estudio siempre se utiliza bebida recién fabricada, y cada ciclista ingiere en la prueba un total de 1600 ml de la bebida en estudio (TEAC 0.41 mM Trolox /mL bebida), que contienen una capacidad antioxidante total equivalente a la de una disolución 656 mM Trolox. El placebo administrado no tiene ninguna capacidad antioxidante.

Como el ciclista ingiere un total de 1600 mL de bebida en la prueba y la composición de fenoles totales es de 1.43 ± 0.2 g/L, en cada prueba la ingesta de fenoles totales será aproximadamente de 2.28 g. de los cuales 2.020 g. se corresponden con antocianos, flavonoles, dvdos. hidroxicinámicos, estilbenos y ácido elágico.

CAPÍTULO IV

DISEÑO DEL ESTUDIO

*“Si muchos investigadores descubrieron lo que no buscaban,
todos ellos buscaron con admirable tenacidad”
(Santiago Ramón y Cajal)*

CAPÍTULO IV.- DISEÑO DEL ESTUDIO

4.1.- MUESTRA DE ESTUDIO

La muestra del estudio está compuesta por 31 ciclistas amateurs varones que compiten a nivel regional y nacional y que entrenan aproximadamente 20 horas/semana. Los individuos se seleccionan consecutivamente entre aquellos que cumplen los criterios de inclusión.

4.2.- TIPO DE ESTUDIO

Se ha diseñado un estudio experimental “pre-post”, en el que el mismo individuo actúa como su control, ya que de este modo se reduce considerablemente el error aleatorio pues se eliminan las diferencias al inicio del estudio entre los dos tratamientos (placebo y con antioxidantes polifenólicos).

Con el fin de reducir los sesgos de selección y de información el estudio es de tipo Doble Ciego, donde ni el investigador ni el individuo conocen en ningún momento la bebida utilizada (placebo o rica en antioxidantes polifenólicos).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la UCAM. Se informa a cada ciclista de la metodología y pormenores del estudio así como de los riesgos y posibles efectos secundarios derivados de las distintas pruebas y maniobras a las que han que someterse. Cada deportista firma el correspondiente “Consentimiento Informado” antes de la realización de las distintas pruebas (Anexo 1). Además, antes de llevar a cabo los test, se evalúa el estado de salud de los ciclistas mediante una Historia Clínica Médico-Deportiva completa que incluye Anamnesis, Antecedentes, Exploración Física Completa y ECG Basal (de reposo) (Anexo 2), con todo esto se

consigue descartar posibles contraindicaciones absolutas y relativas para la realización de las pruebas de esfuerzo.

El conocimiento de los hábitos dietético-alimentarios se evalúa en cada deportista mediante la realización de una encuesta de frecuencias y dos encuestas recordatorio de 24 horas (los días en que asiste a la realización de las pruebas físicas) (Anexos 3 y 4). La finalidad de dichas encuestas es descartar aquellos deportistas que presentasen hábitos alimentarios fuera de la normalidad (ej. ausencia o ingesta superior a 5 raciones/día de frutas y verduras).

Para participar en el estudio los ciclistas se comprometen a no participar en carrera ni realizar ningún tipo de actividad física intensa (entrenamiento de alta intensidad y carreras de competición) durante las 48 horas previas a la realización de las pruebas de esfuerzo en el laboratorio (que se detallan posteriormente).

4.3.- TOMA DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS

A cada ciclista se le extrae sangre de la vena antecubital, antes y después (inmediatamente y a los 45 minutos de finalizar el ejercicio) de cada una de las dos pruebas rectangulares (en una ingieren un placebo y en la otra ingieren la bebida rica en antioxidantes polifenólicos), para determinar de forma inmediata a la extracción: Hematocrito, Hemoglobina, enzimas creatinaquinasa y lactato deshidrogenasa.

Del resto de la sangre se obtiene el plasma, que se conservará a -80°C , para cuantificar en el mismo: TBARS como productos de peroxidación lipídica (Buege *et al.*, 1978), Grupos carbonilo como productos de la oxidación proteica (Evans *et al.*, 1999; Levine *et al.*, 1994; Reznick *et al.*, 1994) y Estado antioxidante total plasmático (Kit Randox®).

Las tomas de muestra se realizan antes de iniciar la prueba y 45 minutos después de finalizarla, ya que según Ghiselli *et al.*, (2000) el tiempo necesario para la absorción tras la administración de bebidas ricas en compuestos fenólicos es de 30-50 min.

4.4.- MATERIAL Y MÉTODOS DE PRUEBAS DE ESFUERZO

Los ciclistas realizan tres pruebas de esfuerzo con un intervalo de una semana entre cada una de ellas.

Todas las pruebas de esfuerzo se desarrollan en el Laboratorio de la Cátedra de Fisiología del Ejercicio de la Universidad Católica San Antonio de Murcia, en condiciones ambientales de 20-24° C de temperatura y humedad relativa del 70% aproximadamente.

Así mismo, todas las pruebas se realizan en un Ergómetro de Rodillo con resistencia (marca Technogym, modelo Spin Trainer) que permite realizar el test de laboratorio en las condiciones biomecánicas y ergométricas más parecidas a las reales, ya que el ciclista puede incorporar al ergómetro su propia bicicleta. El Rodillo de Resistencia permite el control durante la prueba de la frecuencia cardiaca del ciclista (usando un pulsómetro acoplado al equipo), la velocidad de pedaleo, la pendiente, el tiempo y la distancia recorridos.

1ª PRUEBA: La metodología del estudio exige la realización inicial de una **prueba triangular maximal** que consiste en un test de esfuerzo progresivo, continuo y maximal. En dicha prueba la intensidad del esfuerzo es creciente desde un nivel de trabajo inicial hasta llegar a las condición considerada como maximal, que

es el agotamiento del deportista tras alcanzar la meseta en el consumo máximo de oxígeno (VO_2 max).

De manera estandarizada, podemos definir esta prueba como prueba de esfuerzo triangular maximal realizada en rodillo de bicicleta con resistencia electromagnética con una carga de inicio que simula una velocidad de 12 km/h e incrementos de carga de 2 Km/h cada minuto manteniendo una pendiente constante del 2%. Los ciclistas emplean desarrollo libre y se encuentran monitorizados electrocardiográficamente y conectados a un analizador de gases respiratorios.

Los principales parámetros valorados durante la prueba son:

- Carga Máxima Alcanzada (Km/h), es decir, la correspondiente al último escalón completado.
- Tiempo de la Prueba (min. seg): no es conveniente que supere los 15-20 min.
- Frecuencia Cardíaca Máxima (latidos/min)
- Consumo Máximo de Oxígeno (L/min), en términos absolutos.
- Consumo Relativo Máximo de Oxígeno (mL/kg/min): en función del peso del deportista
- Umbral Ventilatorio 1 (referido a latidos por minuto)
- Umbral Ventilatorio 2 (también en latidos por minuto, ya que se corresponde con un valor de Frecuencia Cardíaca utilizada como parámetro de referencia por los ciclistas para la planificación de su entrenamiento).

Además, se controla la evolución de la Tensión Arterial durante la prueba y el período de recuperación post-prueba y se realiza una determinación de lactato inmediatamente tras acabar el test. Por supuesto, cualquier prueba es suspendida de haber aparecido durante la misma alguno de los criterios médicos que aconsejan su suspensión.

Durante esta prueba, además de la determinación de los umbrales ventilatorio 1 y 2, se establece el Consumo Máximo de Oxígeno mediante un analizador de gases (Analizador de gases respiratorios MVMAX, mod. Sensormedics 29C) que opera respiración a respiración (el flujo ventilatorio y los volúmenes de gases intercambiados – oxígeno y dióxido de carbono- se monitorizan respiración a respiración por un analizador de gases de circuito abierto). Las condiciones de la bebida estudiada se valoran en un esfuerzo sostenido al 70% del $VO_{2m\acute{a}x}$, nivel en el cual el sustrato energético preponderante son los lípidos (McConell, 1994) y en el que se generan radicales libres de oxígeno (Sjödín *et al.*, 1990). El tiempo de realización del test es de 90 minutos, tiempo mínimo, pero suficiente, para agotar las reservas de glucógeno sobre las que la ingesta de la bebida (rica en carbohidratos) ha documentado en estudios previos su utilidad como bebida de reposición (Martínez *et al.*, 2002).

2ª PRUEBA: test de esfuerzo **rectangular**, es decir, con carga máxima mantenida (expresada en cifras de Frecuencia Cardíaca) equivalente a una velocidad que se corresponde con el 70% del consumo máximo de oxígeno, calculado en la prueba de esfuerzo anterior, manteniendo constante la pendiente al 2%. La duración de la prueba es de 90 minutos, con ingesta de bebida rica en antioxidantes (mayoritariamente polifenólicos) o del placebo (elección aleatoria y ciega) desde unos 15 minutos antes de iniciar la prueba y cada 15 minutos durante la duración total del test. Cada ingesta supone unos 200 ml del líquido en cuestión (1.600 ml en total), al igual que en la segunda prueba rectangular.

El protocolo de la prueba es el siguiente:

- 9:00 h: Desayuno estándar tomado en el Laboratorio y constituido por:
 - . 500 ml de leche entera
 - . 200 ml de zumo de naranja

- . 25 gr de mermelada de melocotón (Hero®)
- . Pan tostado (2 tostadas) (Bimbo®)
- . 1 Barrita de Cereales (Hero Muesly®) de 25 gramos.

Composición por barra:

- Valor energético: 556 KJ
- Hidratos de Carbono: 10,2 g
- Lípidos: 9,7 g
- Proteínas: 1,4 g

- . Azúcar: 1 cucharadita equivale a 3g.
- . Café soluble (Nescafé®): 1 cucharadita equivale a 1g.
- . Cacao soluble (Nesquik®): 1 cucharadita equivale a 2 g.

- 9:30 h: Extracción sanguínea venosa. Determinación de Lactato mediante un Analizador de lactato YSI Sport, mod. 1500L-230V, de la serie 00E0314AA.
- 9:35 h: Ingestión de 200 ml de bebida energética o placebo.
- 9:40 h: Pesada del deportista preprueba.
- 9: 40 h: Calentamiento.(30% del VO_2 máx)
- 9:45 h: Comienzo Prueba Rectangular. El ciclista ha sido monitorizado electrocardiográficamente; se le toma tensión arterial y se le hace ingerir 200 ml de la bebida energética o placebo cada 15 minutos durante los 90 minutos de duración de la prueba. La primera ingesta de bebida se produce en el minuto 0, al comienzo del test.

A la vez se determinan los valores de Lactato a partir de muestras de sangre capilar obtenidas del pulpejo de los dedos en los minutos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 y también mediante el analizador ABL (Radiometer Medical, mod. ABL 77) se mide el pH, pCO_2 , pO_2 , Hematocrito, Sodio, Potasio, Calcio, Cloro, Bicarbonato...en los minutos 0, 30, 60 y 90 para un mejor control metabólico de la prueba.

- 11:15 h: Fin de la prueba.
- 11:25 h: Pesada del deportista postprueba.
- 11:45 h: Nueva extracción sanguínea.

3ª PRUEBA: Igual metodología que la segunda prueba con el único cambio de la bebida a ingerir; si en la 2ª prueba el ciclista ha consumido la bebida energética, en la 3ª toma el placebo y viceversa.

La bebida energética empleada es High Effort en su modalidad Endurance, comercializada por la empresa Hero España S.A. Se trata de una bebida isotónica fabricada a base de concentrado de zumo de frutas (grosella, uva negra y frambuesa) y cuya composición se ha estudiado en el Capítulo III.

La bebida Placebo fue diseñada por los Laboratorios de Investigación y Desarrollo que la Empresa Hero España S.A posee en Alcantarilla (Murcia). Su contenido calórico y de principios inmediatos es nulo. Se utilizaron colorantes y aromatizantes para conseguir propiedades organolépticas similares a la bebida a estudio.

4.5.- VALORACIÓN NUTRICIONAL

La información obtenida a partir de las encuestas de frecuencias y recordatorios de 24 horas que se realizan a cada ciclista, se analiza con el programa informático AyD (Villegas, 1996), que permite obtener los valores sobre consumo de los antioxidantes Tocoferol, β -Caroteno, Vitamina C, Manganeso y Zinc. No se ha podido evaluar el consumo en polifenoles, ya que estos antioxidantes no están recogidos en el programa utilizado. A partir de dicha información podremos analizar si se cubren o no las recomendaciones para cada uno de los antioxidantes analizados.

Los valores obtenidos con el programa AyD se analizan mediante el programa estadístico SPSS, comparando estadísticamente los valores obtenidos con los recomendados.

En las encuestas también se consideran las suplementaciones con antioxidantes (Dayamineral[®], Germen de trigo[®], Multicentrum[®], Redoxon[®], Rochevit[®] y Supradyn[®]), utilizadas por los deportistas y su influencia en el nivel de antioxidantes.

Antes de exponer los resultados recordar que las recomendaciones para el consumo de los antioxidantes evaluados son las siguientes:

Tabla 4.5.1.- Cantidades diarias recomendadas de antioxidantes en la dieta
(Tablas de composición de alimentos de Mataix Verdú, 1995).

ANTIOXIDANTES	C.D.R.
BETACAROTENO (VITAMINA A)	1000 ug/día
TOCOFEROL (VITAMINA E)	12 mg/día
ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)	60 mg/día
MANGANESO	2 gr/día
ZINC	15 mg/día

De los resultados obtenidos en la valoración nutricional se deduce que los ciclistas participantes en el estudio ingieren por término medio una dieta con un contenido energético promedio de 3188 Kcal/día, con un aporte lipídico del 36 %, deficitaria en carbohidratos (50 %) y con un 14 % de proteínas.

Tabla 4.5.2.- Descriptivos de la valoración nutricional en los ciclistas participantes en el estudio (n=31).

	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típica
Edad (años)	17	35	24	5
Peso (Kg)	52,8	84,9	69,6	7,3
Talla (cm)	168	189	175,5	13,7
IMC ((Kg/m²)	18,2	26,5	23,0	4,9
Energía (Kcal/día)	1542.30	5716.90	3188,34	848.97
Proteínas (g/día)	68.00	271.80	124,75	44.98
Glúcidos (g/día)	117.00	587.40	408,20	117.31
Lípidos (g/día)	47.10	301.80	127,32	48.26
Fibra (g/día)	7.20	65.60	23,33	13.46
Colesterol (mg/día)	202.00	675.00	254,79	104.19
Vitamina A (µg/día)	202.78	12347.56	2539,48	1596.29
Vitamina C (mg/día)	24.23	261.00	132,62	63.08
Vitamina E (mg/día)	1.50	33.01	10,88	7.18
Zinc (mg/día)	6.18	71.41	19,06	13.11
Manganeso (g/día)	0.56	9.86	2,85	1.68
Magnesio (mg/día)	192.63	667.00	389,69	131.04

Respecto a los antioxidantes cuantificados existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de vitamina A, vitamina C y Manganeso con respecto a las recomendaciones. En los tres casos el consumo está por encima de los niveles recomendados. No existen diferencias significativas en los niveles de vitamina E ni de Zinc con respecto a las recomendaciones.

4.6.- CAMBIOS EN EL VOLUMEN PLASMÁTICO TRAS EL EJERCICIO

Los cambios que se observan en el volumen plasmático del deportista se deben a la deshidratación que se produce durante la realización del ejercicio, y se calculan del modo siguiente (Costill *et al.*, 1974):

$$\% \text{ PV} = \frac{PV(F) - PV(I)}{PV(I)} \times 100, \text{ donde:}$$

$$PV(I) = 100 - Htc^* (100\%)$$

PV: Volumen plasmático

I: Antes de iniciar la prueba

F: Tras realizar la prueba

Htc: Hematocrito

Debido a los posibles cambios en la media del volumen corpuscular de los glóbulos rojos (MCV) (que se calcula a partir de los cambios en la concentración media de Hb corpuscular MCHC); el volumen de plasma después de la deshidratación por el ejercicio PV(F) se calcula según:

$$PV(F) = \left(100 \times \frac{Hb(I)}{Hb(F)} \right) - \left[\left(100 \times \frac{Hb(I)}{Hb(F)} \right) \times Htc^*(F) \right]$$

Hb = Hemoglobina

Htc(F) = ml de glóbulos rojos / ml de sangre después del ejercicio

*Htc : el valor del Htc se ha de corregir como $Htc \times 0,96$ por el plasma que queda atrapado entre los glóbulos rojos.

El % de cambio del volumen de los glóbulos rojos (% Δ MCV) depende de los cambios en la concentración de Hb corpuscular (antes y después del ejercicio), y se calcula como:

$$\% \Delta \text{ MCV} = \frac{MCHC(I) - MCHC(F)}{MCHC(F)} \times 100, \text{ donde:}$$

MCHC(I) = Concentración de Hb corpuscular antes del ejercicio

MCHC(F) = Concentración de Hb corpuscular después del ejercicio

MCHC = Concentración de Hb por unidad de Htc

El objetivo de este capítulo es cuantificar las variaciones que se producen en el volumen plasmático en cada ciclista al finalizar ambas pruebas, con el fin de expresar los resultados de los marcadores bioquímicos analizados teniendo en cuenta dichas variaciones.

El análisis de hematocrito y hemoglobina se realiza en muestras de sangre extraídas de la vena antecubital, antes y después (a los 45 minutos de finalizar el ejercicio) de cada una de las pruebas rectangulares, para determinar los dos parámetros de forma inmediata a la extracción. Las muestras de sangre son recogidas en tubos que contienen EDTA como anticoagulante.

a) Para la determinación del **hematocrito** se utiliza: Centrífuga de hematocrito, sangre entera y capilares heparinizados de 1.8 mm de diámetro máximo y longitud no superior a 75 mm.

Su medida se realiza por centrifugación de la sangre heparinizada o tratada con algún otro inhibidor de la coagulación, calculando el % que alcanza la masa globular. Se sigue el procedimiento siguiente:

1. Se introduce la sangre en el tubo capilar por capilaridad, sumergiendo éste, con un cierto ángulo respecto a la vertical, en una gota de sangre por uno de sus extremos y manteniendo el otro extremo abierto. No se llena el capilar menos de 40 mm ni más de 70 mm.

2. Se tapa el extremo del tubo capilar con plastilina u otro tipo de cera extendida sobre una lámina. Para ello, se taponan con el dedo el extremo superior del capilar y se aprieta en forma vertical sobre dicha lámina, con cuidado de no romperlo.

3. Se sitúa el capilar en una hendidura del rotor de la centrifuga de hematocrito, con el extremo tapado con plastilina hacia la parte exterior.

4. Se centrifuga durante 3 minutos y se lee el volumen de hematocrito mediante el empleo de la plantilla excéntrica correspondiente, ajustando el cero en el inicio de la sangre y el 100 en el menisco superior del plasma.

b) Para la determinación de **hemoglobina** se utiliza el reactivo de Drabkin y se analiza usando un espectrofotómetro Varian Bio-50, UV-Vis.

Se colocan 20µl de sangre en contacto con 5 ml de reactivo de Drabkin, esperando 3 min a que se lisen todas las células, leyendo a continuación la absorbancia a 540 nm.

Este método es el de la cianometahemoglobina, que tiene como fundamento la transformación previa de la Hb en cianometahemoglobina (HbCN), que es muy estable y posee un color característico y cuya absorbancia se lee a 540 nm

La transformación de Hb en HbCN tiene lugar según el siguiente proceso:

Hb + Ferricianuro-potasico (DRABKIN) \Rightarrow metahemoglobina

metahemoglobina + cianuro potasico \Rightarrow cianmetahemoglobina (HbCN)

4.6.1.- RESULTADOS DE VARIACIÓN DEL VOLUMEN PLASMÁTICO

Las características de la muestra a estudio pueden resumirse en:

Edad: 24 ± 5 años

Peso: $69,6 \pm 7,3$ kg

Talla: $175,5 \pm 13,7$ cm

IMC: $23,0 \pm 4,9$ kg/ m²

Consumo Máximo de Oxígeno: $4,209 \pm 0,529$ L/min

Los valores son media + desviación estándar.

El cálculo del porcentaje de variación en el volumen plasmático por deshidratación tras el ejercicio parte de la base de las tres suposiciones siguientes:

- 1) Que el volumen de glóbulos rojos en la circulación sanguínea es constante,
- 2) Que la relación entre Hct_V (Htc de sangre venosa) y el Htc total (Htc_B) permanece invariable con la deshidratación, y
- 3) Que el tamaño de los glóbulos rojos es constante.

Estudios previos también han asumido estas suposiciones (Costill *et al.*, 1973).

Los valores medios de hemoglobina y hematocrito varían muy poco, por lo que el valor medio de variación en el volumen plasmático es muy pequeño (Test A: $-0,1 \pm 5\%$ y Test P: $-2,1 \pm 4\%$) pero los cambios de porcentaje individuales son muy diferentes para cada individuo, variando entre $-10,7\%$ hasta $+11,6\%$, por lo que la corrección individual de valores del plasma resulta importante en cada caso individualizado. Los cambios de volumen plasmático (Tabla 4.6.1.1) son similares a

los divulgados previamente que se obtienen durante la prueba en cicloergómetro (Costill *et al.*, 1974), y durante pruebas de triatlón (O'Toole, 1995).

Tabla 4.6.1.1.- Valores de hematocrito (Hc), hemoglobina (Hb) y cambios en el volumen plasmático (%Δ PV) antes y después del ejercicio. (n=31). Los valores son media ± SD; Htc♦= Htc x 0.96; A: Test Suplementado con antioxidantes (mayoritariamente polifenoles), P: Test Placebo; I:Pre-ejercicio, F: Post-ejercicio (45 min. tras finalizar la prueba).

Variable	AI	AF	PI	PF
Hb(g/100ml)	15.3 ± 0.9	15.3 ± 1	15.2 ± 1	15.4 ± 1
Htc♦(%)	44 ± 2.5	44 ± 2.4	44 ± 2.9	45 ± 2.8
% ΔPV		- 0.1 ± 5		-2.1 ± 4

Según Kozlowski *et al.*,(1964) junto a la deshidratación debida a la sudoración del deportista, el cambio en las proteínas plasmáticas durante el ejercicio justifican la disminución en el volumen plasmático que se produce tras el ejercicio. Según esto, el contenido proteico que aporta la bebida del estudio podría explicar que la disminución de volumen plasmático en el test A tienda a ser menor que en el test placebo. No obstante el objetivo de este capítulo no reside en comparar las variaciones de volumen plasmático en las dos pruebas (placebo y suplementada con la bebida rica en antioxidantes, mayoritariamente polifenólicos), sino en conocer la variación de volumen plasmático que se produce en cada individuo y para cada prueba, con el fin de expresar los resultados de los marcadores de estrés oxidativo corregidos con dichas variaciones en cada caso.

4.7.- RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la recogida de datos se desarrolló una base de datos informatizada con criterios lógicos de restricción de entrada en las variables en las que fue posible. Los datos fueron introducidos por el investigador en dos bases de datos paralelas a tiempos distintos para el control de desacuerdos, reduciendo de este modo la posibilidad de cometer sesgo de información.

Para la descripción de cada variable a estudio se emplearon la media aritmética y el error estándar; asimismo se han calculado otros estimadores robustos centrales (mediana e intervalo intercuartil). Para estimar el valor real de cada variable se han construido los correspondientes intervalos de confianza, todos ellos al 95%.

Se ha comprobado el ajuste a la normalidad para cada variable mediante el empleo del test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación de medias se ha realizado a través del test T de Student, para variables con distribución normal, o del test de Wilcoxon cuando se trate de variables que no se ajusten a la normalidad. Para el estudio de las diferencias entre las medidas en diferentes momentos temporales se ha empleado el ANOVA de una vía con test de tendencia lineal, análisis este último que ha permitido determinar la significación de las medidas crecientes o decrecientes. Todos los contrastes se han realizado considerando un error alfa inferior al 5% ($p < 0.05$).

Para el análisis de variables cuantitativas dependientes de más de una variable determinante desarrollamos un método de regresión lineal, con los mismos valores de significación anteriormente mencionados.

Las bases de datos fueron desarrolladas en Access 2000, y el tratamiento estadístico se realizó con el programa SPSS 11.5. (Statistical Package for the Societal Science) para Windows.

CAPÍTULO V

EFECTO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LAS ENZIMAS CREATINA QUINASA Y LACTATO DESHIDROGENASA TRAS LA ACTIVIDAD FÍSICA

*“El cambio ocurre, controla el cambio,
adáptate al cambio con rapidez, cambia, ¡disfruta del cambio!,
prepárate para cambiar con rapidez y para disfrutarlo una y otra vez”
(Spencer Jonson)*

CAPÍTULO V.- EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA INDUCIDA POR LA ACTIVIDAD FÍSICA

5.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los altos niveles de productos de la **peroxidación lipídica** detectados en el miocardio tras el ejercicio, indican que el ejercicio aumenta el estrés oxidativo (Barclay *et al.*, 1991; Kumar *et al.*, 1992) y que los radicales libres pueden ser uno de los factores que contribuyen a la fatiga oxidativa del músculo esquelético.

El objetivo de este apartado es analizar el efecto de una actividad física submaximal (70% VO₂ max) y de la administración de una bebida de reposición con compuestos polifenólicos sobre la peroxidación lipídica, que será analizada de forma indirecta en plasma, mediante la cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como subproductos de peroxidación lipídica. El grado de estrés oxidativo en base a datos de peroxidación lipídica es una aproximación indirecta que sólo puede ser validado si se estudian simultáneamente otros índices definidos de estrés oxidativo, que serán analizados en los capítulos siguientes de este trabajo.

La determinación de productos de peroxidación refleja el balance entre la peroxidación lipídica y los peróxidos eliminados, y estos productos de peroxidación lipídica pueden ser detectados por varios métodos en tejidos humanos y fluidos corporales.

Según Krotkiewski *et al.*, (1994) el aumento de MDA (el producto TBARS mayoritario) es transitorio, incrementándose exclusivamente durante los primeros instantes post-ejercicio, por ello en aquellos casos en los que fue posible, al ciclista se le extrajo sangre inmediatamente después de finalizar la prueba de esfuerzo, y a los 45 min. de acabar el test.

5.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

El método utilizado para cuantificar el grado de estrés oxidativo mediante la peroxidación lipídica, determina los valores de TBARS plasmáticos espectrofotométricamente (Buege *et al.*, 1978).

Material y Reactivos:

1.- Las muestras de sangre se extraen de la vena antecubital antes, inmediatamente después y 45 min. tras finalizar la prueba. La sangre se recoge en tubos heparinizados, se centrifugan a 6000 rpm /10 min. en una Centrífuga Eppendorf 5810 y se recoge el sobrenadante que se congela a -80°C hasta su posterior análisis.

2.- La solución stock utilizada para la determinación de TBARS se prepara extemporánea según:

- TCA (Ac. Tricloroacético) 15 % (w/v)
- TBA (Ac. Tiobarbitúrico) 0,375 % (w/v)
- BHT (Hidroxitoluenobutilado) 0,010 % (w/v)
- HCl conc. (Ac. Clorhídrico) 2,08 % (v/v)
- H₂O milli-Q c.s.p. 100 ml

Se calienta en agitación y bien protegido de la luz.

3.- La curva patrón se prepara extemporánea a partir de una solución madre de Malondialdehído dimetilacetal (MDA) 100 μM (16,3 μl MDA / 1 litro H₂O milli-Q). A partir de esta solución se prepara otra 10 μM y por dilución de ésta última se preparan las disoluciones dentro del rango 0.05 μM - 10 μM de MDA.

4.- El procesado de las muestras se realiza en tubos de ensayo con cierre a rosca, lavados con agua milli-Q .

5.- El baño termostatzado con agitación continua que se utiliza en la técnica es Julabo, mod. Shake Temp. SW22, la centrífuga es Eppendorf. Mod. 5810 y el espectrofotómetro es Varian mod. Cary 50 Bio UV-Vis.

Método:

200 μ l de las soluciones de la curva patrón o 200 μ l de las muestras problema (suero o plasma heparinizado) respectivamente se disponen en los tubos, a los que se les añade 1 ml de reactivo (solución Stock). Para realizar el blanco se mezcla H₂O milli-Q con solución Stock y se calienta a 95° C/30 minutos en agitación. Posteriormente tras enfriar los tubos se centrifugan a 3000 rpm durante 15 minutos y se lee la absorbancia (A) del sobrenadante frente al blanco a 535 nm.

Los valores obtenidos de A (535 nm) se llevan al eje –Y- de coordenadas y representar en el eje –X- la concentración de TBARS en nmol/ ml (μ M).

Los valores de A (535 nm) de las muestras problema se interpolan sobre la recta patrón y se obtienen las concentraciones de TBARS en nmol/ ml (μ M). Para expresar la concentración de TBARS en μ mol / L plasma ; también se puede realizar el cálculo:

$$\mu\text{mol TBARS} / \text{L plasma} = (\text{Abs} \times \text{Vol. Final}) / (\epsilon \times \text{Vol. de muestra})$$

$$\epsilon = 0.156 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Los coeficientes de variación en la cuantificación de TBARS fueron 3,5% en intra-ensayo y 4,3% en interensayo

Los datos obtenidos se analizan estadísticamente con el programa SPSS v 11.5, mediante el cual se somete cada variable al test de Kolmogorov-Smirnov para conocer si sigue o no una distribución normal. Cuando las variables comparadas son normales se aplica como test paramétrico la T-Student, y cuando no se trate de variables con distribución normal se comparan con una prueba no paramétrica, el test de Wilcoxon.

5.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del ejercicio submaximal y de la bebida rica en antioxidantes, sobre los valores de TBARS se muestran en los estadísticos descriptivos de las Tablas 5.3.1, 5.3.5, 5.3.8 y 5.3.11. Los resultados que se muestran en dichas tablas están corregidos considerando la variación del volumen plasmático que se produce en cada ciclista al finalizar las pruebas respecto a la situación del pre-ejercicio.

Tabla 5.3.1.- Estadísticos descriptivos de TBARS AI, AFo, PI y PFo. (n=9). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I: Pre-ejercicio, Fo: Inmediatamente después del ejercicio.

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
TBARS AI(μ M)	Media		7.9411	.37561
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	7.0750	
		Límite superior	8.8073	
TBARS AFo(μ M)	Media		8.1678	.36907
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	7.3167	
		Límite superior	9.0189	
TBARS PI(μ M)	Media		8.0067	.42328
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	7.0306	
		Límite superior	8.9827	
TBARS PFo(μ M)	Media		8.4322	.51491
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	7.2448	
		Límite superior	9.6196	

Tabla 5.3.2.- Prueba de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) en TBARS AI, AFo, PI y PFo. (n=9). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, Fo: Inmediatamente Post-ejercicio.

Prueba de normalidad	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
TBARS AI (μM)	.163	9	.200
TBARS AFo (μM)	.298	9	.020
TBARS PI (μM)	.158	9	.200
TBARS PFo (μM)	.278	9	.043

Los valores de TBARS iniciales (I: antes del ejercicio) en ambas pruebas (A: suplementada con antioxidantes y P:placebo) son similares y no presentan diferencias significativas. Este hecho indica la homogeneidad de la población de partida antes de las pruebas (Tabla 5.3.3).

Tabla 5.3.3.- Test T-Student en TBARS: AI vs PI (n=30). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio.

T-Student de muestras relacionadas	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. bilat.
	Media	Desv. típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
TBARS AI(μM) vs TBARS PI(μM)	-.1906	.92757	.16660	-.5309	.1496	-1.144	30	.262

En el test placebo el valor de TBARS inmediatamente posterior al ejercicio (PFo) es significativamente superior ($p < 0.05$) respecto al valor antes del ejercicio (PI), lo que nos permite afirmar que la actividad física desarrollada por los ciclistas ha inducido estrés oxidativo. En el test en el que el ciclista ingiere la bebida rica en

antioxidantes el valor de TBARS inmediatamente posterior al ejercicio (AFo) no aumenta de modo significativo respecto al preejercicio (AI) (Tabla 5.3.4).

Tabla 5.3.4.- Test Wilcoxon para TBARS AFo vs AI y PFo vs PI. (n=9). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, Fo: Inmediatamente Post-ejercicio.

Test Wilcoxon	TBARS AFo (μM) vs TBARS AI(μM)	TBARS PFo (μM) vs TBARS PI (μM)
Z	-0.652	-2.073
Sig. asintót. (bilateral)	.515	.038

La concentración de TBARS en el test placebo muestra un aumento significativo inmediatamente después del ejercicio extenuante (Fo), mientras que a los 45 min después de finalizar la prueba (F) disminuye la concentración de TBARS y se recuperan los valores del pre-ejercicio (I). Estos resultados coinciden con los de Krotkiewski *et al.*, (1996) y Lovlin *et al.*, (1987), que observan incrementos de MDA (producto TBARS mayoritario) exclusivamente en los instantes posteriores al ejercicio, ya que a los 5 minutos del post-ejercicio comprobaron que se recuperaban los valores MDA del pre-ejercicio. Sin embargo Sánchez-Quesada *et al.* (1998), no observaron diferencias significativas en TBARS plasmático de sangre obtenida en atletas inmediatamente después de finalizar una carrera de 4 horas (44.3 ± 9.4 Km recorridos) respecto a los TBARS plasmáticos en el pre-ejercicio. Marzatico *et al.*,(1997) concluyen que son los diferentes tipos de entrenamiento y de ejercicio los que inducen diferentes niveles de peroxidación.

Cuando se analiza el TBARS plasmático tras 45 min de finalizar el test se observa que los valores para ambas pruebas (PF y AF) se igualan a los iniciales (PI y AI) (Tablas 5.3.5, 5.3.6 y 5.3.7).

Tabla 5.3.5.- Estadísticos descriptivos de TBARS AI, AF, PI y PF (n=31).

A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, F: 45 min. tras finalizar el ejercicio.

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
TBARS AI(μ M)	Media		6.9581	.22298
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6.5027	
		Límite superior	7.4135	
TBARS PI(μ M)	Media		7.1487	.24880
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6.6406	
		Límite superior	7.6568	
TBARS AF(μ M)	Media		7.1232	.24558
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6.6217	
		Límite superior	7.6248	
TBARS PF(μ M)	Media		7.1313	.25556
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	6.6094	
		Límite superior	7.6532	

Tabla 5.3.6.- Pruebas de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) en TBARS

AI, AF, PI y PF. (n=31). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, F: 45 min. tras finalizar el ejercicio.

	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
TBARS AI (μ M)	.075	31	.200
TBARS PI (μ M)	.112	31	.200
TBARS AF (μ M)	.068	31	.200
TBARS PF (μ M)	.110	31	.200

Como se trata de cuatro variables con una distribución normal se aplica sobre ellas la T-Student, de donde se deduce que no existen diferencias significativas entre los valores de TBARS antes y a los 45 min. de finalizar el ejercicio en las dos pruebas. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Saxton *et al.*,(1994); quienes observaron que los valores TBARS, MDA y CD no aumentaban significativamente al someter a deportistas a diferentes protocolos de ejercicio físico.

Los resultados de TBARS obtenidos en este estudio sugieren que para cuantificar el grado de peroxidación lipídica es de suma importancia que la toma de muestra se realice en el instante inmediatamente posterior a la finalización de la actividad física, ya que transcurrido ese instante disminuye progresivamente el valor TBARS hasta alcanzar los valores del pre-ejercicio, muy probablemente por la actuación de las defensas antioxidantes especialmente desarrolladas en sujetos entrenados.

Tabla 5.3.7.- T-Student en TBARS AI vs PI, AI vs AF y PI vs PF (n=31). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, F: 45 min. tras finalizar el ejercicio.

Prueba de muestras relacionadas	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilat.)
	Media	Desv. típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
TBARS AI(microM) TBARS PI(microM)	-.1906	.9275 7	.1666 0	-.5309	.1496	-1.144	30	.262
TBARS AI(microM) TBARS AF(microM)	-.1652	1.025 89	.1842 6	-.5415	.2111	-.896	30	.377
TBARS PI(microM) TBARS PF(microM)	.0174	.9520 3	.1709 9	-.3318	.3666	.102	30	.920

Para estudiar el efecto de los antioxidantes de la bebida sobre la oxidación lipídica se analizan estadísticamente los incrementos en los valores TBARS de cada prueba (post-ejercicio vs pre-ejercicio) (Tabla 5.3.8).

Cuando se consideran los valores TBARS en el instante inmediato de finalizar las pruebas (AFo y PFo) respecto a los valores iniciales (AI y PI) y se estudian los incrementos correspondientes a ambos test (AFo-AI y PFo-PI), se observa que en los dos casos se trata de variables con una distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 5.3.9).

Tabla 5.3.8.- Estadísticos descriptivos para los incrementos de TBARS (AFo-AI) y (PFo-PI). (n=9). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, Fo: Inmediatamente Post-ejercicio.

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
TBARS (AFo-AI) (µM)	Media		,0862	,25839
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-,5248	
		Límite superior	,6973	
TBARS (PFo-PI) (µM)	Media		,4713	,22776
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-,0673	
		Límite superior	1,0098	

Tabla 5.3.9.- Pruebas de normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov para los incrementos de TBARS (AFo-AI) y (PFo-PI). (n=9). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, Fo: Inmediatamente Post-ejercicio.

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
TBARS (AFo-AI) (µM)	,179	8	,200
TBARS (PFo-PI) (µM)	,157	8	,200

Al tratarse de dos variables normales se analizan mediante la prueba paramétrica T-Student para muestras relacionadas, apreciándose que no existen diferencias significativas entre ambas (Tabla 5.3.10).

Tabla 5.3.10.- T-Student para los incrementos de TBARS (AFo-AI) vs (PFO-PI). (n=9). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, Fo: Inmediatamente Post-ejercicio.

Prueba de muestras relacionadas	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilat)
	Media	Desvi ac. típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
TBARS (AFo-AI) (μM) vs TBARS (PFO-PI) (μM)	-,3850	1,099	,38858	-1,303	,533	-,991	7	,355

Las variaciones interindividuales, y por lo tanto las elevadas SD, podría ser una de las causas de que no se aprecien diferencias significativas al comparar en ambos tests los incrementos de niveles de TBARS en el instante de finalizar el ejercicio respecto a los valores anteriores al ejercicio, ya que pese a no aparecer diferencias significativas sí existe tendencia a un mayor grado de peroxidación lipídica en la prueba placebo (PFO-PI = 0.471 μM , que supone un incremento del 6,6 %) respecto a la prueba suplementada con polifenoles (AFo-AI = 0.086 μM , que supone un 1,3 %). Estas variaciones interindividuales tan elevadas justificaría el que en este tipo de estudios resulte obligado considerar a la misma población que se somete al estudio como placebo. El que no aparezcan diferencias significativas en los incrementos (Fo-I) entre ambas pruebas (A y P) también puede deberse al reducido tamaño de muestra, por lo que trabajos posteriores que incluyan un mayor número de individuos a los que se les tome muestra en el instante inmediato de finalizar el

ejercicio ayudarán a dilucidar si los antioxidantes polifenólicos de la bebida en estudio influyen sobre la peroxidación lipídica inducida por la actividad física.

Cuando se consideran los valores TBARS a los 45 min. de finalizar las pruebas (AF y PF) respecto a los valores iniciales (AI y PI) y se estudian las diferencias correspondientes a ambos test (AF-AI y PF-PI) (Tabla 6.3.11), se observa que en la prueba A no sigue una distribución normal, mientras que en la prueba P sí se trata de una variable normal según el test de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 5.3.12).

Tabla 5.3.11.- Estadísticos descriptivos para los incrementos de TBARS (AF-AI) y (PF-PI). (n=31). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, F: 45 min. tras finalizar el ejercicio.

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
TBARS (AF-AI) (µM)	Media		,1652	,18426
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-,2111	
		Límite superior	,5415	
TBARS PF-PI (µM)	Media		-,0174	,17099
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-,3666	
		Límite superior	,3318	

Tabla 5.3.12.- Pruebas de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) para los incrementos de TBARS (AF-AI) y (PF-PI). (n=31). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, F: 45 min. tras finalizar el ejercicio.

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
TBARS AF-AI (µM)	,191	31	,006
TBARS PF-PI (µM)	,101	31	,200

Ante esta situación se analizan los datos según la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon, observándose que no existen diferencias significativas entre las variables TBARS (AF-AI) y TBARS (PF-PI), lo que sugiere que los antioxidantes de la bebida no ejercen efecto sobre la peroxidación lipídica inducida por la actividad física.

Tabla 5.3.13.- T-Student en TBARS (AF-AI) vs (PF-PI). (n=31). A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test placebo, I:Pre-ejercicio, F: 45 min. tras finalizar el ejercicio.

Prueba de Wilcoxon	TBARS (PF-PI) vs TBARS (AF-AI)
Z	-,353
Sig. asintót. (bilateral)	,724

En humanos los resultados en las determinaciones de TBARS después del ejercicio son contradictorios. Algunos autores observan un incremento (Kanter *et al.*, 1988; Kanter *et al.*, 1993; Lovlin *et al.*, 1987); mientras que otros no encuentran variaciones tras el ejercicio (Duthie *et al.*, 1990; Viinikka *et al.*, 1984).

Durante el ejercicio físico se estimula el incremento del consumo de oxígeno en los tejidos, este aumento y la dilatación de los capilares sanguíneos, mayor en el caso del ejercicio isométrico y/o excéntrico, es concomitante con el proceso de isquemia-reperfusion. Por ello, la peroxidación lipídica que se produce a nivel tisular se refleja a nivel plasmático, donde realizamos la determinación de los TBARS.

El daño de las membranas sarcoplásmicas podría conducir al dolor, disminuyendo la fuerza muscular ocasionando trastornos miofibrilares y la liberación de enzimas antioxidantes al torrente circulatorio después del ejercicio (Anderson *et al.*, 1977; Kanter *et al.*, 1988; Sjödín *et al.*, 1990) ya que se ha demostrado que el entrenamiento físico genera un sistema antioxidante aumentado y una reducción en la

peroxidación lipídica. El ejercicio físico de resistencia puede provocar hasta dos y tres veces un aumento en la concentración de radicales libres en músculo e hígado, causando un daño tisular considerable (Dubowitz, 1985).

Se han descrito aumentos significativos en TBARS plasmáticos en humanos sedentarios tras un ejercicio intenso en cicloergómetro (Sjödin *et al.*, 1990; Lovlin *et al.*, 1987). Por el contrario, Sexton *et al.*, (1990) no observaron aumentos significativos de MDA tras el ejercicio. Estas diferencias pueden deberse a la metodología, especialmente si se tiene en cuenta que el incremento de MDA es sólo transitorio, que se produce durante los primeros instantes post-ejercicio (Krotkiewski *et al.*, 1996).

Diversos estudios han examinado los efectos del ejercicio sobre el nivel de antioxidantes y la peroxidación lipídica, observando que un ejercicio extenuante aumenta el nivel de radicales libres y el daño muscular, incrementando la peroxidación lipídica y que la participación regular en entrenamiento físico puede elevar el nivel de antioxidantes y reducir la peroxidación lipídica. El diseño de los estudios es diverso, realizándose ejercicios en forma incremental en bicicleta ergométrica, test intermitente graduado hasta la fatiga, carrera de 80 Km, etc. También se han realizado estudios de carrera en pendiente descendente (reacciones musculares excéntricas) con un daño muscular mayor que las acciones concéntricas, y mayor producción de radicales libres. (Balke *et al.*, 1984; Clarkson, 1995; Child *et al.*, 1998).

Dillard *et al.*, (1978) demostraron que el tocoferol en el plasma se incrementa durante un test de pedaleo hasta el agotamiento, sugiriendo que el tocoferol se moviliza desde los tejidos para ayudar a prevenir la peroxidación lipídica en el músculo esquelético. Del Castillo, (1998) sugiere que el tocoferol puede ser liberado desde el tejido adiposo junto con los ácidos grasos.

Otros autores suplementaron con vitamina E diariamente durante semanas la dieta, observando que la vitamina E inhibe la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio (Sumida *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 1992; Satchek *et al.*, 2001).

Cabe pensar que la ampliación del número de muestras F_o en el estudio, la administración de la bebida durante un periodo de tiempo prolongado y/o la utilización de otros biomarcadores de lipoperoxidación (como los isoprostanos) permita observar diferencias significativas entre los incrementos (F_o-I) de ambas pruebas, lo que confirmaría que los polifenoles actúen inhibiendo la peroxidación lipídica, ya que esta actividad está descrita en la bibliografía (Ursini *et al.*, 1994). No obstante es importante recordar en primer lugar que son deportistas entrenados, y en segundo lugar que aunque la duración de las pruebas (90 min) justifica que el deportista utilice las grasas como sustrato energético, estas grasas las obtiene, básicamente, del entorno muscular, es grasa intramuscular, no utiliza ácidos grasos plasmáticos ni reservas del tejido adiposo. Por ello también cabe esperar que el estrés oxidativo y concretamente, la lipoperoxidación no sea razonablemente alta, y por lo tanto que no resulte fácil detectarla.

CAPÍTULO VI

EFEECTO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA INDUCIDA POR LA ACTIVIDAD FÍSICA

*“La grandeza del mar y de la ciencia está en lo que borran y lo que aportan”
(F. Fernández-Savater)*

CAPÍTULO VI.- EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS EN LAS ENZIMAS CREATINA-QUINASA Y LACTATO DESHIDROGENASA

6.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo es analizar los valores de creatinaquinasa (CK) y lactatodeshidrogenasa (LDH) antes del ejercicio y a los 45 min de finalizar la prueba, tanto en el test placebo como en el test suplementado con la bebida de reposición (con compuestos polifenólicos). No se analizan los valores de CK y LDH inmediatamente después del ejercicio porque está descrito que es necesario un periodo de tiempo posterior a la actividad física para que como consecuencia de la misma se incremente la liberación de estas enzimas al torrente circulatorio (Stephen *et al.*, 2001).

El ejercicio intenso, especialmente el que implica acciones excéntricas del músculo, se ha demostrado que provoca daño histológico y ultraestructural del músculo (Van Der Meulen , 1991; Komulainen *et al.*,1999). Una consecuencia perjudicial del ejercicio es la liberación de varias proteínas del músculo esquelético a la sangre. El incremento de la actividad de la CK plasmática se ha utilizado como marcador del daño de la célula muscular, y se ha asociado indirectamente al aumento de la permeabilidad de membrana (Van Der Meulen , 1991; Goodman, 1997).

Clarkson *et al.*, 2000) encontraron niveles de CK significativamente elevados 24 horas después de una carrera de 45 minutos tanto en corredores de maratón como en sujetos no entrenados.

Lovlin *et al.*, (1987) observaron que las concentraciones plasmáticas de MDA y lactato están elevadas en humanos durante un ejercicio físico intenso. En

corredores de maratón se ha descrito una clara correlación entre los valores de CK y LDH con el aumento de MDA plasmático (Kanter *et al.*, 1988).

Krotkiewski *et al.*, (1994) correlacionan el incremento de MDA y el aumento de lactato en plasma ($r = 0.47$, $p < 0.05$). Una disminución de MDA plasmático junto con la disminución de lactato plasmático, a partir de los 5 minutos posteriores de finalizar el ejercicio, podría sugerir una inhibición del proceso peroxidativo. Esto se podría explicar por el aumento del NADH citosólico producido por la liberación de lactato, que sería responsable de la mayor actividad de las enzimas que inhiben la peroxidación (Krotkiewski *et al.*, 1994)

Manghan *et al.*, (1989), observaron un aumento significativo de MDA y CK, 6 y 24h después de una carrera de 45 min de treadmill en pendiente. El incremento de MDA es especialmente alto en los sujetos que sufren una gran elevación de la concentración de CK.

6.2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

6.2.1.- Material y Reactivos

Las muestras de sangre se extraen de la vena antecubital inmediatamente antes y 45 min. después de finalizar la prueba. La sangre se recoge en tubos con citrato, se centrifugan a 6000 rpm en una Centrífuga Eppendorf 5810 y en el sobrenadante se analizan de forma inmediata las enzimas CK y LDH espectrofotométricamente en un equipo Varian, mod. Cary 50 Bio UV-Vis.

Las actividades CK y LDH en plasma se determinaron espectrofotométricamente por triplicado, mediante Kits de Biosystems®.

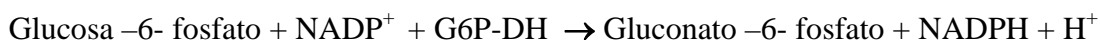
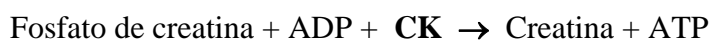
6.2.2.- Métodos

La determinación de la LDH se fundamenta en la siguiente reacción:



En esta reacción el NAD^+ y lactato se convierten en cantidades equimoleculares a la misma velocidad. La velocidad a la que se forma NAD^+ se determinó por incremento de absorbancia y es directamente proporcional a la actividad enzimática. Los coeficientes de variación en la cuantificación de LDH fueron 2,5% en intra-ensayo y 3,3% en interensayo. Los resultados se expresan en U/L (Siekmann *et al.*, 2002).

El fundamento del método utilizado para cuantificar la **creatina quinasa** consiste en que la CK cataliza la fosforilación del ADP por el fosfato de creatina, obteniéndose creatina y ATP. La concentración catalítica se determina empleando las reacciones acopladas de la hexoquinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), a partir de la velocidad de formación del NADPH, medido a 340 nm. (Siekmann *et al.*, 2002), siendo los coeficientes de variación en la cuantificación de CK del 2,5% en intra-ensayo y 3,5% en interensayo.



El análisis estadístico de los resultados se realiza con el programa SPSS v. 11.5, mediante el cual tras el análisis descriptivo se realiza la prueba de normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov. Cuando las variables comparadas siguen una distribución normal, se aplica como test paramétrico la T-Student y en el caso de que no sean normales se comparan mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

6.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio muestran que los valores de CK y LDH son superiores al finalizar el ejercicio (F) respecto al inicio de la prueba (I) (Tablas 6.3.1 y 6.3.2), resultados que coinciden con los obtenidos por diferentes autores (Kanter *et al.*, 1988; Vincent *et al.*, 1997; Shepherd, 2000; Child *et al.* 1999; Chung *et al.*, 1997; Clarkson *et al.*, 2000).

Tabla 6.3.1.- Estadísticos descriptivos de CK (U/L) en pre y post-ejercicio de ambas pruebas (A y P). Valores corregidos con la variación de volumen plasmático. A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test Placebo, I: Pre-ejercicio, F: Post-ejercicio.

Descriptivos		Estadístico	Error típ.
CK AI (U/L)	Media	203.00	41.281
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	118.69 287.31
CK AF(U/L)	Media	233.10	47.274
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	136.55 329.64
CK PI (U/L)	Media	128.35	16.203
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	95.26 161.45
CK PF (U/L)	Media	168.71	21.198
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	125.42 212.00
CK AF-AI (U/L)	Media	30.10	23.309
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	-17.51 77.70
CPK PF-PI (U/L)	Media	40.35	10.381
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	19.15 61.55

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
LDH AI (U/L)	Media		332.23	20.943
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	289.46	
		Límite superior	375.00	
LDH AF (U/L)	Media		377.35	37.834
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	300.09	
		Límite superior	454.62	
LDH PI (U/L)	Media		331.45	22.113
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	286.29	
		Límite superior	376.61	
LDH PF (U/L)	Media		356.13	18.139
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	319.08	
		Límite superior	393.17	
LDH AF-AI (U/L)	Media		45.13	39.859
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-36.27	
		Límite superior	126.53	
LDH PF-PI (U/L)	Media		24.68	19.041
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-14.21	
		Límite superior	63.56	

Tabla 6.3.2.- Estadísticos descriptivos de LDH (U/L) en pre y post-ejercicio de ambas pruebas (A y P). Los valores están corregidos con la variación de volumen plasmático. A: Test suplementado con antioxidantes, P: Test Placebo, I: Pre-ejercicio, F: Post-ejercicio.

El aumento de CK (rango de normalidad 15-105 U/L) puede o no producirse durante el sobre-entrenamiento, dependiendo del tipo de fuerzas de contracción y del tipo de músculo afectado (Fry *et al.*, 1991). Estos autores observaron que se producía un aumento de la CK durante la fase de sobre-entrenamiento, y se recuperaban los

valores iniciales durante el periodo de recuperación del ejercicio. Los resultados así obtenidos y los de trabajos posteriores (Snyder *et al.*,1995; Chung *et al.*,1999; Hartman *et al.*, 2000) sugieren que se utilice la CK como marcador del daño muscular agudo.

La enorme variabilidad entre los individuos obtenida en los valores de CK (Tabla 6.3.1) coincide con los resultados obtenidos por Hartman *et al.*,(2000) que determinaron los valores de CK en atletas de nivel internacional y observaron que los deportistas que mantienen altos niveles basales de forma crónica muestran una gran variabilidad entre ellos.

Los valores de CK aumentan significativamente tras el ejercicio tanto en la prueba placebo (PF vs PI) ($p < 0.05$) como cuando los ciclistas ingieren la bebida rica en antioxidantes (compuestos fenólicos mayoritariamente) (AF vs AI) ($p < 0.05$). No obstante no se aprecian diferencias significativas al comparar en ambas pruebas los incrementos de CK [(AF-AI) vs (PF-PI)] (Tabla 6.3.4), lo que sugiere que los antioxidantes de la bebida a estudio no influye en los valores de CK.

Tabla 6.3.3.- Prueba de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) para CPK en el pre(I),post-ejercicio(F) y sus incrementos (F-I) en ambas pruebas (A :Test con antioxidantes y P:Test placebo).

Prueba de normalidad	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
CPK AI (U/L)	.282	31	.000
CPK AF(U/L)	.313	31	.000
CPK PI (U/L)	.240	31	.000
CPK PF (U/L)	.219	31	.001
CPK AF-AI (U/L)	.281	31	.000
CPK PF-PI (U/L)	.253	31	.000

Tabla 6.3.4.- Prueba de Wilcoxon en CK en el pre(I), post-ejercicio (F) y los incrementos (F-I) de CK en ambas pruebas (A: Test con antioxidantes y P: Test placebo).

Prueba de Wilcoxon	CK PI vs AI (U/L)	CK AF vs AI (U/L)	CK PF vs PI (U/L)	CK (PF-PI) vs (AF-AI) (U/L)
Z	-2.195	-2.195	-4.116	-1.029
Sig. asintót. (bilateral)	.028	.028	.000	.303

Los valores de LDH observados antes (I) y después del ejercicio (F) (Tabla 6.3.2) son superiores a los valores normales de dicha enzima en adultos (140-280 U/L). No obstante no se aprecian diferencias significativas (aunque sí una tendencia al aumento) entre los valores de LDH tras realizar la prueba (F) respecto a los valores del enzima antes del ejercicio (I) (Tablas 6.3.5 y 6.3.6), coincidiendo estos resultados con los hallados por Anthony *et al.*, (2003). El hecho de no observarse diferencias significativas antes y después del ejercicio podría deberse a las diferencias interindividuales halladas, que justifican que en este tipo de estudios se deban realizar ambas pruebas (placebo y con la bebida a estudio) sobre el mismo individuo.

Tampoco existen diferencias significativas al comparar los incrementos de LDH en los dos test [(AF-AI) vs (PF-PI)] (Tablas 6.3.5 y 6.3.6), lo que se podría interpretar como que los antioxidantes de la bebida no influyen en la concentración de LDH tras la realización de una actividad física intensa. Los resultados observados en la bibliografía respecto al comportamiento de la enzima LDH tras la realización de ejercicio son muy diversos en función del tipo de ejercicio, intensidad y duración de las pruebas, grado de entrenamiento de los sujetos, etc.

Tabla 6.3.5.- Prueba de normalidad: test de Kolmogorov-Smirnov. para LDH y CK en el pre(I),post-ejercicio(F) y sus incrementos (F-I) en ambas pruebas (A y P).

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
LDH AI (U/L)	.141	31	.122
LDH AF (U/L)	.211	31	.001
LDH PI (U/L)	.137	31	.146
LDH PF (U/L)	.097	31	.200
LDH AF-AI (U/L)	.281	31	.000
LDH PF-PI (U/L)	.161	31	.041

Ante los resultados obtenidos en las pruebas de normalidad, se aplica el test de Wilcoxon para comparar las distintas variables:

Tabla 6.3.6.- Prueba de Wilcoxon en LDH en el pre (I), post-ejercicio (F) y los incrementos (F-I) de LDH en ambas pruebas (A:Test con antioxidantes y P:Test placebo).

Prueba de Wilcoxon	LDH PI vs AI (U/L)	LDH AF vs AI (U/L)	LDH PF vs PI (U/L)	LDH (PF-PI)vs (AF-AI) (U/L)
Z	-.167	-.804	-1.764	-.343
Sig. asintót. (bilateral)	.868	.422	.078	.732

No se observa correlación entre CPK y LDH, lo que nos permite afirmar que en los ciclistas sometidos al estudio, (en los cuales se produce daño muscular, con aumento de CK y peroxidación lipídica, con aumento de TBARS, como se describe en los capítulos VI y V respectivamente), no se manifiesta de modo paralelo un incremento significativo en la actividad LDH.

CAPÍTULO VII

EFECTO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA OXIDACIÓN PROTEICA INDUCIDA POR LA ACTIVIDAD FÍSICA

*“ Por lo tanto, autodisciplinarse como el atleta que se priva de muchas cosas para
lograr el primer puesto”
(Primera carta a los Corintios)*

CAPÍTULO VII.- EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS EN LA OXIDACIÓN PROTEICA INDUCIDA POR LA ACTIVIDAD FÍSICA

7.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este apartado es analizar el efecto de la actividad física submaximal (70% VO₂ max) y de la ingestión de una bebida de reposición con compuestos fenólicos sobre la oxidación proteica, que se determina de forma indirecta en plasma, mediante la cuantificación de grupos carbonilo originados como consecuencia de la oxidación de proteínas.

La oxidación proteica *in vivo* puede afectar a una gran variedad de funciones celulares relacionadas con las proteínas: receptores, mecanismos de señal de traducción, sistemas de transporte, y enzimas. También contribuye secundariamente al daño de otras biomoléculas, como la inactivación de enzimas reparadoras del DNA (Berlett *et al.*,1997), disminución de la afinidad de polimerasas en la replicación del DNA, y el desarrollo de nuevos antígenos provocando respuestas autoinmunes.

La importancia fisiológica de la oxidación de las proteínas es bien conocida (Stadman *et al.*,1991; Berlett *et al.*,1997). Los niveles de carbonilos están aumentados en enfermedades como artritis reumatoide, en el músculo cardíaco dañado por procesos de isquemia reperusión y cuando se produce daño muscular tras un ejercicio intenso (Reznick *et al.*,1992). Diversos estudios han observado que sustancias antioxidantes, como la vitamina E, quelantes de metales, y L-propionilcarnitina, disminuyen la formación de grupos carbonilo en determinadas condiciones experimentales (Reznick *et al.*, 1992 a y b).

Las reacciones químicas causadas por el ataque de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS / RNS) sobre las proteínas son complejas (Dean, 1997),

y producen una gran variedad de productos, algunos no identificados, debido al número de aminoácidos presentes en las proteínas.

El método de valoración de los grupos carbonilo se ha desarrollado como una valoración general del daño oxidativo proteico, en tejidos animales y fluidos corporales (Levine *et al.*, 1990; Levine *et al.*, 1994).

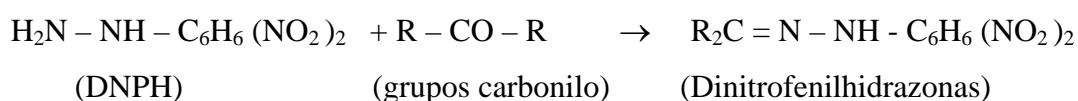
7.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1.- Material y Reactivos

- 1.- Muestras: plasma heparinizado
- 2.- Ac. Tricloroacético (TCA) 20 % (p/v)
- 3.- HCl 2N
- 4.- DNPH 0.24% (El DNPH se disuelve en HCl 2N)
- 5.- Mezcla etanol: etilacetato (1:1) (v/v)
- 6.- Urea 6M, pH=2,3 (se ajusta el pH con HCl conc.)
- 7.- Tampón fosfato 20 mM (fosfato monosódico)
- 8.- Las muestras se procesan en tubos de ensayo perfectamente lavados con agua milli-Q y secos.
- 9.- La centrifugación se realiza en centrífugas Eppendorf, mod. 5415-D (para obtención del plasma) y mod. 5810 (para análisis de carbonilos).
- 10.- El baño termostatzado con agitación continua que se utiliza en el procedimiento es Julabo, mod. Shake Temp. SW22.
- 11.- Las lecturas de Absorbancia se realizan en un espectrofotómetro Varian, mod. Cary 50 Bio UV-Vis. con intercambiador automático de cubeta.

7.2.2.- Método

El método de determinación de los grupos carbonilo se fundamenta en la reacción de las ERO con los residuos aminoácidos proteicos (particularmente Histidina, Arginina, Lysina y Prolina), para formar grupos carbonilo (Amici, 1989), que pueden reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para generar un cromógeno, las dinitrofenilhidrazonas:



Las muestras de sangre se extraen de la vena antecubital antes y 45 min. tras finalizar la prueba. La sangre se recoge en tubos heparinizados, se centrifugan a 6000 rpm /10 min. y se recoge el sobrenadante que se congela a -80°C hasta su posterior análisis.

Para el análisis de cada muestra o cada punto de la curva patrón se disponen 2 tubos (D y H): Tubo D : 200 μl plasma + 1 ml DNPH 0.24 % y Tubo H: 200 μl plasma + 1 ml HCl 2 N. Se agitan y dejan 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente, agitando cada 15 min.

A continuación se añade a cada uno de los tubos 1 ml de TCA 20 % (p / v). Agitar y dejar en hielo 10 min. Se centrifugan a 3800 g / 10 min. y se elimina el sobrenadante. A cada uno de los tubos se añade 1 ml de TCA 20 % (p / v) y se rompe el precipitado. Posteriormente se agitan y dejan en hielo 10 min. Se vuelven a centrifugar a 3800 g / 10 min., eliminando el sobrenadante y se lavan los precipitados adicionándoles 1 ml de la mezcla etanol:etilacetato. Los precipitados redissueltos se centrifugan a 3000 g / 5 min. y se elimina el sobrenadante. Este lavado con etanol:etilacetato se repite dos veces más.

A cada uno de los precipitados obtenidos se adiciona 1 ml de urea 6 M y se agita cada tubo durante 1 min., introduciendo a continuación en el baño los tubos a 37°C / 30 min. en agitación continua. Finalmente se vuelven a centrifugar los tubos a 3000 g / 5 min y se pasan los sobrenadantes a cubetas de espectrofotómetro.

Antes de realizar las lecturas de las muestras se disponen cubetas de espectrofotómetro con urea 6M para hacer el blanco a 370 nm. (A₀) y a continuación se leen los tubos a 370 nm. tanto los procesados con DNPH (A₁) como los tratados con HCl (A₂), para determinar nmol CO / ml plasma. Se leen los tubos con HCl a 280 nm (A₃), para determinar mg de proteínas totales / ml plasma (Reznick y Packer, 1994).

Como la concentración de proteína total en muestras plasmáticas es > 1mg / ml está más indicado hacer reaccionar el DNPH con las proteínas antes de precipitarlas, (así el método es mas reproducible y se asegura que reacciona mayor cantidad de proteína con el DNPH) (Reznick y Packer, 1994).

En nuestro laboratorio el coeficiente de variación intraensayo para la técnica es del 3,8% y en el interensayo es del 4,6%.

7.2.2.1.-Cálculos:

La Absorbancia debida a las fenilhidrazonas formadas se calcula por la diferencia $\Delta A = A_1 - A_2$. Como $A = \epsilon \cdot C \cdot d$, donde $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}$, C= concentración molar de dinitrofenilhidrazonas ; d = 1 cm.

$$\Delta A = \epsilon \cdot C ; C \text{ (nmol CO / ml)} = (A_1 - A_2) \cdot 45,45$$

La concentración de proteínas totales (mg / ml) se calcula según: $A_3 \cdot 1,8$

De este modo la cantidad de grupos carbonilo por mg de proteína se calcula según:

$$C \text{ (nmol CO / mg Prot.)} = \frac{(A_1 - A_2) \cdot 45,45}{A_3 \cdot 1,8}$$

El cálculo de la concentración total de proteínas mediante la medida a una absorbancia de 280 nm. de la solución de proteína en urea 6M, es una aproximación, que está justificada en base a que los resultados así obtenidos tienen una buena correlación ($r = 0.77$, $n = 43$) con la concentración de proteína calculada por el método azul de Coomassie (Evans *et al.*,1999). Además, como las pérdidas de proteína (y por tanto de los correspondientes carbonilos) son variables (10 – 15 %) durante el proceso de extracción y lavados (Reznick *et al.*,1994), es discutible expresar los valores de grupos carbonilo en base a la determinación proteica en el plasma inicial.

7.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron las proteínas totales plasmáticas por el método Lowry y se detectaron unas pérdidas debidas a los procesos de extracción y lavado de un 12%.

Los estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.3.1.

Tabla 7.3.1.- Estadísticos descriptivos de la oxidación proteica en ambas pruebas (A: suplementada con antioxidantes polifenólicos y P:placebo), durante el pre (I) y post (F) ejercicio y los correspondientes incrementos(F-I).

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
CO AI (nmol CO/mg proteína)	Media		1.0206	.11554
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.7847	
		Límite superior	1.2566	
CO AF (nmol CO/mg proteína)	Media		.7774	.09483
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.5837	
		Límite superior	.9711	
CO PI (nmol CO/mg proteína)	Media		.9026	.09797
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.7025	
		Límite superior	1.1027	
CO PF (nmol CO/mg proteína)	Media		1.0174	.12733
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.7574	
		Límite superior	1.2775	
CO AF-AI (nmol CO/mg proteína)	Media		-.2432	.07284
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-.3920	
		Límite superior	-.0945	
CO PF-PI (nmol CO/mg proteína)	Media		.1148	.09884
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-.0870	
		Límite superior	.3167	

Las elevadas variaciones interindividuales observadas en los valores de oxidación proteica (al igual que sucede al analizar la oxidación lipídica, Capítulo V) justifica que en este tipo de trabajos, en los que se estudia el efecto de la

suplementación con antioxidantes sobre el estrés oxidativo, sea necesario utilizar como control a los mismos sujetos que reciben la suplementación antioxidante.

Al someter todas las variables relacionadas con la oxidación proteica a la prueba de normalidad (Tabla 7.3.2) se observa que sólo las variables que se corresponden con incrementos (F-I) siguen una distribución normal:

Tabla 7.3.2.- Prueba de normalidad para la variables de la oxidación proteica en ambas pruebas (A: suplementada con polifenoles y P:placebo), durante el pre (I) y post (F) ejercicio y los correspondientes incrementos(F-I).

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
CO AI (nmol CO/mg proteína)	.173	31	.018
CO AF (nmol CO/mg proteína)	.218	31	.001
CO PI (nmol CO/mg proteína)	.142	31	.112
CO PF (nmol CO/mg proteína)	.184	31	.009
CO AF-AI (nmol CO/mg proteína)	.097	31	.200
CO PF-PI (nmol CO/mg proteína)	.088	31	.200

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los valores analizados de grupos carbonilo antes de iniciar las dos pruebas (AI vs PI), lo que se interpreta como homogeneidad de la muestra en el pre-ejercicio para ambos tests (Tabla 7.3.3).

Cuando los ciclistas ingieren la bebida rica en compuestos fenólicos, al finalizar el ejercicio se observan (Tabla 7.3.3) valores de carbonilos plasmáticos (AF= 0.78 ± 0.53 nmol CO/mg proteína) significativamente inferiores ($p < 0.05$) respecto a los valores en reposo (AI= 1.02 ± 0.64 nmol CO/mg proteína). Con el

placebo no se aprecian diferencias significativas entre los valores de grupos carbonilo en plasma (PF vs PI). Se ha de tener en cuenta que la muestra del estudio son deportistas en los que el régimen de entrenamiento al que están sometidos promueve una mejora del sistema de defensa antioxidante (Robertson *et al.*, 1991) y que la capacidad de oxidación proteica es inferior a la lipoperoxidación. Además, el diseño del estudio con la realización de una actividad física submaximal, no justifica que utilicen un alto porcentaje de proteínas como sustrato energético. Ante estas consideraciones es razonable que en las condiciones del estudio no se detecte un aumento significativo en la oxidación proteica.

Tabla 7.3.3.- Test de Wilcoxon en la oxidación proteica antes (I) y después (F) del ejercicio en ambas pruebas (A y B).

Prueba de Wilcoxon	CO PI vs AI (nmol CO/mg prt.)	CO AF vs AI (nmol CO/mg prt.)	CO PF vs PI (nmol CO/mg prot.)
Z	-.730	-2.861	-1.080
Sig. asintót. (bilateral)	.465	.004	.280

Cuando se comparan los incrementos, PF-PI vs AF-AI, se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambas pruebas; lo que indica que los compuestos polifenólicos de la bebida ejercen un efecto sobre la oxidación proteica. En el test que ingieren la bebida con compuestos fenólicos disminuye significativamente la concentración de grupos carbonilo tras el ejercicio (AF-AI: -0.24 ± 0.41 nmol CO/mg proteína, que supone una disminución del 23 %), mientras que tras la prueba con la bebida placebo sólo se aprecia una tendencia al aumento de la concentración de grupos carbonilo (PF-PI: 0.11 ± 0.55 nmol CO/mg proteína, que supone un aumento del 12 %) (Tabla 8.3.4.). O’Byrne *et al.*, (2002) muestran una disminución del 20% en la concentración de grupos carbonilo tras suplementar a los individuos con zumo de uva como fuente de flavonoides. En un estudio reciente Alessio *et al.*,(2001) comparan los incrementos “pre-post” en la

oxidación proteica (grupos carbonilo) entre un ejercicio aeróbico extenuante y otro isométrico anaeróbico, encontrando un 67% y un 12% de aumento respectivamente, que en el caso del ejercicio aeróbico se mantiene hasta 1 hora post-ejercicio y en el anaeróbico los valores de carbonilos se igualan a los del pre-ejercicio al cabo de una hora de finalizar la prueba.

Tabla 7.3.4.- Test T-Student en los incrementos post-ejercicio vs pre-ejercicio (F-I) de oxidación proteica para ambas pruebas (A y P).

Prueba de muestras relacionadas	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilat)
	Media	Desviac típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Infer.	Super.			
CO (AF-AI) vs (PF-PI) (nmol CO/mg prot.)	-.3581	.64162	.11524	-.5934	-.1227	-3.107	30	.004

El uso del método carbonilo se ha extendido hasta tal punto que muchos laboratorios, incluido el nuestro, han desarrollado protocolos individuales del mismo. A veces los procedimientos del ensayo no son descritos con detalle, y en este caso, pueden diferir del originalmente propuesto por el grupo de Stadtman, (1990). Este punto es importante, porque hay una considerable variación en los niveles basales de carbonilos proteicos en ciertos tejidos, dependiendo de cómo se haya realizado el ensayo. Por ejemplo, los niveles presentados para la corteza cerebral humana varían en el rango desde 1,5 hasta 6,4 nmol/mg de proteína. Sin embargo, en términos generales, son comparables los valores de carbonilos proteicos (< 1 nmol / mg proteína) presentados por muchos laboratorios que trabajan con plasma humano (Evans *et al.*,1999).

La acumulación de proteínas oxidadas refleja no sólo el índice de oxidación proteica sino también el índice de degradación de las proteínas oxidadas, que depende de muchos factores como son: la concentración de proteasas (que degradan preferentemente proteínas oxidadas), de iones metálicos, de inhibidores, activadores y reguladores proteicos, que afectan a las actividades proteolíticas. Por ejemplo, las formas oxidadas de algunas proteínas, las proteínas glicosiladas y los productos de la peroxidación lipídica no sólo resisten la proteólisis sino que pueden inhibir la capacidad de las proteasas para degradar las formas oxidadas de otras proteínas.

Los resultados obtenidos en este capítulo reflejan una disminución de la oxidación proteica en la prueba que los deportistas ingieren la bebida de reposición con compuestos polifenólicos vs placebo, lo que sugiere que los compuestos polifenólicos que contiene la bebida (antocianos mayoritariamente) presentan una capacidad antioxidante capaz de disminuir la oxidación proteica inducida por la actividad física y que el método utilizado para cuantificar la oxidación proteica es sensible a esta variación.

CAPÍTULO VIII

EFECTO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN EL ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICO INDUCIDO POR LA ACTIVIDAD FÍSICA

*“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”
(Albert Einstein)*

CAPÍTULO VIII.- EFECTO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN EL ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICO

8.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los ciclistas requieren mantener un elevado consumo de oxígeno durante períodos de tiempo prolongados, lo que supone una elevada producción mitocondrial de especies oxidantes. El ejercicio físico regular puede aumentar los mecanismos intracelulares de defensa antioxidante (Robertson *et al.*, 1991) pero esta adaptación no es totalmente efectiva y durante el ejercicio, por la contracción muscular, se liberan oxidantes al medio extracelular. En estas circunstancias el daño ocasionado por las ERO puede producirse en lugares del organismo distantes de aquel donde se originaron las ERO, por lo que los antioxidantes extracelulares (ascorbato, urato, α -tocoferol, β -caroteno, polifenoles, glutatión reducido y albúmina fundamentalmente) son muy importantes en la captura de radicales muy reactivos y su transformación en especies poco reactivas, minimizando así el daño oxidativo (Child *et al.*, 1999a).

El análisis del TAS plasmático se utiliza para determinar la contribución colectiva de los antioxidantes extracelulares en el plasma en un tiempo determinado, y el método utilizado en este trabajo refleja principalmente la contribución de grupos tiales de las proteínas, bilirrubina, urato y α - tocoferol. El análisis pretende, por lo tanto detectar el estado antioxidante total debido a los antioxidantes presentes que funcionan como reductores y donantes de hidrógeno. En un estudio sobre vinos de California y Nueva York, el TAS se correlaciona además con varios compuestos fenólicos (Frankel *et al.*, 1999).

En este capítulo se plantea como objetivo la determinación del estado antioxidante total (TAS) plasmático de cada individuo antes y después del ejercicio y en ambos test (con la bebida que contiene antioxidantes polifenólicos y con placebo),

para analizar el posible efecto de los compuestos polifenólicos de la bebida que ingieren los ciclistas sobre el estado antioxidante total plasmático, tras la realización de la actividad física en las condiciones del estudio.

8.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

8.2.1.- Material y reactivos

El estado antioxidante total (TAS) se analiza en plasma obtenido a partir de sangre extraída de la vena antecubital, antes y después (a los 45 minutos de finalizar el ejercicio) de cada una de las pruebas rectangulares en los ciclistas.

Las muestras de sangre son recogidas en tubos que contienen EDTA como anticoagulante y se centrifugan a 6000 rpm / 10 minutos (a 25° C) introducidas en tubos Eppendorf en una centrífuga de sobremesa (Eppendorf , mod. Centrifuge 5415 D). El plasma obtenido es congelado inmediatamente a – 80° C hasta su posterior análisis, evitándose los ciclos de congelación y descongelación. Para optimizar la estabilidad de las muestras y minimizar el proceso de peroxidación *in vitro*, la conservación se realiza en tubos libres de elementos traza.

El estado antioxidante total plasmático se determina espectrofotométricamente con un espectrofotómetro Varian Cary 50-Bio UV-Vis y los reactivos contenidos en el Kit comercializado para TAS por Randox Laboratories (Amtrim, UK)

8.2.2.- Método:

El fundamento del ensayo consiste en que la metamioglobina reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar especies radicalarias de ferrilmioglobina. El cromógeno ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfonato)) se incuba con la

ferrilmioglobina para producir el catión radical $ABTS^{+}$, relativamente estable de un color azul-verdoso que es medido a 600 nm. Los antioxidantes contenidos en las muestras añadidas causan la supresión de ese color, en un grado que es proporcional a su concentración (Miller *et al.*, 1993). El sistema se estandariza usando Trolox, un análogo hidrosoluble del α -tocoferol. La unidad de capacidad antioxidante en el plasma es la concentración (mM) de una disolución de Trolox que tiene una capacidad antioxidante equivalente a 1 ml del plasma se investiga. El rango del ensayo es de 0 a 2.5 mM de Trolox. El coeficiente de variación es del 6%, relativamente alto, comparado con otros métodos rutinarios en laboratorio clínico, lo que se puede deber principalmente a factores externos (estricto control de la temperatura y exactitud en el tiempo de las medidas, ya que se trata de una determinación cinética), lo que dificulta enormemente el manejo manual de la técnica. Los resultados son expresados en mmol/l plasma (mM).

8.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 8.3.1 se muestran los resultados descriptivos del estado antioxidante total en las dos pruebas (A:Prueba suplementada con polifenoles y P: Prueba con Placebo) antes de iniciar el ejercicio (I) y a los 45 min. de acabar las pruebas (F). Los resultados que se muestran en dicha tabla están corregidos considerando la variación del volumen plasmático que se produce en cada ciclista al finalizar las pruebas respecto a la situación del pre-ejercicio.

Los valores TAS obtenidos en los ciclistas en el pre y post-ejercicio son inferiores a los valores de referencia en adultos (1,30-1,77 nmol/L plasma). No obstante como este rango fue determinado en población activa europea, habría que establecer los valores de referencia a nivel nacional, ya que puede haber variaciones regionales debido a factores genéticos o de hábitos alimentarios, por ejemplo.

Al aplicar a las distintas variables el test de Wilcoxon (Tabla 8.3.3), ya que se trata de variables que no siguen una distribución normal (Tabla 8.3.2), no se aprecian diferencias significativas entre los valores del TAS antes de realizar el ejercicio en ambas pruebas, lo que pone de manifiesto la homogeneidad de la población en la situación previa a realizar los test.

Tampoco existen diferencias significativas en el estado antioxidante total plasmático antes y después del ejercicio en ninguna de las pruebas (F vs I), ni cuando se comparan los incrementos entre el test placebo y el suplementado con la bebida que contiene antioxidantes polifenólicos (PF-PI) vs (AF-AI).

Tabla 8.3.1.- Estadísticos descriptivos del TAS en ambas pruebas (P: Placebo y A: Suplementada con antioxidantes, mayoritariamente polifenólicos), en el pre-ejercicio (I) y a los 45 min. de finalizar el ejercicio (F).

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
TAS AI (TEAC mM)	Media		1.0084	.11706
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.7693	
		Límite superior	1.2474	
TAS AF (TEAC mM)	Media		.9523	.06975
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.8098	
		Límite superior	1.0947	
TAS PI (TEAC mM)	Media		.9084	.09277
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.7189	
		Límite superior	1.0979	
TAS PF (TEAC mM)	Media		1.0110	.10774
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	.7909	
		Límite superior	1.2310	
TAS AF-AI (TEAC mM)	Media		-.0561	.12779
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-.3171	
		Límite superior	.2049	
TAS PF-PI (TEAC mM)	Media		.1026	.05229
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-.0042	
		Límite superior	.2094	

Al aplicar la prueba de normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov, como se aprecia en la tabla siguiente, ninguna de las variables sigue una distribución normal:

Tabla 8.3.2.- Test de Kolmogorov-Smirnov en las variables de TAS en ambas pruebas (P: Placebo y A: Suplementada con antioxidantes, mayoritariamente polifenólicos), en el pre-ejercicio (I) y a los 45 min. de finalizar el ejercicio (F).

Pruebas de normalidad	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
TAS AI (TEAC mM)	.271	31	.000
TAS AF (TEAC mM)	.207	31	.002
TAS Pi (TEAC mM)	.242	31	.000
TAS PF (TEAC mM)	.279	31	.000
TAS AF-AI (TEAC mM)	.310	31	.000
TAS Pf-PI (TEAC mM)	.195	31	.004

Ante esta situación se comparan las variables mediante el test de Wilcoxon:

Tabla 8.3.3.- Test de Wilcoxon entre las variables de TAS en ambas pruebas (P: Placebo y A: Suplementada con antioxidantes, mayoritariamente polifenólicos), en el pre-ejercicio (I) y a los 45 min. de finalizar el ejercicio (F) y entre los incrementos (PF-PI) vs (AF-AI).

Test de Wilcoxon	TAS PI vs TAS AI (TEAC mM)	TAS AF vs TAS AI (TEAC mM)	TAS PF vs TAS PI (TEAC mM)	TAS PF-PI vs TAS AF-AI (TEAC mM)
Z	-.123	-1.512	-1.804	-.470
Sig. asintót. (bilateral)	.902	.131	.071	.638

El porcentaje de variación fue del 5.6% de disminución en el TAS durante el test suplementado con antioxidantes y del 11.3% de aumento en el TAS durante el test placebo. El que no aparezcan diferencias significativas al comparar la variación del TAS en ambas pruebas, nos indica que los compuestos polifenólicos de la bebida que ingieren los ciclistas del estudio no ejerce ningún efecto sobre el estado antioxidante total plasmático de los sujetos, o bien que no se detecta según el método utilizado en el estudio, por lo que en esta situación resultaría adecuado un análisis individualizado de antioxidantes como glutathion peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, así como de los niveles de polifenoles plasmáticos.

A la vista de los resultados anteriores (capítulos V y VII) en peroxidación lipídica y oxidación proteica, cabría esperar que los ciclistas que han tomado la bebida rica en compuestos fenólicos presentasen tras finalizar el test una mayor capacidad antioxidante en plasma que aquellos que ingieren la bebida placebo. Sin embargo, observamos que en el test placebo pese al aumento del metabolismo oxidativo durante el ejercicio (determinado como aumento en la peroxidación lipídica), la capacidad antioxidante total plasmática también muestra una tendencia al incremento tras el ejercicio, que no es suficiente para contrarrestar el incremento en la formación de ERO a nivel mitocondrial, como se deduce al observar el incremento de los niveles de TBARS plasmáticos al finalizar la prueba placebo respecto al pre-ejercicio.

Child *et al.*, (1998) observaron en un trabajo con individuos entrenados que el incremento de la capacidad antioxidante total plasmática no se corresponde con una disminución en los valores de MDA. Tessier *et al.*, (1995) tras una suplementación a deportistas con Selenio tampoco apreciaron variaciones en el estado antioxidante total en plasma.

Schröder *et al.*, (2000) tras analizar el estado antioxidante total (con el mismo método que nosotros hemos utilizado en el laboratorio) sobre dos grupos de

jugadores profesionales de baloncesto, uno suplementado con una mezcla de antioxidantes (α -tocoferol, β -caroteno, y ac. ascórbico) y otro al que se administraba un placebo durante 32 días, tampoco encontraron diferencias significativas en el TAS entre los dos grupos estudiados, y sí disminuyó significativamente la peroxidación lipídica en el grupo suplementado.

El que los compuestos fenólicos actúen como captadores primarios sugiere que el organismo del ciclista cuando ingiere estos antioxidantes no precise aumentar el sistema antioxidante fisiológico, sin embargo cuando los ciclistas ingieren el placebo, al presentar mayores niveles de TBARS precisan aumentar las defensas antioxidantes fisiológicas, al realizar la prueba. No obstante, en los resultados no se aprecian diferencias significativas entre las dos pruebas posiblemente debido a la enorme variabilidad que existe entre los individuos. Esto justificaría una vez más, la necesidad de que en este tipo de estudios se trabaje con la misma población como placebo y como prueba de la suplementación a estudio.

Los antioxidantes primarios presentes en el plasma incluyen también ceruloplasmina y transferrina, que contribuyen al resultado del TAS debido a su capacidad de secuestrar el cobre y el hierro, respectivamente y son responsables del 90% del valor TAS aproximadamente y del 10% restante son responsables cisteína, glutatión reducido, β -caroteno, dihidrolipoato, α -tocoferol, polifenoles y ubiquinona, entre otros. De este 10% restante, según Whitehead *et al.* (1992), el urato contribuye con el 40-45%, los grupos sulfidrilo con 40-45%, el ascorbato con el 10% y la vitamina E con el 3%. Es obvio a la vista de estos datos que la contribución de los polifenoles de la bebida al estado antioxidante total plasmático supone un mínimo porcentaje (aún no recogido en la bibliografía) que resulta difícil de detectar al analizar el estado antioxidante total en el plasma. En este sentido el trabajo de Schofield y Braganza (1996) critica este método al observar grandes variaciones en muestras de suero con relación al tiempo en que se realiza la determinación y también demuestran que el ascorbato, ácido úrico y albúmina presentan diferentes cinéticas de reacción.

Por todo ello, se considera que para analizar el efecto de los antioxidantes de la bebida sobre el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico son más adecuados los métodos relativos a los biomarcadores de la oxidación lipídica y proteica (Capítulos V y VII) que la determinación del estado antioxidante total plasmático, ya que este último adolece de una falta de especificidad y de sensibilidad hacia los compuestos fenólicos.

CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

*“Las teorías nos abandonan, los hechos nos defienden”
(Santiago Ramón y Cajal)*

DISCUSIÓN

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos al analizar el efecto de una bebida de reposición con antioxidantes polifenólicos sobre el estrés oxidativo inducido por la actividad física en un grupo de ciclistas varones sometidos a un entrenamiento de 20 horas semanales. La actividad física que desarrollan en el laboratorio consiste en un ejercicio físico submaximal ($VO_{2\text{ max}} 70\%$) que realizan pedaleando durante 90 minutos en cicloergómetro.

La bebida de reposición diseñada contiene antioxidantes polifenólicos (procedentes de concentrados de uva, frambuesa y grosella), ya que otros componentes como ácido ascórbico y citrato sódico se adicionan en muy pequeña cantidad como conservantes para evitar los procesos de degradación oxidativa en la bebida, y a esa concentración tan baja no son capaces de ejercer un efecto antioxidante detectable en el organismo.

Aunque diversos estudios (Markakis, 1974; Havlikova *et al.*, 1985 y Shenoy, 1993) encontraron que se produce un incremento de la destrucción de los antocianos (polifenoles mayoritarios en la bebida) con un aumento de la temperatura; los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la capacidad antioxidante de la bebida (TEAC 0.41 mM Trolox / mL bebida) no varía significativamente durante 6 meses de almacenamiento en oscuridad a las tres temperaturas estudiadas (20, 30 y 37° C), lo que asegura que la bebida administrada a los ciclistas mantiene su capacidad antioxidante cuando es consumida durante los 6 meses siguientes a su elaboración (Capítulo III). Estos resultados coinciden con los obtenidos por García-Alonso *et al.*, (2003) que observan en un postre de frutas elaborado con uva negra y frutas rojas (ricas en polifenoles) que no se produce una disminución en la actividad antioxidante (y sí una disminución en el contenido de vitamina C) durante el almacenamiento del postre

estudiado. Los deportistas ingieren en una prueba (A) 1600 mL de bebida con compuestos polifenólicos, que contienen una capacidad antioxidante total equivalente a la de una disolución 656 mM Trolox. En otra prueba (B) ingieren una bebida placebo (también 1600 mL) que no tiene ninguna capacidad antioxidante.

El ciclismo exige un entrenamiento de resistencia y supone la realización de una actividad física intensa y de larga duración, por lo que este grupo constituye un modelo para estudiar el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico.

Tras la realización del ejercicio submaximal se observa en ambas pruebas una elevación significativa ($p < 0.05$) en los valores plasmáticos de la actividad enzimática creatinaquinasa, de lo que se deduce la aparición de daño muscular inducido por la actividad física (Agarwal *et al.*, 1999). Los incrementos observados en la actividad CK (capítulo VII) coinciden con los observados en otros trabajos relativos al desarrollo de una actividad física intensa (Vicent *et al.*, 1997; Child *et al.*, 1999 y Schwane *et al.*, 2000). Los resultados muestran una gran variabilidad interindividual en los valores de CK (51-812 U/L) coincidiendo con la encontrada en otros estudios (Hartmann *et al.*, 2000).

Para cuantificar el grado de estrés oxidativo se ha utilizado como biomarcador de la peroxidación lipídica el análisis espectrofotométrico de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico en plasma (TBARS) (Buege *et al.*, 1978). La extracción de sangre para la determinación de TBARS ha de realizarse en el mismo instante de finalizar el ejercicio (F_0) ya que en los minutos posteriores se recuperan los valores previos al ejercicio, (Lovlin *et al.*, 1987; Krotkiewski *et al.*, 1996). En nuestro trabajo, a pesar del reducido tamaño de muestra en que se han realizado las determinaciones F_0 , se detecta un aumento significativo de los valores TBARS en el momento inmediato tras finalizar las pruebas (F_0) respecto al pre-ejercicio (I), sin apreciarse diferencias significativas entre ambas pruebas (A y P) para los incrementos calculados ($F_0 - I$). Durante 90 minutos

de actividad física submaximal ($\text{VO}_2 \text{ max}$ 70%) en el organismo se incrementa la utilización de las grasas como combustible energético, pero éstas no proceden de los ácidos grasos plasmáticos ni de las reservas del tejido adiposo sino que el sustrato lipídico utilizado como combustible energético es grasa intramuscular (Córdova, 2003), por lo que en estas condiciones del estudio tratándose de deportistas entrenados, está justificado un escaso incremento, indetectable con el método utilizado, de la peroxidación lipídica. No obstante en el test placebo se aprecia una tendencia superior al incremento de lipoperoxidación (5,6 %) al compararla con el test suplementado con la bebida rica en polifenoles (1,8 %) (capítulo V). Las elevadas variaciones interindividuales encontradas también sugieren que resulta necesario ampliar el tamaño de la muestra para analizar las diferencias en los dos sentidos mencionados (pre-ejercicio *vs* post-ejercicio y prueba A *vs* prueba P).

Cuando se comparan los valores TBARS a los 45 min. de finalizar el ejercicio con los previos al ejercicio no se hallan diferencias significativas en ninguna de las pruebas (A y P). Estos resultados coinciden con los hallados por Dufaux *et al.*, (1997) que tampoco observaron cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de TBARS inmediatamente después, ni en tiempos posteriores al ejercicio respecto a la situación de pre-ejercicio. Lovlin *et al.*, (1987) observaron en humanos que tras realizar una actividad física al 100% del $\text{VO}_2 \text{ max}$ incrementaban los niveles de MDA respecto al reposo, mientras que cuando se realizaba la actividad física al 70% del $\text{VO}_2 \text{ max}$ (igual que en nuestro trabajo) no se producía tal aumento, disminuyendo los niveles de MDA respecto a los valores en reposo; los autores sugieren que la realización de una actividad física submaximal puede inhibir la peroxidación lipídica.

Existen otros trabajos en los que se observa que tras realizar una actividad física se produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de productos derivados de la oxidación lipídica (Davies *et al.*, 1982; Manghan *et al.*, 1989; Ji *et al.*, 1992; Chao *et al.*, 1999); en alguno de ellos se ha observado también que este aumento se relaciona con la

intensidad de la actividad física realizada. Otro dato que se desprende de estos estudios es que en las personas entrenadas el aumento de TBARS observado es menor que en las sedentarias o no se aprecia tal aumento tras el ejercicio (Viinikka *et al.*, 1984; Jenkins *et al.*, 1999). Los ciclistas del presente trabajo siguen un ritmo de entrenamiento de 20 h/semana, por lo que la ausencia de incremento en la peroxidación lipídica puede indicar la existencia de un efecto protector de la práctica regular de esta actividad física.

Con los datos disponibles en la actualidad, se puede sostener la hipótesis de que tras una actividad física uno de los efectos protectores del entrenamiento podría basarse en que se produjeran menos especies reactivas de oxígeno (y concretamente de radicales libres) por una mayor eficiencia metabólica, ya que se consume menos cantidad de oxígeno para obtener la misma cantidad de energía (Hartman *et al.*, 2000).

Está aceptado que todos los indicadores no se correlacionan de igual forma ante el daño oxidativo, por lo que resulta adecuado valorar el grado de estrés oxidativo mediante la utilización de diversos biomarcadores. Es por ello que en este trabajo también se ha analizado la oxidación proteica en plasma (grupos carbonilo) como otro biomarcador del daño oxidativo inducido por la actividad física, y que permite evaluar el efecto de la bebida de reposición rica en antioxidantes polifenólicos (Capítulo VIII) ya que por un lado, al realizar una actividad física submaximal durante 90 minutos alrededor del 14% de la energía que obtiene el organismo es a partir de la oxidación proteica (Costill *et al.*, 1981), y por otro hay que considerar la existencia de un alto turnover proteico, no sólo por el ciclo de la alanina, sino por la microlesión muscular inducida por el ejercicio. Sin embargo el que la muestra de estudio esté constituida por deportistas entrenados y que el sustrato lipídico sea más sensible que el proteico a la oxidación, justifica que no aparezcan diferencias significativas cuando se comparan los valores de los grupos carbonilo y sí los TBARS entre el principio y el final de la prueba placebo.

De los resultados de oxidación proteica se deduce que los ciclistas presentan unos valores previos al ejercicio sin diferencias significativas entre ambas pruebas, lo que asegura una homogeneidad en la situación del pre-ejercicio (como consecuencia de que cada ciclista actúa como su propio control), que permite comparar las variaciones producidas en los dos test (placebo y suplementado con antioxidantes).

Para analizar el efecto de la bebida con antioxidantes polifenólicos se comparan los incrementos (F-I) de la oxidación proteica entre las dos pruebas. Mientras que en la prueba placebo se observa una tendencia al aumento (12 %) en la oxidación proteica al respecto al pre-ejercicio (resultados que concuerdan con los hallados por Alessio *et al.*, 2000); cuando los ciclistas realizan la prueba suplementada con la bebida rica en polifenoles se aprecia una disminución significativa del 23% ($p < 0.05$) en la oxidación proteica, coincidiendo estos resultados con los hallados por O'Byrne *et al.*, (2002) que muestran una disminución del 20% en la oxidación proteica en individuos suplementados con flavonoides procedentes de zumo de uva.

Para evaluar el efecto de la bebida de reposición rica en antioxidantes polifenólicos sobre el estrés oxidativo se comparan los incrementos en la oxidación proteica (postejercicio – preejercicio) entre ambas pruebas y se observa que en la prueba placebo dicho incremento es significativamente superior ($p < 0.05$) respecto a la prueba suplementada con los antioxidantes polifenólicos. Estos resultados sugieren que los polifenoles (mayoritariamente flavonoides antociánicos) de la bebida ejercen un efecto protector del daño oxidativo proteico inducido por la actividad física en los ciclistas del estudio como consecuencia de la actividad captadora de radicales libres de los flavonoides frente a especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Packer *et al.*, (1999b). Rice-Evans *et al.*, (1996) observaron que los polifenoles, principalmente quercetina, catequina y ésteres de los ácidos gálico y cafeico, presentaron un efecto protector de la toxicidad inducida por el peróxido de hidrógeno en células bacterianas y en células de

mamíferos; frente al α -tocoferol que no resultó ser efectivo. Del mismo modo, Horáková *et al.*, (2003) demuestran que extractos estandarizados de flavonoides incrementan la viabilidad de cultivos celulares tratados con peróxido de hidrógeno y resultan ser más efectivos que el Trolox.

La valoración del grado de estrés oxidativo mediante los biomarcadores de oxidación lipídica y proteica que se realiza en este trabajo, se complementa con la determinación del estado antioxidante total plasmático.

El sistema primario de defensa frente al estrés oxidativo en fluidos extracelulares está constituido por moléculas hidro y liposolubles, que son producidas durante el metabolismo (ácido úrico, bilirrubina, albúmina, etc.) o introducidas en el organismo a través de la dieta en forma de alimentos ricos en antioxidantes (vitamina C, vitamina E, polifenoles, etc.). La suma de los antioxidantes endógenos y exógenos representa la capacidad antioxidante total de los fluidos extracelulares. Las variaciones en los niveles de estos antioxidantes reflejan su consumo durante estados agudos de estrés oxidativo, como resulta tras una actividad física intensa.

Es conocido que el efecto sinérgico que se produce como consecuencia de la cooperación entre varios antioxidantes proporciona al organismo una mayor protección frente al ataque de las ERO y las ERN que la que aporta un solo componente antioxidante (Malliaraki *et al.*, 2003). Por ello y considerando el efecto sinérgico de todos los antioxidantes presentes en el plasma, la información obtenida a partir de la capacidad antioxidante total es más relevante desde un punto de vista biológico que la obtenida a partir de la medida de actividades antioxidantes individuales (Ghiselli *et al.*, 2000). Una teoría reciente, que considera los potenciales redox de los antioxidantes endógenos y exógenos postula que, en la cascada de reacciones que se producen durante

el estrés oxidativo, a partir de antioxidantes potentes se generan compuestos con menor actividad antioxidante (Barbaste *et al.*, 2002).

En el caso del plasma el estado antioxidante, determinado como capacidad antioxidante total, es la combinación de todos los procesos antioxidantes-redox incluyendo sustancias como el ácido úrico o las proteínas con grupos tioles.

Un aumento en la capacidad antioxidante total del plasma sugiere una absorción de antioxidantes y una mejora del estado antioxidante *in vivo* (Cao *et al.*, 1998) o bien el resultado de la activación de un mecanismo de adaptación al estrés oxidativo, que es la base del efecto protector del entrenamiento frente al estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico. Sin embargo, debido a la contribución de diversos metabolitos en la capacidad antioxidante del plasma humano, el incremento de la misma puede ser el resultado de determinadas situaciones patológicas como la elevación de ácido úrico en alteraciones renales o el incremento de bilirrubina en la ictericia (Jackson *et al.*, 1995). En el caso del estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico, la liberación de proteínas al torrente sanguíneo como consecuencia de un elevado catabolismo muscular, es posible que influya en los niveles de la capacidad antioxidante plasmática y ello pueda enmascarar los efectos de los antioxidantes exógenos sobre la misma.

Además altas concentraciones de metabolitos, como el ácido úrico, pueden tener efectos prooxidantes que conllevan una disminución de la capacidad antioxidante plasmática (Abuja, 1999). La eliminación de ácido úrico modifica el equilibrio entre los estados oxidado y reducido de los antioxidantes endógenos y exógenos (Canestrari *et al.*, 1995; Hultqvist *et al.*, 1997). En un trabajo reciente se postula que la eliminación de antioxidantes metabólicos hidrosolubles (bilirrubina, ácido úrico, etc.) modifica el equilibrio de los antioxidantes hidro y liposolubles (Barbaste *et al.*, 2002).

En nuestro estudio los resultados no muestran variaciones significativas en la capacidad antioxidante plasmática de los ciclistas tras la realización de la prueba de esfuerzo (90 min. pedaleando en cicloergómetro al 70% de VO_2 max.) respecto a los valores obtenidos antes de iniciar la prueba. Tampoco se aprecian diferencias significativas en la capacidad antioxidante plasmática de los ciclistas como consecuencia de la ingestión de la bebida rica en antioxidantes polifenólicos (Capítulo IX). Durante la actividad física extenuante aumenta el nivel de ácido úrico (Gómez-Cabrera *et al.*, 2002) el que contribuye con un 19,3 % a la capacidad antioxidante total plasmática, frente a una escasa contribución de antioxidantes exógenos como el ácido ascórbico (3,1 %) y α -tocoferol (1,7 %) (Cao *et al.*, 1998). Todo ello sugiere que los compuestos polifenólicos, responsables de la capacidad antioxidante de la bebida que ingieren los ciclistas de nuestro estudio, pese a tener una capacidad antioxidante superior al ácido ascórbico y al α -tocoferol, su escasa biodisponibilidad y por lo tanto su escasa contribución a la capacidad antioxidante plasmática no sea suficiente para modificar el estado antioxidante total plasmático en los deportistas estudiados. Sin embargo, los resultados observados (Capítulo IX) en la disminución de los niveles de grupos carbonilo (como marcadores de la oxidación proteica) en los ciclistas cuando ingieren la bebida rica en polifenoles frente a esos mismos ciclistas cuando ingieren una bebida placebo, indican una disminución en el daño oxidativo inducido por la actividad física pese a permanecer invariable su estado antioxidante total en plasma. Sin embargo, Rossi *et al.*, (2000) han demostrado una mejora en el estado antioxidante y una disminución del daño oxidativo inducido por el ejercicio con la ingestión de soja y sugieren que las isoflavonas (otros flavonoides) de la soja son las responsables de esta mejora.

Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos durante este estudio en diferentes biomarcadores de estrés oxidativo en plasma (peroxidación lipídica, oxidación proteica, enzimas creatinaquinasa y lactato deshidrogenasa, y estado antioxidante total), se observa que el análisis de la oxidación proteica es el biomarcador que en las

condiciones de este trabajo refleja la aparición de estrés oxidativo como consecuencia de la actividad física realizada durante 90 min. al 70% de VO_2 max en cicloergómetro y que, las elevadas variaciones interindividuales observadas en todos los biomarcadores sugieren que en este tipo de estudios resulte crucial utilizar la misma muestra poblacional como su propio control.

CAPÍTULO X

CONCLUSIONES

“Ninguna persona de temperamento científico afirma que lo que ahora es creído en ciencia sea exactamente verdad; afirma que es una etapa en el camino hacia la verdad”
(Bertrand Russell)

CONCLUSIONES

1. En ciclistas entrenados la actividad física aeróbica desarrollada en las pruebas de esfuerzo realizadas en el laboratorio durante 90 minutos al 70 % de VO_2 max genera daño muscular y estrés oxidativo inducidos por el ejercicio.
2. Se ha utilizado una bebida con antioxidantes polifenólicos que frente a un placebo ha demostrado que disminuye el grado de oxidación proteica ocasionado por la actividad física.
3. La bebida diseñada con antioxidantes polifenólicos mantiene constante la capacidad antioxidante durante un período de seis meses, lo que permite su comercialización como bebida de reposición para deportistas.
4. Las elevadas variaciones interindividuales observadas en los biomarcadores analizados justifican que para estudiar el efecto de antioxidantes sobre el estrés oxidativo resulta necesario utilizar como control a los mismos sujetos que reciben la suplementación antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295:230-234.

Abuja PM. Ascorbate prevents prooxidants effects of urate in oxidation of human low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1999; 446(1):305-308.

Adams JR, Ongley MH. Changes in the polyphenols of red fruits during processing. The kinetics and mechanism of anthocyanin degradation. *Campden Food Preserv Res Assoc Bull* 1972; 6:2-13.

Adams JR, Ongley MH. The degradation of anthocyanins in canned strawberries. Effect of various processing parameters on the retention of pelargonidin 3-glucoside. *J Food Tech* 1973; 8:139-145.

Agarwal MM, Ankra-Badu GA. Serum creatine kinase: a marker for muscle damage in sickle cell painful crisis. *Ann Saudi Med* 1999; 19(3):264-266.

Ahmad MS, Fazal F, Rahaman M. Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis* 1992; 13:605-608.

Aikens J, Dix TA. Peroxyl radical (HOO·) initiated lipid peroxidation: The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 1991; 266(1):15091-15098.

Alessio HM, Cutler RG. Evidence that DNA damage and repair cycle activity increases following a marathon race. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1990; 22(S126): 751-756.

Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32(9):1576-1581.

Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, Carbonell LF. Plasma redox status relates to severity in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000; 28(6):1812-1814.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:7915-7922.

Amici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem* 1989; 264(6):3341-3346.

Amstad PA, Krupitza G, Cerutti PA. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res* 1992; 52:3952-3960.

Anderson BO, Browm JM, Bensard DD. Reversible lung injury neutrophil acumulation on cause lung injury by elastase meoliatol mechanisms. *Surgery* 1990; 108:262-267.

Andersson P, Henriksson J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle in man: adaptative response to exercise. *J Appl Physiol* 1977; 270:677-690.

Andriambeloson E. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr* 1998; 128(12):2324-3333.

Anthony ME, Sparks K, Little K, Rood A, Vangelos Z. Skeletal and Cardiac Muscle Enzyme Changes During Marathon Running in Elite and Non-Elite Runners.[en línea] [fecha de acceso 11 de enero de 2003] URL disponible en: <http://www.run-insight.com/RI-SS-FinalMarathonStudy.doc>

Aruoma OI. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants in Human Health and Disease. *J Am Oil Chem Soc* 1998; 75(2):199-212.

Aruoma OI, Halliwell B. DNA damage and free radicals. *Chem Brit* 1991; 2:149-152.

Atalay M, Marnila P, Lilius EM, Hanninen O, Sen CK. Glutathione-dependant modulation of exhausting exercise induced changes in neutrophil function in rats. *J Appl Physiol* 1996; 74:342-347.

Bacon BR, Britton RS. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? *Hepatology* 1990; 11:127-131.

Bailey DM, Williams C, Markovitch D, Dean A, Webb JMM, Powell JR. Recovery from prolonged intermittent shuttle running following 9 days of ascorbic acid supplementation. *Physiology* 2002 [en línea] [fecha de acceso 6 de febrero de 2003]; 539 (67). URL disponible en: <http://www.physoc.org/publications/proceedings/archive/article.asp?ID=539PS145>.

Bakker J, Timberlake C. The mechanism of colour changes in port wines. *Am J Enol Vitic* 1986; 37:288-292.

Balke PO, Snider MT, Bull AP. Evidence for lipid peroxidation during moderate exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1984; 16:181.

Ballester M. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Med Clin* 1996; 107:509-515.

Barbaste M, Verge S, Dumas M, Soulet S, Nay B, Arnaudinaud V et al. Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks. *J Nutr Health Aging* 2002; 6:138-152.

Barclay JK, Hansel M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69:279-284.

- Bate-Smith EC. Detection and determination of ellagitannins. *Phytochemistry* 1972; 11:1153-1156.
- Bechman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78:547-581.
- Beckman J, Tsai J. Reactions and diffusion of nitric oxide and peroxynitrite. *Biochemistry* 1994; 16(1):8-10.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272(3):20313-20316.
- Bernstein C, Bernstein H. DNA repair with emphasis on single-strand damages. *Aging, sex and DNA Repair*. San Diego (California): Academic Press; 1991.
- Bertelli A. *Relazione farmacotossicologica*. [Tesis Doctoral] Indena S.P.A.: Università degli Studi di Pisa.; 1982.
- Bertuglia S. Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on ischemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Pharm Res* 1995; 31(3-4):183-187.
- Beutner S, Bloedorn B, Frixel S, Hernández Blanco I, Hoffmann T, Martin HD et al. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of beta-carotene in antioxidant functions. *J Sci Food Agric* 2001; 81(6): 559-568.
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 2001; 90(1):157-177.
- Bishop NC, Blannin AK, Walsh NP, Gleeson M. Carbohydrate beverage ingestion and neutrophil degranulation responses following cycling to fatigue at 75% VO₂ max. *Int J Sports Med* 2001; 22:226-231.
- Blake DR, Rallen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull* 1987; 45:371-385:371-385.
- Blot WJ, Li JY, Taylor PR. Nutrition intervention trials in Lixian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1483-1492.
- Borissova P. Anti-inflammatory effects of flavonoids in the natural juice from *Aronia melanocarpa*, rutin, and rutin-magnesium. Complex on an experimental model of inflammation induced by histamine and serotonin. *Acta Physiol Pharmacol Bulgarica* 1994; 20(1):25-30.

- Boros M, Karacson G, Kaczaki J, Nagy S. Reperfusion mucosal damage after complete intestinal ischemia in the dog. The effects of an oxidant and phospholipase A2 inhibitor therapy. *Surgery* 1993; 113:184-191.
- Bors W, Heller W, Christa M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990; 186:343-355.
- Bors W, Michel C, Schikora S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 1995; 19:45-52.
- Boveris A, Cadenas E, Reiter R, Filipkowski M, Nakase Y, Ghance B. Organ chemiluminescence: Noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 77(1):347-351.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Technol* 1995; 28(25):30-37.
- Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basílico MJ, Wikinski RW et al. Soccer Players under regular training Show Oxidative Stress but an Improved Plasma Antioxidant Status. *Clin Sci* 1999; 96:381-385.
- Brooks GA, Fahey T. *Exercise Physiology: Human Bioenergetics and Its Application*. New York: 1984.
- Brouillard R. *Chemical structure of anthocyanins: Anthocyanins as Food Colors*. New York: Academic Press; 1982.
- Brouillard R, Delaporte B. Chemistry of anthocyanins pigments II. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J Am Chem Soc* 1977; 99:8461-8468.
- Brozovic M, Anionwu E. Sick cell disease in Britain. *J Clin Pathol* 1984; 37:1321-1326.
- Brutto M, Nosek TN. Hydrogen peroxide disrupts calcium release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 1996; 81:731-737.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52(1):302-310.
- Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 51(1):79-110.
- Cadenas E. Mechanism of antioxidant activity. *Biofactors* 1998; 6:391-397.

Cadenas E. Sustancias flavonoides [Rev. Temática] [en línea] [fecha de acceso 11 de diciembre de 2002]; URL disponible en: <http://www:antioxidantes.com.ar/12/>

Cadenas E, Packer L., editores. Handbook of antioxidants. New York: 1996.

Caldarera CM, Guarnieri C, Lazzari F. Catalase and peroxidase activity of cardiac muscle. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1973; 49:72-77.

Calvi JP, Francis FJ. Stability of concord grape (*V. Labrusca*) anthocyanins in model systems. *J Food Chem* 1978; 43:1448-1456.

Canestrari F, Buoncristiani U, Galli F, Giorgini A, Albertini MC, Carobi C et al. Redox state, antioxidative activity and lipid peroxidation in erythrocytes and plasma of chronic ambulatory peritoneal dialysis patients. *Clin Chim Acta* 1995; 234(1):127-136.

Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity following consumption of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:1081-1087.

Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(5):749-760.

Carr AC, Winterbourn CC, van der Berg JJM. Chlorination of Cholesterol in Cell membranes by Hypochlorous Acid. *Arch Biochem Biophys* 1996; 332:63-69.

Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotions. *Science* 1985; 227:375-381.

Chao W-S, Askew EW, Roberts DE, Wood SM, Perkins JB. Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. *J Nutr* 1999; 129(11):2009-2012.

Chatard JC, Boutet C, Tourny C, Garcia S, Berthouze S, Guézennec C-Y. Nutritional status and physical fitness of elderly sportsmen. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1998; 77(1-2):157-163.

Child RB, Brown S, Day S, Donnelly AE, Ropper H, Saxton JM. Changes in indices of antioxidants status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin Sci* 1999; 96(1):105-115.

Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL. Resting serum antioxidant status is positively correlated with peak oxygen uptake in endurance trained runners. *J Sports Med Phys Fitness* 1999; 39(4):282-284.

Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30(11):1603-1607.

- Choe M, Jackson C, Yu BP. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:977-984.
- Chung MS, Park H, Chang WH. The values of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase in Korean Olympic athletes during training season. 5th IOC Congress on Sport Sciences with the Annual Conference of Science and Medicine in Sports; 1999.
- Cimino F, Espósito F, Ammendola R. Gene regulation by reactive oxygen species. *Curr Top Cell Regul* 1997; 35(1):123-147.
- Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35(1-2):131-141.
- Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72(2S):637-646.
- Clausen J, Nielsen SA, Kristensen M. Biochemical and Clinical Effects of an Antioxidative Supplementation of Geriatric Patients. *Biol Trace Elem Res* 1989; 20:135-151.
- Comporti M. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987; 45(143):169-174.
- Coombes JS, hamilton KL. The effectiveness of commercially available sports drinks. *Sport Med* 2000; 29(3):181-209.
- Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2001; 30:280-285.
- Córdova A. *Fisiología Dinámica*. Barcelona: ed. Masson; 2003.
- Corongiu FP, Banni S. Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods Enzymol* 1992;303-310.
- Costill D, Sherman WM, Fink WJ. The role of dietary carbohydrates in muscle glycogen resynthesis after strenuous running. *Am J Clin Nutr* 1981; 34:831-836.
- Costill DL, Sparks KE. Rapid fluid replacement following thermal dehydration. *J Appl Physiol* 1973; 34:299-303.
- Costill L, Fink WJ. Plasma volume changes following exercise and thermal dehydration. *J Appl Physiol* 1974; 37(4):521-525.
- Crawford DL, Sinnhuber RO, Aft H. The effect of methylation upon the antioxidant and chelation capacity of quercetin and dihydroquercetin in a lard substrate. *J Food Sci* 1961; 26:139-142.

- Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K et al. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25:1135-1140.
- Cross CE. Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann Intern Med* 1987; 107:526-545.
- Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C, Rémésy C. Binding of flavonoids to plasma proteins. In: Packer L, editor. *Bioflavonoids and Polyphenols*. Orlando, FL.: Academic Press; 2000, p. 254-286.
- Das DK, Maulik N, Moraru II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1):181-193.
- Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107(4):1198-1205.
- De Caterina R. Endothelial disfunctions: Common denominators in vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11(1):9-23.
- De la Asunción JG, Millán A, Pla R. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996; 10:333-338.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324:1-18.
- Del Castillo V. Antioxidants, Free Radicals and Exercise. *EF y Deportes* [en línea] 2000 Julio [fecha de acceso 11 de septiembre de 2001]; 5(23). URL disponible en: <http://www.efdeportes.com/efd23/radic.htm> .
- Del Río LA, Sandalio L, Palma J. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:557-580.
- DeLange RJ, Glazer AN. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal Biochem* 1989; 177:300-306.
- Demple B, Linn S. 5,6-saturated thymine lesions in DNA: Production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res* 1982; 10:3781-3789.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *J Hypertens* 2000; 18:655-673.

Díaz J, Serrano E, Acosta F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clin Chem* 1998; 44:2215-2217.

Díaz J, Serrano E, Acosta F, Carbonell LF. Reference interval for human plasma nitric oxide end products. *Clin Biochem* 1998; 31(6):513-515.

Díaz J, Serrano E, Acosta F, Carbonell LF. Reference Intervals for Four Biochemistry Analytes in Plasma for Evaluating Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Human Plasma. *Clin Chem* 1998; 44(2215):2217.

Diem K, Lentner C. *Scientific Tables*. Documenta Geigy. 7^a ed. Switzerland: Basel; 1970.

Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Ttappel AL. Effects of exercise, vitamin E and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978; 45:927-932.

Dimmey LJ, Gordy W. Electron spin resonance of 17-O-labeled protein-peroxide radicals: Zein and edestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(1):343-346.

Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 1991; 10:225-242.

Dubowitz V. *Muscle Biopsy, Practical Approach*. 2^a ed. Baillere: Tindoll; 1985.

Dufaux B, Heine O, Kothe A, Prinz U, Rost R. Blood Glutathione Status Following Distance Running. *Int J Sports Med* 1997; 18(2):89-93.

Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 1990; 282(1):78-83.

Ebashi S, Toyokura T, Momoi H, Sugita H. High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy patients. *Biochem J* 1959; 46:103-108.

Elejalde Guerra JI. Oxidación, entre la vida y la enfermedad. *An Med Interna* 2001; 18(1):1-4.

Elliot P. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem Pharmacol* 1992; 44(8):1603-1608.

Erhola M, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H et al. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy and response to treatment. *FEBS Lett* 1997; 409(2):287-291.

Eskin NAM. *Biochemistry in foods*. San Diego (CA): Academic Press; 1990.

- Espín JC, Wichers HJ. Study of the oxidation of resveratrol catalized by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, lacasse and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *J Food Biochem* 2000; 24:225-250.
- Evans J. Creatine Kinase (Total) test. San Diego (CA):McKesson Health Solutions LLC.; 2002.
- Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol* 1999; 300:145-156.
- Evans T, Carpenter A, Silue A, Cohen J. Inhibitions of Nitric oxide synthetase inesperimetal gram negative sepsis. *J Infect Dis* 1994; 169:343-349.
- Faure H, Coudray C, Mousseau M, Ducros V, Douki T, Bianchini F et al. 5-Hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARs and plasma antioxidant vitamins in Adriamycin-treated patients. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:979-983.
- Fernández V. Cambios moleculares asociados al estrés oxidativo hepático en un modelo de hipertiroidismo experimental [Tesis Doctoral]. Santiago:Universidad de Chile; 1992.
- Fernández V, Barrientos X, Kipreos K, Valenzuela A, Videla LA. Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: Relation to lipid peroxidation. *Endocrinology* 1985; 117:496-501.
- Fernández V, Cornejo P, Tapia G, Videla LA. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat: Nitric oxide. *Biol Chem* 1997; 1:463-468.
- Fernández V, Llesuy S, Solari L, Videla LA, Boveris A. Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 1988; 5:77-84.
- Fernández V, Simizu K, Barros SBM, Azzalis LA, Pimentel R, Junqueira VBC et al. Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism related enzymes' activities, efflux and turnover. *Endocrinology* 1991; 129:85-91.
- Fernández V, Videla LA. Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. *Free Radic Res Commun* 1993; 18:329-335.
- Ferreira R. Enzimas antioxidantes y prooxidantes: características principales y su ubicación en el genoma humano [en línea] [fecha de acceso 8 de mayo de 2001]. URL disponible en: <http://www.antioxidantes.com.ar/12/Art104.htm>

- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-247.
- Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C. Redox regulation of NF-KB activation. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(1):1115-1126.
- Fontecave M, Pierre JL. Iron: Metabolism, toxicity and therapy. *Biochem J* 1993; 75:767-772.
- Fraga C, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:11003-11006.
- Francis FJ. Food Colorant:Anthocyanins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1989; 28(1):273-341.
- Frankiewicz-Jó'zko A, Faff J, Sieradzan-Gabelska B. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the postexercise period in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996; 74(5):470-474.
- Freeman BA, Grapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Inv* 1982; 47:412-426.
- Freese R, Basu S, Hietanen E, Nair J, Nakachi K, Bartsch H et al. Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *Eur J Nutr* 1999; 38(3):149-157.
- Fridovich I. Superoxide radical: An endogenous toxicant 1983. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23(239):257.
- Fry RW, Garcia-Webb P, Crawford GPM, Keast P. Biological Responses to Overload Training in Endurance Sports. *Eur J Appl Physiol* 1991; 64:335-344.
- Fuchs J, Hufleijt M, Rothfuss L, Wilson D, Carcamo G, Packer L. Acute Effects of Near Ultraviolet and Visible Light on the Cutaneous Antioxidants Defense System. *Photochem Photobiol* 1989; 50:739-744.
- Fuster V, Ross R, Topol EJ. Oxidized lipoproteins and atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia-New York: Lipincott-Raven Publishers; 1996. p.129-149.
- Gábór S. The NO-Donor L-Arginine reduces the reperfusion injury after heart transplantation. In: Beyersdorf-Friedhelm, editor. *Ischemia-reperfusion injury in cardiac surgery*. New York: Academic Press; 2001.

García-Alonso FJ, Periago MJ, Vidal-Guevara ML, Cantos E, Ros G, Ferreres F et al. Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry and berries. *J Food Sci* 2003; 68(4):1525-1530.

Gebicki S, Gebicki JM. Formation of peroxides in aminoacids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem J* 1993; 289(1):743-749.

Ghiselli A, serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status:critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(11):1106-1114.

Gingsburg GS, Agil A, O'Toole M, Rimm E, Douglas PS. Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in Triathletes. *J Am Med Assoc* 1996; 276(3):221-225.

Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signal and NF-KB activations in T cells. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(1):346-361.

Gladden LB. Generation of free radicals after exhaustive exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32(9):1576-1581.

Gohil K, Viguie CA, Stanley WC, Brooks GA, Packer L. Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 1998; 64:115-119.

Goldfarb AH. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 1999; 24(3):249-266.

Gómez-Cabrera MC, Gimeno A, Lloret A, Miñana JB, Marquez R, Viña J. Deporte de alta competición y daño oxidativo:papel de los nutrientes antioxidantes. *Antioxidantes y calidad de vida [en línea]* [fecha de acceso 21 de mayo de 2001]. URL disponible en: www.antioxidantes.com.ar/12/Art118.htm.

Goodman C, Henry G, Dawson B, Gillam I, Beilby J, Ching S. Biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a twenty-one kilometre run. *Aust J Sci Med Sports* 1997; 29:95-98.

Gopalakrishna R, Jaken S. Protein Kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(1):1349-1361.

Gracy RW. Effects of aging on proteins. In: Academic Press, editor. *Molecular Aging, Cytogerontology and Wound Haling Units*. N.Y.; 1992: 119-145.

Greens EL, Paller MS. Xantine oxidase produces O₂ in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; 263:251-255.

Greenwald RA, Moy WW. Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* 1980; 23:455-463.

Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 2000; 89(1):169-175.

Grune T, David KJ. Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. *Biofactors* 1997; 6(2):165-172.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: some problems and concepts. In: Halliwell B, editor. *Proceedings of the Upjohn Symposium: Oxygen radicals and tissue injury*. New York; 1987:457-479.

Halliwell B. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic Res Commun* 1989; 5:315-318.

Halliwell B. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence? *Lancet* 1994; 344:721-724.

Halliwell B. Establishing the Significance and Optimal Intake of Dietary Antioxidants :The Biomarker Concept. *Nutr Rev* 1999; 57(4):104-113.

Halliwell B, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants:The need for *in vivo* markers of oxidative stress. In: Aruoma OI, Cuppett S, Aocs P, editors. *Antioxidant Methodology: In vivo and in vitro Concepts*. Champaign; 1997: 218-234.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3^a ed. New York: Academic Press; 1999.

Harborne JB. Phenolics compounds. In: Harborne JB, Chapman, Hall, editors. *Phytochemical Methods*. London; 1973: 33-38.

Harman D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 673:126-141.

Hartman U, Mester J. Training and overtraining markers in selected sports. *Sci Sport Exerc* 2000; 32(1):209-215.

Hausladen A, Stambler IS. Nitrosative Stress. *Methods Enzymol* 1999; 300:389-395.

Havas E, Komulainen J, Vihko V. Exercise-induced increase in serum creatine Kinase is modified by subsequent bed rest. *Int J Sports Med* 1997; 18(8): 578-582.

Havlikova L, Mikova K. Heat stability of anthocyanins. *Z Lebensm Unters Forsch* 1985; 173:180-187.

Higuchi Y, Linn S. Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells. *J Biol Chem* 1995; 270:790-795.

- Hodnick W, Milosaljevic E, Nelson J. Electrochemistry of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998; 37:2607-2611.
- Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 1999; 99:836-843.
- Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 1999; 37(9-10):637-942.
- Hollman PCH. Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51(S 1):66-69.
- Hollman PCH, Bijlsman MNCP, van Gameren Y, Cnossen EPJ. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad Res* 1999; 31:569-573.
- Hrazdina G, Borzelli AJ, Robinson WB. Studies on the stability of the anthocyanidin 3,5-diglucosides. *Am J Enol Vitic* 1970; 21:201-204.
- Huang J, Kim Y, Matthews HR. Genistein inhibits protein histidine kinase. *J Biol Chem* 1992; 267:15511-15515.
- Hultqvist M, Hegbrant J, Nilsson-Thorell C, Lindholm T, Nilsson P, Linden T et al. Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, and/or malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin Nephrol* 1997; 47(1):37-46.
- Hunt BJ, Korash P, Eaton S, Brozovic M. Creatine Kinase activity in sickle cell disease. *J Clin Pathol* 1989; 42(1):712-715.
- Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K, Okochi T. Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:720.
- Insua MF. Biogenesis mitocondrial y ejercicio. *EF y Deportes [en línea]* 2003 Junio [fecha de acceso 21 de octubre de 2003]; 9(61). URL disponible en: <http://www.efdeportes.com/efd61/mitocon.htm>
- Ishikawa T, Zimmer M, Sies H. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS Lett* 1986; 200:128-132.
- Jackson MJ, Edwards RHT, Symons MCR. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Acta Biochem Biophys* 1985; 847:185-190.
- Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Cin Chem* 1995; 41(1):1135-1138.

Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209:104-111.

Jansen-Heininger YMW, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear KB. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(1):1317-1327.

Jenkins RR. Free radicals chemistry, relation ship to exercice. *Sport Med* 1988; 5:156-170.

Jenkins RR, Friedland R, Howald H. The relation-ship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. *Int J Sports Med* 1984; 5:11-14.

Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25:210-212.

Ji L, Stratman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme system in rat liver and skeletal muscle: influences of selenium deficiency acute exercise and chronic training. *Arch Biochem Biophys* 2003; 263:150-160.

Ji LL. Exercise-induced oxidative stress in the heart. In: Sen CK, Packer L, Hanninem O, editors. *Exercise and Oxygen Toxicity*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994.p. 249-267.

Ji LL. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. In: Hollos JO, Williams Z, Wilkins P, editors. *Exercise and sports sciences reviews*. Baltimore; 1995.p.135-166.

Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercice and hidroperoxide. *J Appl Physiol* 1992a; 72:549-554.

Ji LL, Fu R, Mitchell EW. Glutathione and antioxidants enzymes in skeletal muscle. Effects of fiber type and exercice intensity. *J Appl Physiol* 1992b; 73:1854-1859.

Ji LL, Katz R, Fu R, Griffiths M, Spencer M. Blood glutathione status during exercice: effect of carbohidrate supplementation. *J Appl Physiol* 1993; 74:788-792.

Joseph JA. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spina strawberry dietary supplementation . *J Neurosci* 1999; 19(18):8114-8121.

Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS. Ascorbic acid enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer Drugs* 1993; 4:91-96.

Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, La Ham-Saeger J, Nequin ND. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer

race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988; 57(1):60-63.

Kanter MM, Lesmes GR, Neguin ND, Kaminsky LA, Saeger JM. Serum creatinekinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. *Ann Ports Med* 1988; 3:39-41.

Kanter MM, Nolte NA, Holloszy JO. Effect of an antioxidant vitamin micture on lipid peroxidation et rest and post-exercise. *J Appl Physiol* 1993; 74:965-969.

Karlsson J. Antioxidants and exercise. Champaing (Illinois): Human Kinetics; 1997.

Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Miyamoto T. Life style and urinary 8_hydroxydeoxyguanosine, a marker DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Nutr Res* 2001; 92:9.

Keller J, Halmes NC, Hinson JA, Pumford NR. Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem Res Toxicol* 1993; 6:430-433.

Keul J, Doll E. Oxydative energy supplementation. In: E.Jokl, editor. *Energy Metabolism of Human Muscle*. Basel:Karger: 1972: 214-237.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *Br Med J* 1996; 312:478-481.

Knowles RG. Nitric oxide synthases. *Biochem J* 1994; 342:911-916.

Knowles RG, Merret M, Salter M, Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 1990; 270:833-836.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298:249-258.

Komulainen J, Koskinen SOA, Kalliokoski R, Takala TES, Vihko V. Gender differences in skeletal muscle fiber damage after eccentrically biased downhill running in rats. *Acta Physiol Scand* 1999; 165:57-63.

Komulainen J, Vihko V. Training-induced protection and effect of teminated training on exercise-induced damage and water content in mouse skeletal muscles. *Int J Sports Med* 1995; 16:293-297.

Kondo H, Itokawa Y. Oxidative stress in muscular atrophy. In: Sen CK, Packer L, Hanninem O, editors. *Exercice and Oxygen Toxicity*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994.p. 319-342.

König D, Berg A. Exercise and oxidative stress: Is there a need for additional antioxidants. *Öster J Sport Med* 2002; 3(1):6-15.

Koya D, King GL. Protein Kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47(1):859-866.

Kozlowski S, Saltin B. Effect of sweat loss on body fluids. *J Appl Physiol* 1964; 19:1119-1124.

Kretzschmar M, Pfeifer U, Machnik G, Klinger W. Glutathione homeostasis and turnover in the totally hepatectomized rat: evidence for a high glutathione export capacity of extrahepatic tissues. *Exp Toxicol Pathol* 1992; 44:273-281.

Krinsky NI, Deneke SM. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69:205-209.

Krotkiewski M, Brzezinska Z. Lipid peroxides production after strenuous exercise and in relation to muscle morphology and capillarization. *Muscle Nerve* 1996; 19:1530-1537.

Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, Thyagaraju K, Reddanna P. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem* 1992; 111:109-115.

Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999; 85: 753-766.

Kyriakidis SM, Sotiroidis TG, Evagelopoulus AE. Interaction of flavonoids with rabbit muscle phosphorylase kinase. *Acta Biochem Biophys* 1986; 871:111-122.

Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, brown OR, Smith J.K., Korthuis RJ. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J Appl Physiol* 1990; 68:2337-2343.

Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991; 42:1673-1681.

Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolic quercetin, gossypol and myricetin. Effect on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation, and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:2859-2865.

Lee J, Goldfarb AH, Rescino MH, Hegde S, Patrick S, Apperson K. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34(3): 443-448.

- Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 1995; 4:393-399.
- Leeuwenburg C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 1994; 267(R):439-445.
- Lesko SA, Lorentzen RJ, Ts'o P.O.P. Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochemistry* 1980; 19:3023-3028.
- Levine RL, Williams JA, Stadman ER, Shacter E. Carbonyls assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233:346-357.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186:464-478.
- Lew H, Quintanilha A. Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991; 16:59-68.
- Lilius EM, Marnila J. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia* 1992; 48:1082-1091.
- Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB. 8-Hydroxy-deoxyguanosine as a Urinary marker of Oxidative DNA Damage. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40:391-404.
- Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996; 74:297-308.
- Loft S, Poulsen HE. Markers of oxidative damage to DNA: Antioxidants and Molecular Damage. *Methods Enzymol* 1999; 300:166-184.
- López Chicharro J, Fernandez Vaquero A. Efectos fisiológicos del entrenamiento. In: Editorial Médica Panamericana., editor. *Fisiología del ejercicio*. 1998.p. 307-322.
- Lovlin R, Cottle W, Pyke L, Kavanagh M, Belcastro AN. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur J Appl Physiol* 1987; 56(3):313-316.
- Lunec J. Free Radicals: Their Involvement in disease processes. *Ann Clin Biochem* 1990; 27:173-182.
- Maccarone E, Maccarone A, Rapisarda P. Stabilization of anthocyanidins of blood orange fruit juice. *J Food Sci* 1985; 50:901-904.

- Magistretti MJ. Antiulcer activity of an anthocyanadin from *Vaccinium myrtillus*. *Arzneimittelforschung* 1988; 38(5):686-690.
- Mair J. Rapid adaptation to eccentric exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med* 1995; 16:352-356.
- Malliaraki N, Mpliamplias D, Kampa M, Perakis K, Margioris A, Castanas E. Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. *BMC Nephrol* 2003; 4(4):1471-1487.
- Manach C, Texier O, Morand C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catequin in rats. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1259-1266.
- Manghan RJ, Donnelly AE, Gleeson M, Whiting PH, Walker KA, Clough PJ. Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve* 1989; 12:332-336.
- Markakis P. Anthocyanins and their stability in foods CRC. *Crit Rev Food Tech* 1974; 4(1):437-456.
- Markakis P. Anthocyanins as Food Colour. New York: Academic Press; 1982.
- Markakis P, Livingston GE, Fellers CR. Quantitative aspects of trawberry pigment degradation. *Food Res Int* 1957; 22:117-129.
- Martínez MT, Villegas JA, Pérez E, Abellán P, Vidal ML, Alemán J et al. Investigación de una bebida para después de la práctica deportiva. *Arch Med Dep* 2002; 87:212-216.
- Martinez-Cayuela M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 1998; 39:5-18.
- Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002; 17(6):271-278.
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *J Sci Food Agric* 2002; 82:323-330.
- Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997; 37(4):235-239.
- Masquelieur J, Michaud J, Laparra J, Dumond M. *Bull Soc Pharmac Bordeaux* 1979; 118:95-104.

- Mastaloudis A. Estrés oxidativo en atletas cuando realizan ejercicios extenuantes. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:911-922.
- Mataix J, Mañas M, Llopis J, Martínez de Victoria E. Tabla de composición de alimentos españoles. 3ª ed. Granada: Servicio de publicaciones; 1998.
- Mayer A, Harel E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 1979; 18:193-215.
- Mazza G, Brouillard R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem* 1987; 25(1):207-212.
- Mc Cord J. Superoxide radical controversies, contradictions, and paradoxes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209:112-117.
- McConel G, Burge C, Skinner S, Hargreaves M. Effect of carbohydrate ingestion on glucose kinetics during exercise. *J Appl Physiol* 1994; 77:1537-1541.
- McCord J, Wong K, Stokes S, Petrone W, English D. Superoxide and inflammation: a mechanism for the antiinflammatory activity of superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand* 1980; 492(S):25-30.
- McKenna R, Kezdy FJ, Epps DE. Luminescence, EPR and IR Methods for Sensing Quality of Fruits. *Ann Biochem* 1991; 196:443-448.
- Mecocci P, Fan'o G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 1998; 26(3y4):303-308.
- Meiers S. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agricult Food Chem* 2001; 49(2):658-962.
- Mellors A, tappel AL. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem* 1996; 241:4353-4361.
- Metsä-Ketelä T. Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status. Wiley-Chichester; 1991.
- Mihm S, Galter D, Droge W. Modulation of transcription factor NFkB activity by intracellular glutathione levels and by variations of extracellular cysteine supply. *FASEB J* 1995; 9(246):252.
- Miján de la Torre A, de Mateo Silleras B. Radicales libres y nutrientes antioxidantes. Nutrición clínica: bases y fundamentos. 1998: 391-407.**
- Miller ER, Appel LJ, Risby TH. Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trials. *Circulation* 1998; 98(22):2390-2395.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies ML, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its applications to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84:407-412.

Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2001; 84(1-2):1-6.

Morel I, Lescoat G, Cillard P, Cillard J. Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol* 1994; 234:437-443.

Morton LW, Caccetta R, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and Biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27:152-159.

Nebesky EA, Esselen WB, McConnell JEW, Fellers. Stability of color in fruit juices. *Food Res Int* 1949; 14(1):261-274.

Neiman D. Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol* 1997; 82:1385-1394.

Nishikawa T, Edelstein D, Liang Du X. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404(1):787-790.

Nylin G. The effect of heavy muscular work on the volume of circulatory red corpuscles in man. *Am J Physiol* 1947; 149:180-184.

O'Byrne DJ, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(6):1367-1374.

O'Toole ML, Douglas PS, Laird RH, Hiller WDB. Fluid and electrolyte in athletes receiving medical care at ultraendurance races. *J Sports Med* 1995; 5:116-122.

Ohno H, Suzuki K, Fujii J, Yamashita H, Kizaki T, Oh-ishi S et al. Superoxide dismutase in exercise and disease. In: Sen CK, Packer L, Hanninem O, editors. *Exercise and Oxygen Toxicity*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 127-161.

Ohno H, Yahata T, Sato Y, Yamamura K, Taniguchi N. Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men. *Eur J Appl Physiol* 1988; 57:173-176.

Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Antioxidant effects of tannins and related polyphenols. In: MOU-Tuang Huang, Chitang Ho, Chang Y. *American Chemical Society, editors. Phenolics compounds in food and their effects on health II*. Washington; 1991.p. 358-384.

- Oliva MR, Muñic P, Valls V. Radicales libres y modificación oxidativa del DNA. In: Cascales M, editor. *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo*. Madrid: Fundación José Casares Gil, 1997.p. 295-314
- Oolonen M, Sarna S, Halme M, Tuominen SEJ, Westermarck T, Nordberg UR et al. Antioxidant Supplementation Decreases TBA Reactants in Serum of Elderly. *Biol Trace Elem Res* 1988; 17:221-228.
- Orrenius S, Nicotera P. Biochemical mechanisms of oxidative liver cell injury. *Bull Eur Physiol Res* 1987; 23(291):295.
- O'Neill C, Stebbins C, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst J. Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol* 1996; 81:1197-1206.
- Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991; 53(4 S):1050-1055.
- Packer L. Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:257.
- Packer L. Antioxidantes y atletismo. Revisión temática [en línea] [fecha de acceso 21 de diciembre de 2003]. URL disponible en: www.naturozone.com/documen/antioxAtlet.htm
- Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus Martima*) bark, Pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(1):704-724.
- Palacios Gil-Antuñano N. Nutrición y ejercicio físico. *Nutrición Hospitalaria* 2000;15(1): 31-40.
- Palozza P, Luberto C, Calviello G. Antioxidant and prooxidant role of β -carotene in murine normal and tumor thymocytes: Effects of oxygen partial pressure. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:1065-1071.
- Patel RP, Morllering D, Murphy-Ullrich J. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(1):1780-1794.
- Pawlowicz P. Administration of natural anthocyanins derived from chokeberry retardation of idiopathic and preeclamptic origin. Influence on metabolism of plasma oxidized lipoproteins: the role of autoantibodies to oxidized low-density lipoproteins. *Ginekol Pol* 2000; 71(8):848-853.
- Pérez Gastell PL, Pérez de Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cuba Med Milit* 2003; 29(3):192-198.

Perkins ND. The Rel/NF-KB family: Friend and foe. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(1):434-440.

Peterson TG, Ji GP, Kirk M, Coward L, Falany CN, Barnes S. Metabolism of the isoflavones genistein and biochanin A in humans breast cancer cell lines. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(S):1505-1511.

Potokar M. Effectiveness of Vitamin E Protecting against UV Light Comparative Testing of the Natural Tocopherol on the Skin of the Hairless Mouse. *Fat Sci Technol* 1990; 92:406-410.

Powers SK, Hamilton K. Antioxidants and Exercise. *Clin Sports Med* 1999; 18(3):525-536.

Priscilla M, Clarkson, Heather S. Antioxidants: GAT role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2S):637-646.

Proctor PH, Reynolds ES. Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1984; 16:175-195.

Pryor WA. Forum on oxidative stress status and its measurement. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:387-398.

Pryor WA, Church DP. Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of oxygentoxicity. *Free Radic Biol Chem* 1991; 11:41-46.

Pyne DB. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *J Sci Med Sport* 1994; 26:49-58.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S. The effect of exercise on oxidative damage of lipids, proteins and ADN in rat skeletal muscle:evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(1-2):69-74.

Radák Z, Ogonovszky H, Dubecz J, avlik G, Sasvari M, ucsok J et al. Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest* 2003; 33(8):726-732.

Radak Z, Pucsuk J, Boros S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376:248-251.

Rajguru SU, Yeargans GS, Seidler NW. Exercise causes oxidative damage to rat skeletal muscle microsomes while increasing cellular sulfhidryls. *Life Sci* 1994; 54:149-157.

Rechner AR, Kuhnle G, Bremmer P, hubbard GP, Moore Kp, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(1):220-235.

- Reed JC. Cytochrome c: Can't live with it-Can't live without it. *Cell* 1997; 91:559-562.
- Reid MB, Stokic DS, Koch SM, Khawli FA. N- acetylcysteine inhgibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest* 1994; 94:2468-2474.
- Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem J* 1992c; 286:607-611.
- Reznick AZ, Kagan VE, Ramsey R, Tsuchiya M, Khwaja S, Serbinova EA et al. Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. *Arch Biochem Biophys* 1992b; 296:394-401.
- Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrofotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-363.
- Reznick AZ, Witt E, Matsumoto M, Packer L. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercise rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1992a; 189:801-806.
- Rice-Evans C, Burton R. Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 1993; 37:37-110.
- Rice-Evans C, Miller NJ. Total Antioxidant Status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 1994; 234:279-293.
- Rice-Evans CA. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res* 1995; 22(4):3785-3793.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L, editors. *Flavonoids in health and disease*. New York: 1998: 541-568.
- Rivas Gonzalo JC, García Alonso M. Flavonoides en alimentos vegetales:estructura y actividad antioxidante. *ANS* 2002; 9(2):31-38.
- Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci* 1991; 80:611-618.
- Rommel A, Wrolstad RE, Heatherbell DA. Blackwerry juice and wine: processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance. *J Food Sci* 1992; 57:385-391.
- Rossi AL, Blostein-Fujii A, DiSilvestro RA. Soy beverage consumption by young men: increased plasma total antioxidant status and decreased acute, exercise-induced muscle damage. *J Nutr Func Med Foods* 2000; 3(1):279-291.

- Sacheck JM, Blumberg JB. Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutrition* 2001; 17(1):809-814.
- Salgo MG, Squadrito GL, Pryor WA. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215(1):1111-1118.
- Salminen A, Vihko V. Lipid peroxidation in exercise myopathy. *Exp Mol Pathol* 1983; 38:380-388.
- Salonen RM, Nyysonen K, Kaikkonen J. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation in atherosclerotic progression. The Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevent (ASAP) Study. *Circulation* 2003; 107: 947-953.
- Saxton JM, Donnelly AE, Roper HP. Indices of free-radicals-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1994; 68(3):189-193.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000.
- Schaich K. Metals and lipid oxidation. *Contemporary tissues. Lipids* 1992; 27:209-218.
- Schallreuter K, Wood SM. J. Free Radical Reduction in the Human Epidermis. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:619-632.
- Schiller H, Vickers S, Hildreath J, Mather I, Kuhajda F, Bulkley G. Immunofluorescence localization of xanthine oxidase on the outside surface of the endothelial cell plasma membrane. *Circ Shock* 1991; 34:156-167.
- Schmidt AM, Stern D. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(1):367-369.
- Schofield D, Braganza JN. Shortcomings of an automated assay for total antioxidant status in biological fluids. *Clin Chem* 1996;42:1712-1714.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10:2247-2258.
- Schroder H, Navarro E, Tramullas A, Mora J, Galiano D. Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three compound antioxidative supplement. *J Sports Med* 2000; 21(2):146-150.
- Schwane JA, Buckley RT, Dipaolo DP, Atkinson MAL, Shepherd JR. Plasma creatine kinase responses of 18-to 30-yr-old African-American men to eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32(2): 370-378.

Scientific Committee on Food. Report of the Scientific Committee on Food on composition and specification of food intended to meet the expenditure of intense muscular effort, especially for sportsmen. European Commission Health & Consumer Protection Directorate General, editor. SCF/CS/NUT/SPORT/5 Final (corrected), 2001:1-50.

Searle JW, Kerr JFR, Halliday JW, Powell LW. Iron storage disease. In: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, editors. Pathology of the Liver. Edinburg; 1994.p. 219-241.

Sen ChK, Packer L, Hänninem O. Exercise and Oxygen Toxicity. Amsterdam: Elsevier Science ed.; 1994a.

Sen ChK. Detoxification of reactive oxygen species: molecular strategies. In: S.M.Somani, editor. Pharmacology in Exercise and Sports. Boca Raton, FL:CRC Press: 1995b.

Sen ChK. Oxidants and Antioxidants in Exercise. J Appl Physiol 1995a; 79(3):675-686.

Sen ChK, Hänninen O, Orlov SN. Unidirectional sodium and potassium flux in myogenic L6 cells: mechanism and volume-dependent regulation. J Appl Physiol 1995b; 78:272-281.

Sen ChK, Hänninen O. Physiological antioxidants. In: C.K.Sen LPaOH, editor. Exercise and Oxygen Toxicity. Amsterdam: Elsevier Science: 1994c.p. 89-126.

Sen ChK, Kolosova I, Hänninen O, Orlov SN. Inward potassium transport systems in skeletal muscle derived cells are highly sensitive to oxidant exposure. Free Radic Biol Med 1995a; 18:795-800.

Sen ChK, Marin E, Kretzschmar M, Hanninen O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization. J Appl Physiol 1992; 73:1265-1272.

Sen ChK, Rahkila P, Hänninen O. Glutathione metabolism in skeletal muscle derived cells of the L6 line. Acta Physiol Scand 1993; 148:21-26.

Sen ChK, Rankinen T, Väisänen S, Rauramaa R. Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. J Appl Physiol 1994b; 76(6):2570-2577.

Serbinova EA, Khwaja S, Reznick Z, Packer L. Thiocctic acid protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused langendorff heart. Free Rad Res Com 1992; 17: 49-58.

Sergent O, Griffon B, Morel I, Chevanne M, Dubos M, Cillard P et al. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology* 1997; 25(1):122-127.

Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994; 74(1):349-353.

Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E. Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic Biol Med* 1990; 8:145-152.

Sexton WL, Korthuis RJ, Laughlin MH. Ischemia-reperfusion injury in isolated rat hindquarters. *J Appl Physiol* 1990; 68:387-392.

Sha'Afi RI, Molski TFP. Activation of the neutrophil. *Prog Allergy* 1988; 42:1-64.

Shargel L, Yu ABC. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. London: Prentice Hall International (UK) Limited ed.; 1992.

Shenoy VR. Anthocyanins: Prospective food colours. *Science* 1993; 64:575-579.

Siekman L, Bonora R, Burtis CA, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Féraud G et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. *Cin Chem Exp Med* 2002; 40(6):631-634.

Sies H. *Oxidative Stress*. New York :Academic Press; 1985.

Simon K, Rodrigues L, Rodrigues T, Junqueira V, Videla LA. Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Rad Res* 1998; 29:35-42.

Sjódin B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *J Sports Med* 1990; 10:236-254.

Sjogaard G. Exercise-induced muscle fatigue: the significance of potassium. *Acta Physiol Scand* 1990; 140(593S):1-63.

Smart D, McCusker CA, Lamont JV, FitzGerald SP, Lapin A, Temml C. Reference values for various antioxidants parameters in a normal working population. XVI International Congress on Clinical Chemistry. London; 1996.

Smith ChV. Free radical mechanisms of tissue injury. In: Molen HT, Smith ChV, editors. *Free radical mechanisms of tissue injury*. Boca Raton; 1992.p. 1-22.

Smith JA, Teldorfd IB, Mason IB, Weidemann MJ. Exercise. *Int J Sports Med* 1990; 11:179-187.

Snyder AC, Kuipers H, Cheng B, Servais R, Franssen E. Overtraining Following Intensified Training with Normal Muscle Glycogen. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27(7):1063-1070.

Sociedad Española de Química Clínica CCCde. Método para la determinación de la concentración catalítica de lactato deshidrogenasa en suero sanguíneo humano. *Quím. Clín.* 1989; 8:57-61.

Somani SM. Influence of exercise-induced oxidative stress on the central nervous system. In: C.K.Sen LPaOH, editor. *Exercise and Oxygen Toxicity*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994.p. 463-479.

Somers TC. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* 1971; 10:2175-2186.

Southorn PA, Powis G. Free Radicals in Medicine. I y II. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63:381-406.

Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:315-325.

Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257(1):1220-1224.

Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; 266(4):2005-2008.

Stephen M, Roth M, Gajdosik R, Ruby BC. Effects of circulating estradiol on exercise-induced creatine kinase activity. *J Exerc Physiol* 2001; 4(2):10-17.

Stevens RG, Graubard BI, Micozzi MS, Neriish K, Blumberg BS. Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* 1994; 56:364-378.

Sumida S, Tanaka K, Kitao H, Nakadomo F. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int J Biochem* 1989; 21:835-838.

Teixeira AJR, Ferreira MR, van Dijk WJ, van de Werken, de Jong AP. Analysis of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosina in Rat Urine and Liver DNA by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Ann Biochem* 1995; 226(2):306-319.

Tessier F, Hida H, Favier A, Marconnet P. Muscle GSH,Px activity after prolonged exercise training and selenium supplementation. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47:279-285.

Tiidus PM, Pushkarenko J, Houston ME. Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *Am J Physiol* 1996; 271(R):832-836.

- Timberlake CF. Anthocyanins-occurrence, extraction and chemistry. *Food Chem* 1980; 5:69-80.
- Tolonen M, Halme M, Sarna S. Vitamin E and Selenium Supplementation in Geriatric Patients. *Biol Trace Elem Res* 1985; 7:161-168.
- Tomás-Barberán FT. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *ANS* 2003; 10 (2):41-53.
- Trevithick J. Topical Tocophenol Acetate Reduces Post-UVB, Sunburn-associated Erythema, Edema and Skin Sensitivity in Hairless Mice. *Arch Biochem Biophys* 1992; 296:575-582.
- Tsuda T. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett* 2000; 484(3):207-210.
- Tsuda T. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *Biofactors* 2000; 13(1-4):133-139.
- Tsuda T. Dietary cyanidin 3-0-beta-D-glucoside increases ex vivo oxidative resistance of serum in rats . *Lipids* 1998; 33(6):583-588.
- Unno T, Kondo K, Itakura H, Takeo T. Analysis of (-)epigallocatechin gallate in human serum obtained ingesting green tea. *Biosci Biotech Bioch* 1996; 60:2066-2068.
- Ursini F, Maiorino M. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:547-553.
- Valenzuela A, Videla L. Formas activas del oxígeno, estrés oxidativo y su proyección patológica. *Rev Med Chile* 1989; 117:60-67.
- Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 1991; 48:301-309.
- Van Acker SABE, Van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(3):331-342.
- Van Der Meulen JH, Kuipers H, Drukker J. Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *J Appl Physiol* 1991; 71:999-1004.
- Vasankari T, Kujala U, Sarna S, Ahotupa M. Effects of ascorbic acid and carbohydrate ingestion on exercise induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness* 1998; 38(4):281-285.
- Vernet A, Siess MH. Comparison of the effects of various flavonoids on ethoxycoumarin deethylase activity of rat intestinal and hepatic microsomes. *Food Chem Toxicol* 1992; 24:857-861.

Viguie CA, Frei B, Shigenaga MK, Ames BN, Packer L, Brooks GA. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 1993; 75:566-572.

Viinikka L, Vuori J, Ylikorkala O. Lipid peroxides, prostacyclin and thromboxane A₂ in runners during acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1984; 16(1):275-277.

Villegas García JA. Alimentación y Salud [programa informático]. Version 4.2.; 1996.

Vincent HK, Vincent KR. The effect of training status on the serum creatine kinase response, soreness and muscle function following resistance exercise. *Int J Sports Med* 1997; 18(6):431-437.

Von Sontag. Carbohydrate oxidation. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1980; 37:1-37.

Wang H, Cao G, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agricult Food Chem* 1996; 44(3):701-705.

Wang SY, Jiao H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J Agricult Food Chem* 2000; 48(11):5677-5684.

Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma protein. *FEBS Lett* 1985; 187(1):33-38.

Webster NR, Nunn JP. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth* 1988; 60:98-108.

Weinberg ED. Iron withholding in prevention of disease. In: Stuar-Macadam P, Kent S, editors. *Diet, demography, and disease: changing perspectives of anemia*. Hawthorne, N.Y.: 1992.p. 143-161.

Weiss SJ, Lobuglio AF. Biology of defense phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Inv* 1982; 47(1):5-18.

Wilson TC, Hagerman AE. Quantitative determination of ellagic acid. *J Agricult Food Chem* 1990; 38:1678-1683.

Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313:17-19.

Woff SP, Garner A, Dean RT. Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends Biochem Sci* 1986; 11(1):27-31.

Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(1):1430-1442.

Yagi K. Lipid peroxides and human disease. *Chem Phys Lipids* 1987; 45(337):351.

Yagi K. Lipid peroxides and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1992; 30:40-42.

Youdim KA, Martin AaJAJ. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(1):55-60.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74:139-144.

Zafrilla Rentero MP. Efecto de la elaboración de confituras de fresa y frambuesa sobre sus constituyentes fenólicos de interés en la calidad organoléptica y nutricional [tesis doctoral]. Murcia: Univ. de Murcia; 1999.

Zentella M, Saldaña Y. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioq (México)* 1996; 15:152-161.

Zielinska M, Kostrzewa A, Ignatiwicz E. Antioxidative activity of flavonoids in stimulated human neutrophils. *Folia Histochem Cytobiol* 2000; 38(1):25-30.

ANEXOS



**DOCUMENTO PARA EL CONSENTIMIENTO INFORMADO DE 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.

¿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 2001.

D./Dña. _____
El/la interesado/a

D./Dña. _____
El Representante Legal del menor
(en su caso)

D.N.I. _____
Fecha de nacimiento _____

D.N.I. _____



UNIVERSIDAD CATÓLICA SAN ANTONIO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE MEDICINA DEPORTIVA

**COMPROMISO DE PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

D./Dña. _____, mayor de edad, en mi nombre, o como representante legal de D./Dña. _____, menor de edad, que va a participar en el proyecto, consiente voluntariamente en participar o en que participe su representado, en el *Proyecto de Investigación sobre una bebida de reposición durante ejercicios de larga duración* y someterse a las pruebas de esfuerzo, recogida de datos y analíticas necesarias para dicho proyecto.

Reconoce haber sido informado por el personal médico de este centro respecto al tipo de pruebas a las que se va a someter él o su representado 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.

Se compromete a respetar la programación y en el caso de no acudir a las citas previamente establecidas, quedará excluido del grupo de investigación y abonará las tasas que hubieran generado los reconocimientos médicos.

Murcia, ____ de _____ de 2001.

D./Dña. _____
El/la interesado/a

D./Dña. _____
El Representante Legal del menor
(en su caso)

D.N.I. _____
Fecha de nacimiento _____

D.N.I. _____

LABORATORIO DE PRUEBAS DE ESFUERZO

HISTORIA CLINICA



UCAM

DATOS DE FILIACION.-

NOMBRE:

FECHA:

EDAD:

FECHA DE NACIMIENTO:

DEPORTE:

CATEGORIA:

DIRECCION:

TELEFONO:

ANTECEDENTES FAMILIARES.-

ANTECEDENTES PERSONALES.-

ALERGIAS:

HABITOS:

MEDICACION:

LESIONES DEPORTIVAS:

OTROS:

**EXPLORACION FÍSICA EN REPOSO.-
CARDIOVASCULAR.-**

**AUSCULTACION:
PULSOS PERIFERICOS:
TENSION ARTERIAL:**

**RESPIRATORIO.-
AUSCULTACION:**

ORL.-

LOCOMOTOR.-

OTROS.-

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL.-

SOMATOMETRIA:

PESO:	Kg.	TALLA:	cm.		
%GRASO:	%	%MUSCULAR:	%	%OSEO:	%

DENSIOMETRIA POR DESPLAZAMIENTO DE AIRE:

PESO TOTAL:	Kg.	PESO GRASA:	Kg.
		% PESO GRASA:	%.
		PESO NO GRASO:	Kg.
		% PESO NO GRASO:	%.

PRUEBA DE ESFUERZO

- **ERGÓMETRO:** Cinta continua Cicloergómetro
(desarrollo empleado _____)
- **PROTOCOLO:** TEST TRIANGULAR TEST RECTANGULAR

**CARGA INICIAL:
INCREMENTOS DE CARGA:
PENDIENTE:**

• **PARÁMETROS OBTENIDOS:**

- **TIEMPO DE LA PRUEBA:** min. seg.
- **FRECUENCIA CARDIACA MÁXIMA:** lat / min.
- **CARGA MÁXIMA ALCANZADA:** Km / h.
- **CONSUMO RELATIVO MÁXIMO DE OXIGENO:** ml / Kg / min.
- **CONSUMO MÁXIMO DE OXIGENO:** ml / min.
- **UMBRAL VENTILATORIO 1 (AERÓBICO):** lat / min.
- **UMBRAL VENTILATORIO 2 (ANAERÓBICO):** lat / min.
- **EVOLUCION DE LA TENSIÓN ARTERIAL:**

MINUTO	T.A.:	mm de Hg.
MINUTO	T.A.:	mm de Hg.
MINUTO	T.A.:	mm de Hg.
MINUTO	T.A.:	mm de Hg.
MINUTO	T.A.:	mm de Hg.

• **MONITORIZACIÓN DURANTE LA PRUEBA:**

MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.
MINUTO	LACTATO:	mmol / L.

OBSERVACIONES

Guadalupe, de de 200

Fdo: Dr.

IX.- PRECOCINADOS, PREELABORADOS Y MISCELANEAS	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	+ 6 al día
84.- Croquetas (una)									
85.- Palitos o delicias de pescados fritos (una unidad)									
86.- Sopas y cremas de sobre (un plato)									
87.- Mayonesa (una cucharada)									
88.- Salsa de tomate (media taza)									
89.- Picantes: tabasco, pimienta y guindillas (media cucharadita)									
90.- Sal (una pizca o pellizco con dos dedos)									
91.- Ajo (un diente)									
92.- Mermeladas, miel (una cucharada)									
93.- Azúcar (ej. en el café, postres, etc. (cucharadita)									

Para cada alimento, consigna cuantas veces como media ha tomado la cantidad que se indica durante el año pasado. Tenga en cuenta las veces que lo toma solo y las que lo añade a otros alimentos o platos.

Observaciones:

NOMBRE: _____ FECHA: _____

ANEXO IV

ENCUESTA RECORDATORIO 24 HORAS

Desayuno	
Almuerzo	
Comida	
Merienda	
Cena	
Colación	