

~~T-100-21/79~~

T 9/134

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 05-11-97  
ENTRADA NUM. 4020

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
**GRANADA**  
N.º Documento 613382676  
N.º Copia 16316526

**CAPACIDAD OXIDATIVA**  
**(FRACCION INSAPONIFICABLE FRENTE A**  
**SAPONIFICABLE) DE DISTINTAS FUENTES GRASAS**  
**CON ALTO CONTENIDO EN ACIDO OLEICO**

**Julio José Ochoa Herrera**  
**Granada, 1997**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
23 OCT. 1997  
COMISION DE DOCTORADO



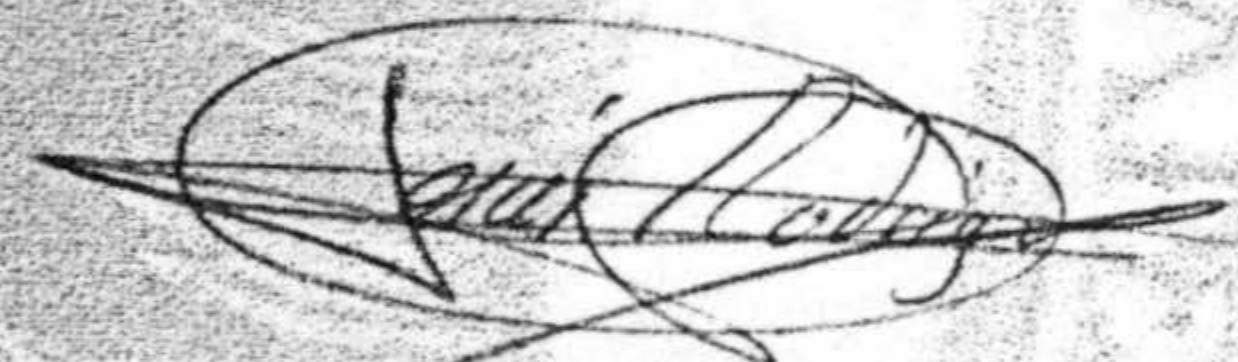
**CAPACIDAD OXIDATIVA  
(FRACCION INSAPONIFICABLE FRENTE A  
SAPONIFICABLE) DE DISTINTAS FUENTES GRASAS  
CON ALTO CONTENIDO EN ACIDO OLEICO**

Memoria que presenta el Ldo. D. Julio  
José Ochoa Herrera para aspirar al  
grado de Doctor en Biología

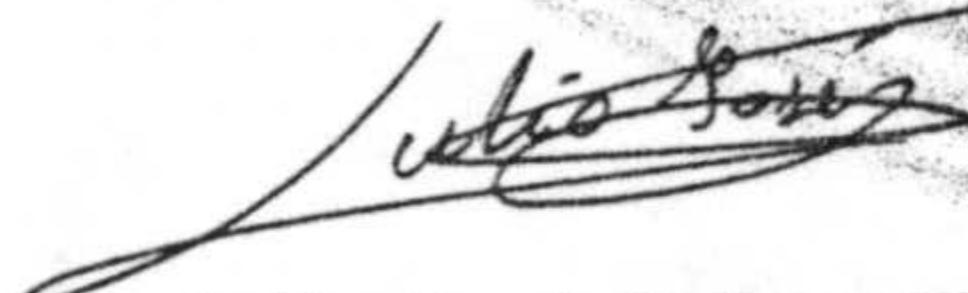
Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:



Prof. Dr. D. José  
Mataix Verdú



Prof. Dr. D. Jesús  
Rodríguez Huertas



D. Julio José Ochoa Herrera,  
aspirante al grado de Doctor  
en Biología



D. José Mataix Verdú, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Granada.

D. Jesús Rodríguez Huertas, Profesor Ayudante L.R. U de Facultad, de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: "**CAPACIDAD ANTIOXIDATIVA (FRACCION INSAPONIFICABLE FRENTE A SAPONIFICABLE) DE DISTINTAS FUENTES GRASAS CON ALTO CONTENIDO EN ACIDO OLEICO**", han sido realizadas bajo nuestra dirección por D. Julio José Ochoa Herrera, en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Granada, y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor en Biología por el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente , con fecha veintiuno de Octubre de mil novecientos noventa y siete.



Prof. Dr. D. José  
Mataix Verdú



Prof. Dr. D. Jesús  
Rodríguez Huertas



*Realmente, este apartado en el cual se pretende agradecer a todos aquellos que han estado al lado de esta tesis y mio por lo tanto, es difícil, porque es mucha la gente a agradecer en los tres o cuatro años de duración de este proyecto y siempre queda la duda y pena de que alguien se olvide.*

*Quisiera agradecer al profesor D. José Mataix, la confianza que mostró en mí y sobre todo sus enseñanzas, las cuales no se limitan a las paredes de un laboratorio, sino que abarcan multiples campos de la investigación y la enseñanza.*

*A Jesús Rodriguez, por haber tenido la suficiente paciencia conmigo y mis continuas dudas, por comunicarme sus conocimientos y experiencias y sobre todo por ser un amigo además de uno de mis directores.*

*A Mariano Mañas y Emilio Martínez de Victoria, por su simpatia y el saber que se puede contar con ellos en cualquier momento.*

*A M<sup>a</sup> Alba, Pepe, Mayca, Dolo, Luís, Pepe, Chiqui, M.D., Estrella, Lola, Susana y los demás compañeros del INYTA, por ser unos excelentes compañeros, asicomo amigos con los cuales puedes pasar mejor los malos momentos y muy bien los buenos.*

*Al resto de profesores y gente del INYTA, asicomo a la gente del Departamento de Fisiología, Magdalena, Isabel Seiquer, Juan Llopis, Tere, Pilar Navarro, Rosita, Miguel Moreno y no se puede olvidar a nuestro manitas Rafael, ni a M<sup>a</sup> José , Elisa y Concha por aguantar mi poco manejo con los papeles administrativos.*

*A mi familia, por ser lo que soy.*

*A Ana, por ser tan maravillosa y haberme soportado y ayudado en todos los malos momentos que he pasado sin apenas perder la sonrisa.*



## INDICE

	<u>Página</u>
CAPÍTULO I.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	9
CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	13
1.- ACEITE DE OLIVA	15
1.1.- Composición	16
1.1.1.- Fracción saponificable	16
1.1.2.- Fracción insaponificable	17
1.2.- Variedades Picual y Arbequina	20
1.3.- Aceite de oliva y salud humana	21
2.- MITOCONDRIAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	22
2.1.- NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I)	25
2.2.- Succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II)	26
2.3.- Ubiquinol:citromo c oxidoreductasa (complejo III)	27
2.4.- Ferrocitromo c:oxígeno reductasa o citocromo oxidasa (complejo IV)	29
2.5.- Citocromo c	31
2.6.- Coenzima Q	32
3.- RADICALES LIBRES	33
3.1.- Radical superóxido	35
3.2.- Peróxido de hidrógeno	35
3.3.- Radical hidroxilo	36
3.4.- Oxígeno singlete	37
3.5.- Ácido hipocloroso	38
4.- BALANCE Y ESTRÉS OXIDATIVO	39
5.- FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES	41
5.1.- Cadena de transporte de electrones mitocondrial	41
5.2.- Xantina oxidasa	42
5.3.- Metabolismo del ácido araquidónico	43
5.4.- Formación de radicales por células fagocíticas	43
5.5.- Metabolismo de las catecolaminas	44
5.6.- Citocromo P450	45
5.7.- Contaminantes atmosféricos	45
5.8.- Metales iónicos en la formación de radicales libres	46
6.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES E HIDRATOS DE CARBONO	47
7.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES Y PROTEÍNAS	48
8.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES Y DNA	49
9.- RADICALES LIBRES Y LÍPIDOS	51
9.1.- Iniciación	52
9.2.- Propagación	53
9.3.- Reacciones de Terminación	54



9.4.- Daño consecuente de la lipoperoxidación	55
9.4.1.- Daño directo a membranas	55
9.4.2.- Efectos indirectos de la lipoperoxidación	56
9.5.- Lipoperoxidación en patologías	58
10.- DEFENSAS ANTIOXIDANTES	59
10.1.- Catalasa	59
10.2.- Superóxido dismutasa	61
10.3.- Glutation peroxidasa	63
10.4.- Glutation reductasa	64
10.5.- Vitamina E	64
10.6.- Coenzima Q	67
10.7.- Carotenoides	70
10.8.- Ácido ascórbico	71
10.9.- Ácido úrico	73
10.10.- Otros antioxidantes	74
10.11.- Mecanismos de reparación	75
10.12.- Mecanismos de adaptación	76
CAPÍTULO III.- MATERIAL Y MÉTODOS	77
1.- PRODUCTOS QUÍMICOS	79
2.- ANIMALES	79
3.- DIETAS	79
4.- DISEÑO EXPERIMENTAL	81
5.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS	82
6.- OBTENCIÓN DE PLASMA	82
7.- AISLAMIENTO Y DIÁLISIS DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS	82
8.- PROCESAMIENTO DE LOS ÓRGANOS Y OBTENCIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES CELULARES	83
9.- PARÁMETROS DETERMINADOS EN PLASMA Y LIPOPROTEÍNAS	84
9.1.- Determinación de proteínas en LDL y HDL	84
9.2.- Determinación de colesterol total en plasmam LDL y HDL	84
9.3.- Determinación de colesterol libre en plama, LDL y HDL	85
9.4.- Determinación de colesterol esterificado en plama, LDL y HDL	86
9.5.- Determinación de triglicéridos en plama, LDL y HDL	86
9.6.- Determinación de coenzima Q en plasma	86
9.7.- Determinación de retinol y $\alpha$ -tocoferol en plama, LDL y HDL	87
9.8.- Perfil lipídico en plasma, LDL y HDL	88



9.9.- Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma	89
10.- DETERMINACIONES EN MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS DE HÍGADO	90
10.1.- Determinación cuantitativa de la proteína total	90
10.2.- Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	90
10.3.- Cuantificación del nivel de hidroperóxidos existente en membranas	90
10.4.- Perfil lipídico de membranas mitocondriales y microsomales	91
10.5.- Extracción lipídica para colesterol y fósforo de membrana mitocondriales y microsomales	91
10.6.- Determinación de fósforo de fosfolípidos en membrana mitocondrial y microsomal	92
10.7.- Determinación de colesterol en membrana mitocondrial y microsomal	92
10.8.- Determinación de fluidez de membrana por polarización de fluorescencia	93
10.9.- Extracción y determinación de ubiquinonas y vitamina E por HPLC en mitocondrias y microsomas	95
10.10.- Cuantificación citocromos c + c <sub>1</sub> , b y a + a <sub>3</sub> en membranas mediante espectrofotometría diferencial	95
10.11.- Determinación de la actividad de citocromo oxidasa en mitocondrias	97
11.- DETERMINACIONES EN CITOSOL DE HÍGADO Y CORAZÓN	97
11.1.- Determinación de la actividad de la catalasa	97
11.2.- Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	98
11.3.- Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa	98
11.4.- Determinación de la actividad de la glutatión reductasa	99
12.- EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO REALIZADO	100
CAPÍTULO IV.- RESULTADOS	101
1.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN PLASMA	103
1.1.- Colesterol plasmático	103
1.2.- Valores de triglicéridos plasmáticos	103
1.3.- Contenido plasmático de $\alpha$ -tocoferol, ubiquinona 10 y retinol	104
1.4.- Nivel de TBARS plasmáticos	104
1.5.- Perfil lipídico en plasma	106

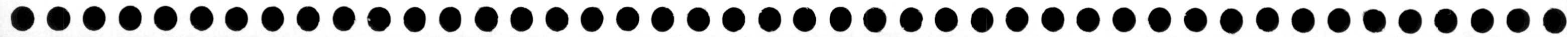


<b>2.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN LIPOPROTEÍNAS</b>	<b>108</b>
2.1.- Niveles de colesterol en LDL y HDL	108
2.2.- Valores de triglicéridos en HDL y LDL	112
2.3.- Contenido de $\alpha$ -tocoferol en LDL y HDL	112
2.4.- Perfil lipídico en LDL	112
2.5.- Contenido de hidroperóxidos basales e inducidos en LDL	118
2.6.- Perfil lipídico en HDL	118
<b>3.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN HÍGADO</b>	<b>123</b>
3.1.- Peso de los hígados	123
3.2.- Proteínas mitocondriales y microsomales	123
3.3.- Nivel de TBARS en mitocondrias y microsomas	123
3.4.- Nivel de hidroperóxidos basales e inducidos en mitocondrias y microsomas	124
3.5.- Nivel de fósforo en mitocondrias y microsomas	124
3.6.- Colesterol en mitocondrias y microsomas	125
3.7.- Niveles de ubiquinonas 9 y 10 en mitocondrias y microsomas	125
3.8.- $\alpha$ -Tocoferol en mitocondrias y microsomas	126
3.9.- Perfil lipídico en mitocondrias de hígado	127
3.10.- Perfil lipídico en microsomas de hígado	130
3.11.- Polarización de fluorescencia en mitocondrias y microsomas	134
3.12.- Contenido en citocromo a+ a3, b y c+c1 de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	137
3.13.- Actividad específica y turnover de la citocromo oxidasa mitocondrial	137
3.14.- Actividad de la catalasa en citosol	138
3.15.- Actividad de la superóxido dismutasa en citosol	138
3.16.- Actividad de la glutatión peroxidasa en citosol	139
3.17.- Actividad de la glutatión reductasa en citosol	139
<b>4.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN CORAZÓN</b>	<b>140</b>
4.1.- Peso de los corazones	140
4.2.- Proteínas mitocondriales y microsomales	140
4.3.- Nivel de TBARS en mitocondrias y microsomas	140
4.4.- Nivel de hidroperóxidos basales e inducidos en mitocondrias y microsomas	141
4.5.- Nivel de fósforo en mitocondrias y microsomas	141
4.6.- Colesterol en mitocondrias y microsomas	141
4.7.- Niveles de ubiquinonas 9 y 10 en mitocondrias y microsomas	142
4.8.- $\alpha$ -Tocoferol en mitocondrias y microsomas	143
4.9.- Perfil lipídico en mitocondrias de corazón	143
4.10.- Perfil lipídico en microsomas de corazón	147
4.11.- Polarización de fluorescencia en mitocondrias y microsomas	150



4.12.- Contenido en citocromo a+ a3, b y c+c1 de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	153
4.13.- Actividad específica y turnover de la citocromo oxidasa mitocondrial	154
4.14.- Actividad de la catalasa en citosol	154
4.15.- Actividad de la superóxido dismutasa en citosol	155
4.16.- Actividad de la glutatión peroxidasa en citosol	155
4.17.- Actividad de la glutatión reductasa en citosol	156
CAPÍTULO V.- DISCUSIÓN	157
CAPÍTULO VI.- CONCLUSIONES	183
CAPÍTULO VII.- BIBLIOGRAFÍA	185







# *CAPITULO I*

---

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS







Las grasas monoinsaturadas durante algunas décadas fueron, digamos, las grandes olvidadas de los numerosos estudios que se realizaban sobre la posible influencia del tipo de grasa dietética en algunas patologías; estos estudios se centraban en la comparación de grasas poliinsaturadas, de las serie n-3 o n-6, frente a grasas saturadas, observándose los efectos beneficiosos que estas fuentes grasas poliinsaturadas ofrecían, sobre todo en el campo cardiovascular y considerando en numerosos casos a las grasas monoinsaturadas como grasas de efectos neutros.

Sin embargo, las grasas monoinsaturadas, aceite de oliva fundamentalmente, comenzaron a ser el centro de otros estudios, al observarse que presentaban similares efectos a los adjudicados a las fuentes grasas poliinsaturadas.

Siendo en el campo de la peroxidación lipídica donde estas fuentes grasas monoinsaturadas anulan a las poliinsaturadas, basándose en dos razones básicas:

- a) El conocimiento de que el perfil de ácidos grasos plasmáticos y de membranas se ve influenciado por el perfil de ácidos grasos de la fuente grasa dietética.
- b) La observación de que el ciclo de peroxidación lipídica en membranas se ve incrementado conforme aumentan en las mismas los porcentajes correspondientes a los ácidos grasos poliinsaturados.

Así, los estudios sobre la disminución del grado de peroxidación lipídica en membranas enriquecidas con ácidos grasos monoinsaturados a través de la grasa dietética, ha ido en aumento. Mostrándonos que la fuente grasa monoinsaturada induce una mayor protección de las membranas y por lo tanto una mayor funcionalidad de las mismas en comparación con otras fuentes grasas más poliinsaturadas.

Pero aún quedan dudas que clarificar, entre la que se encuentra el conocer la contribución relativa que hacen a esta mayor protección de las membranas, la fracción saponificable del aceite de oliva y la fracción insaponificable del mismo, es decir el conocer "in vivo" la mayor o menor importancia de cada una de estas fracciones frente a la lipoperoxidación lipídica.

Dentro de esta duda, se incluye el intento de conocer el posible efecto que presenta un importante componente antioxidante, al menos en el aceite, de esta fuente grasa alimentaria. Este componente es la fracción polifenólica del mismo y en concreto el hidroxitirosol, al ser este el mayoritario y además el más estudiado como estabilizador del aceite frente a la oxidación.

Con este objeto hemos escogido para este estudio dos variedades de aceite de oliva virgen, una muy rica en polifenoles y la otra con un contenido medio-bajo de los mismos,



asimismo una variedad de aceite de girasol rico en oleico, con contenido similar en dicho ácido graso a los aceites de oliva virgen y muy rico en tocoferol, constituyendo el último

aceite elegido para este estudio la misma variedad de aceite de oliva virgen rica en polifenoles anterior, pero sometida a un exhaustivo proceso de lavado, hasta la completa pérdida de polifenoles.

Con estos aceites pretendemos obtener membranas con similar contenido en ácidos grasos, de manera que sea el insaponificable de los distintos aceites el que marque las posibles diferencias entre los animales de estudio, en lo que a lipoperoxidación se refiere.



## *CAPITULO II*

---

---

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS







## 1.- ACEITE DE OLIVA

Es el aceite conocido más antiguo, pudiéndose decir que existe paralelo a la historia de la humanidad, ya que el olivo es mencionado en libros sagrados tales como el Antiguo Testamento o el Código Hammurabi. Los físicos Hipócrates y Galeno lo ensalzaron como un combinado de alimento y medicina.

La introducción del olivo en las costas mediterráneas es debida a los romanos, aunque son los arábigos los que impulsaron su cultivo. Hoy en día España es la primera productora de aceite de oliva, con un 33% de la producción mundial (Mataix, J. y Martínez de Victoria, E., 1989).

La definición de este alimento, según el Código Alimentario Español es la de "líquido oleoso extraído de los frutos maduros del olivo, *Olea Europa*, sin que haya sido sometido a manipulaciones o tratamientos no autorizados por la legislación" (García, R. et al., 1989).

Según la reglamentación técnica-sanitaria sobre aceites vegetales, se le adjudica la denominación de "aceite de oliva" al aceite procedente de los frutos del olivo, prensados mecánicamente, con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos térmicos y de toda mezcla con otros aceites de otra naturaleza, excluyendo por tanto de esta denominación al aceite de orujo, aunque este proceda de las aceitunas.

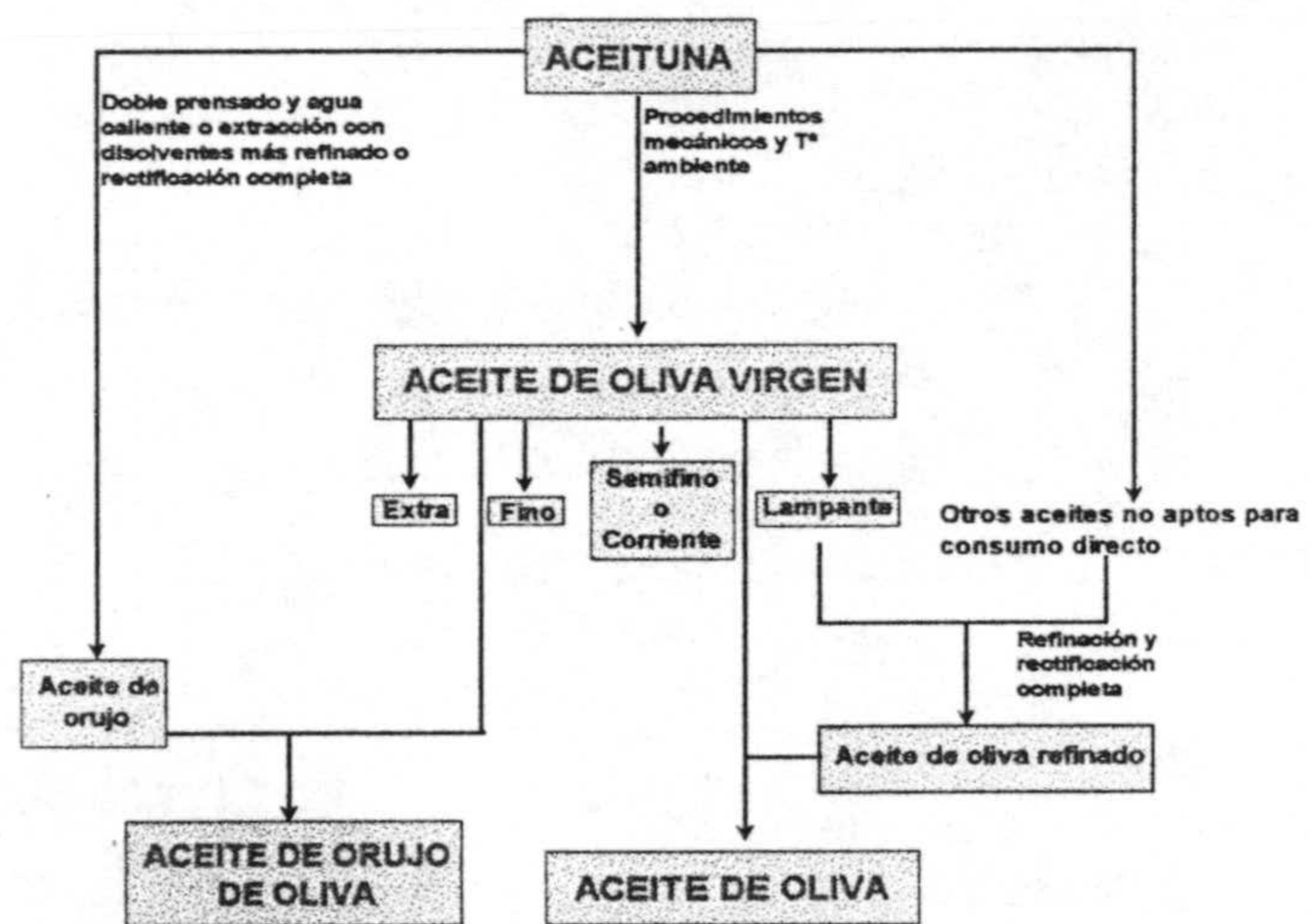


Figura 1.- Categorías o tipos de aceite de oliva.

Dentro de esta definición están comprendidos varios tipos o categorías de aceite de oliva (figura 1).

a) Aceite de oliva virgen.- Es el aceite obtenido únicamente por procedimientos mecánicos o por otros físicos en condiciones térmicas especiales, que no produzcan alteraciones del aceite, sin más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Los aceites de oliva virgen pueden ser en base a su acidez, extra (acidez menor



o igual a 1°), fino (entre 1° y 1.5°), semifino o corriente (entre 1.5° y 3°) y lampante (3°).

b) Aceite de oliva refinado.- Es el obtenido a través de un proceso de refinamiento y rectificación completa del aceite de oliva virgen que no reúne las condiciones necesarias para su consumo directo, perdiendo en mayor o menor grado sus características originales.

c) Aceite de oliva.- Con este nombre se denomina al aceite resultante de la mezcla de aceite de oliva virgen y refinado.

### 1.1.- Composición

El aceite de oliva está compuesto por una fracción mayoritaria, la fracción saponificable, y una fracción minoritaria, la insaponificable, con un porcentaje menor o igual al 1.5% (García, R. et al., 1989; Mataix, J. y Martínez de Victoria, E., 1989).

#### 1.1.1.- Fracción saponificable

Esta fracción está compuesta por triglicéridos y ácidos grasos libres. El aceite de oliva se caracteriza por presentar un porcentaje muy alto de ácidos grasos monoinsaturados, concretamente ácido oleico, llegando a representar este ácido hasta un 83% del total de ácidos grasos en algunos aceites.

Presenta un bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados, concretamente ácido linoleico y ácido linolénico. Otros ácidos presentes en mayor o menor porcentaje son el palmítico, palmitoleico y estearico.

El porcentaje de los distintos ácidos grasos presentes no es siempre el mismo para todos los aceites, sino que está sometido a un amplio rango de valores en base a las múltiples variedades de olivo y por tanto de aceituna existentes, a la latitud, el clima, época de recolección, grado de maduración y otros factores (Uceda, M. y Hermoso, M., 1996). En la figura 2 se muestran los distintos porcentajes de ácido oleico y

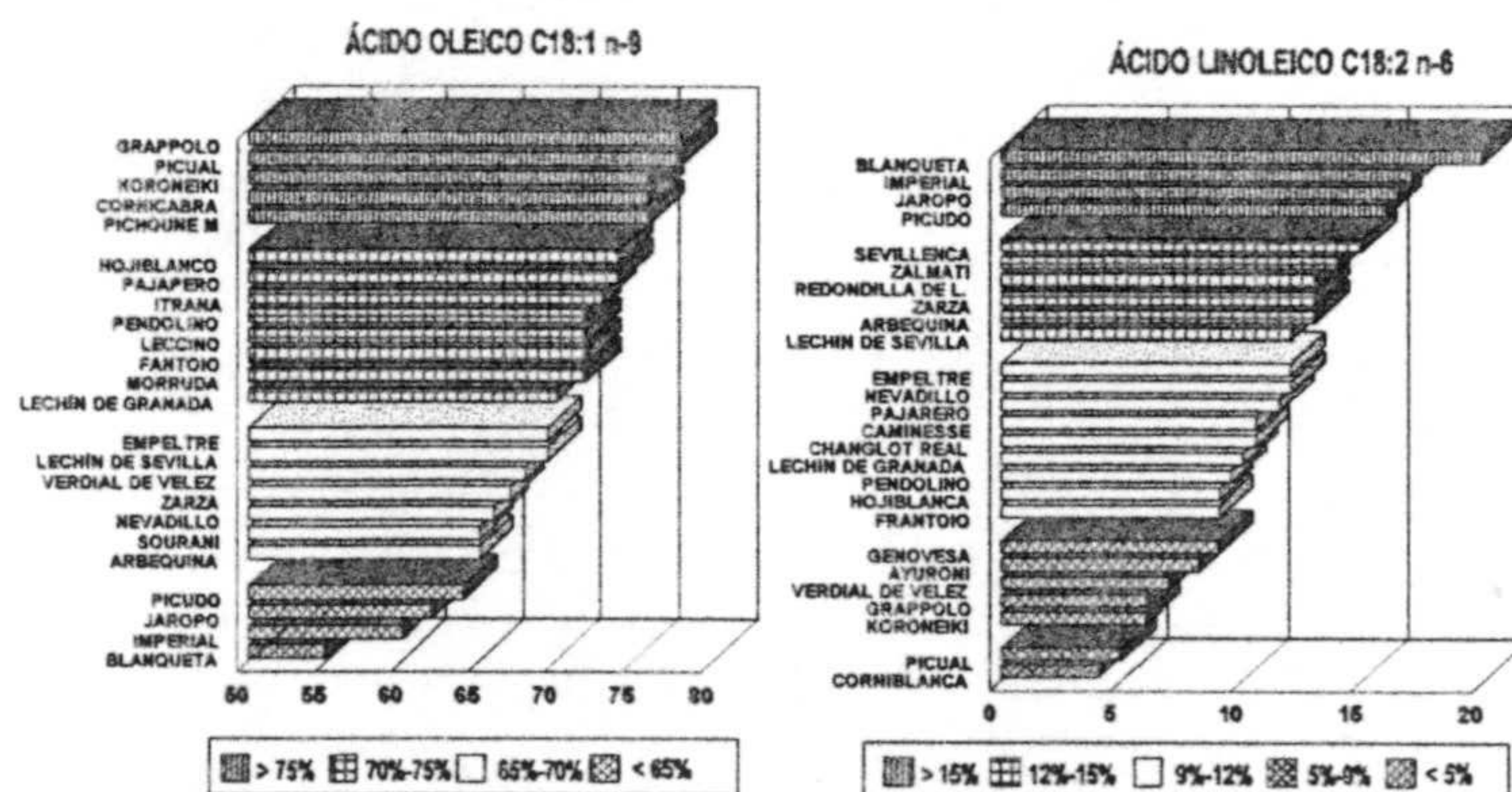


Figura 2.- Variaciones en los contenidos de ác. oleico y linoleico en diferentes variedades de aceite de oliva.



linoleico existentes en distintas variedades españolas e italianas.

#### 1.1.2.- Fracción insaponificable

Estos componentes menores, cuyo contenido varía de 0.5% a 1.5%, se presenta en diferentes fracciones.

##### a) *Hidrocarburos o terpenos*

Son los compuestos menos polares del insaponificable, constituyendo entre un 50% y 60% del contenido total de la fracción insaponificable.

Dentro de este grupo destaca el escualeno, siendo en este compuesto el aceite de oliva mucho más rico que otros aceites de semillas. También se encuentran carotenos, especialmente el  $\beta$ -caroteno, factor provitamina A del aceite.

##### b) *Esteroles*

En el aceite de oliva se han detectado los siguientes compuestos pertenecientes a este grupo: campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol y  $\Delta^5$ avenasterol.

##### c) *Tocoferoles*

Entre un 90% a 95% del tocoferol total en el aceite se presenta en forma de  $\alpha$ -tocoferol, presentándose las formas  $\beta$  y  $\gamma$  por debajo del 10% y la forma  $\delta$  en un porcentaje muy alto. El contenido de este grupo en el aceite de oliva está, como sucedía con el saponificable, sometido a cambios en su valor en base a la variedad y otros factores.

##### d) *Clorofilas*

Son las responsables junto a los carotenos del color verde-amarillo característico de este aceite. Las clorofilas en presencia de luz ejercen una actividad prooxidante, mientras que en ausencia de la misma actúan como antioxidantes.

##### e) *Alcoholes, ésteres, éteres y otros compuestos*

Junto a todos los compuestos antes mencionados y a los polifenoles, se encuentran otra serie de compuestos como pueden ser ésteres de ácidos grasos, alcoholes de triterpeno y una serie de compuestos múltiples.

##### f) *Polifenoles*



La presencia de polifenoles en el aceite de oliva virgen fué mencionada primeramente por Canzorení en 1906, quien obtuvo compuestos de esta naturaleza por arrastre con vapor de agua, atribuyéndoles una posible actividad antioxidante, actividad confirmada por Heimann en 1956. Los primeros ensayos para la determinación cuantitativa de polifenoles se debe a Cantarelli y colaboradores, ensayos continuados por Montedoro (*Vázquez Roncero, A. et. al., 1973*).

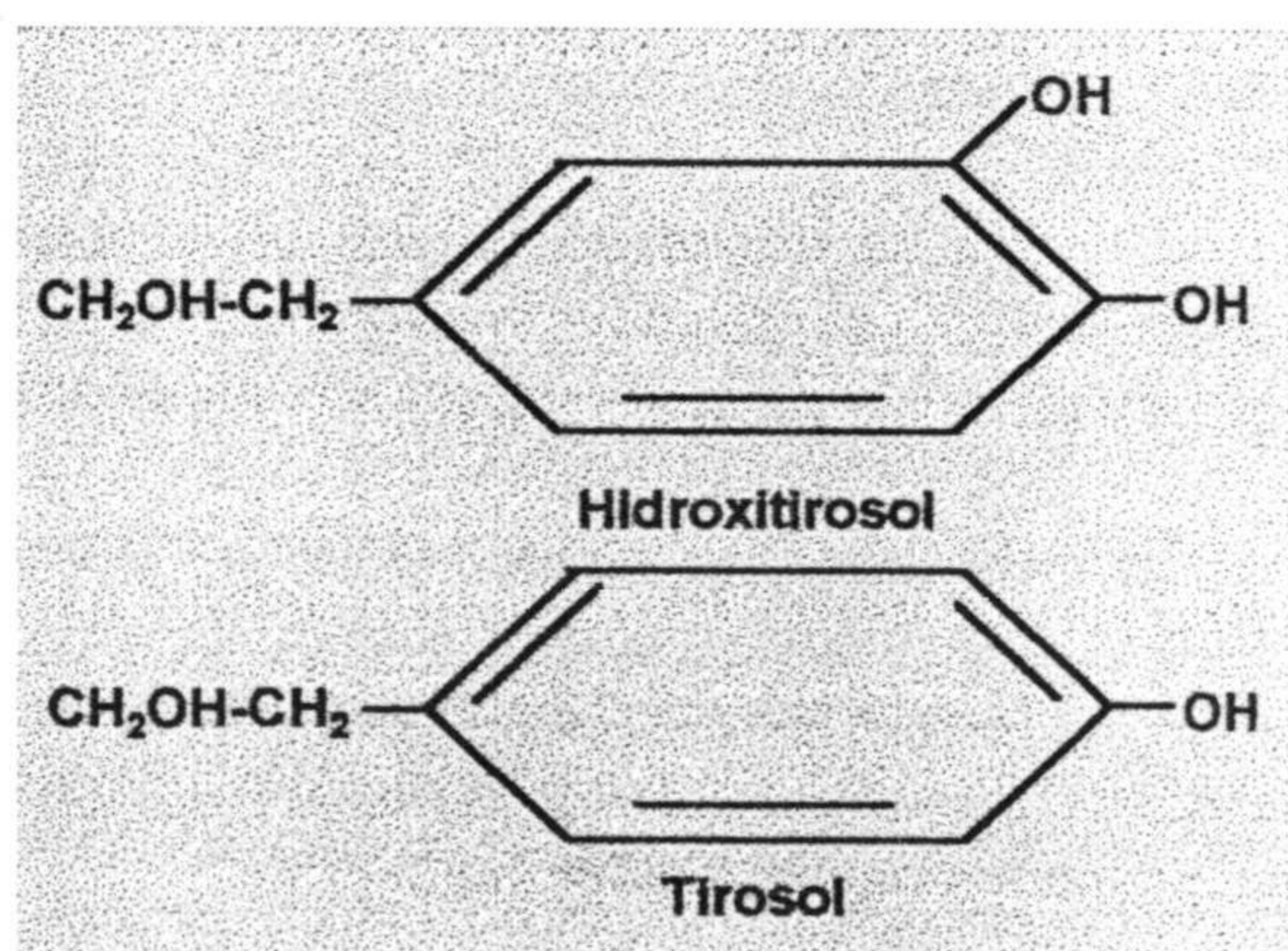
El contenido de polifenoles en aceite de oliva virgen varía generalmente entre 50 y 500 ppm en ácido cafeico, dependiendo en gran medida de la variedad, maduración y proceso de extracción entre otros factores (*Uceda, M. y Hermoso, M., 1996*). Aunque nunca por debajo de 50 ppm, siendo el único aceite comestible que contiene polifenoles naturales. Los procesos de refinamiento producen la pérdida de estos compuestos así como del tocoferol.

Los polifenoles se localizan primordialmente en la pulpa de la aceituna, y como consecuencia de su naturaleza soluble en agua gran parte de ellos se pierde en las aguas glicerasas durante la extracción del aceite, pasando al alpechín, sobre todo los componentes fenólicos más polares y los glucósidos. En el alpechín son las principales sustancias contaminantes y por su carácter antibiótico resultan tóxicos para los microorganismos encargados de la depuración anaeróbica (*Vázquez Roncero, A. et. al., 1973; Maestro Duran, R. et. al., 1994*). Algunos de ellos pasan al aceite, donde se han encontrado fundamentalmente los siguientes polifenoles (*Maestro Duran, R. et. al., 1994*).

a) Ácidos fenólicos.- Dentro de este grupo se encuentran ácidos cinámicos (p-cumárico, sináptico y cafeico) y ácidos fenólicos simples (homovanílico, gentsico, p-hidroxibenzoico y sirínico).

b) Productos de la hidrólisis de la oleuropeína, glucosido responsable del sabor amargo de los frutos. Estos derivados son el hidroxitirosol ( $\beta$ -3,4-dihidroxifenil etanol) y el tirosol (*figura 3*), siendo estos los más abundantes ya que representan el 50% del total de polifenoles presentes en el aceite de oliva virgen.

c) Flavonoides.- Se han identificado varias flavonas, entre las que se encuentran luteolina y apigenina.



*Figura 3.- Estructura de hidroxitirosol y tirosol.*



A estos compuestos se les atribuyen múltiples propiedades en relación al aceite de oliva. Así, se ha observado su relación con los caracteres organolépticos del mismo (Vázquez Roncer, A. et. al., 1973), siendo uno de los aspectos más importantes el incremento de la estabilidad AOM del aceite de oliva virgen (horas necesarias para alcanzar un índice de peróxidos de 100), gracias a la actuación de los polifenoles como inhibidores de la autoxidación del mismo, función llevada a cabo principalmente por el hidroxitirosol y en parte por el ácido cafeico (Vázquez Roncero, A. et. al., 1973; Mesa, J.G.A. et. al., 1990).

Otros componentes fenólicos como el tirosol, p-cumárico, etc., ejercen poca o ninguna contribución a este incremento en la estabilidad del aceite (Papadopoulos, G. et. al., 1993).

Los polifenoles también presentan una actividad bactericida e inhibidora de múltiples enzimas, como celulasas, enzimas celulolíticas de la propia aceituna e incluso lipoxigenasas (Maestro Duran, R. et. al., 1994).

En otros estudios, se ha mostrado la eficacia de la oleuropeina como un agente protector de las plantas frente a microorganismos (Maestro Duran, R. et. al. 1993). También se ha mostrado una interrelación entre hipertensión y oleuropeina, así como con el incremento de los niveles de esterol de colesterol y disminución de triglicéridos en corazón de rata, aunque en este estudio se utilizaban dosis de 25 a 50 mg de oleuropeina por Kg de peso de rata (Ruíz-Gutiérrez, V. et. al., 1995).

Respecto a su función antioxidante los estudios llevados a cabo con estos polifenoles, fundamentalmente oleuropeina o sus derivados, son prácticamente inexistentes y generalmente se trata de estudios "in vitro" y con dosis muy elevadas. Así, la oleuropeina ha mostrado en estudios "in vitro" una protección frente la oxidación inducida por cobre de las lipoproteínas de baja densidad, sugiriéndose que actúa de modo similar a como lo hacen a los flavonoides, mediante la quelación de metales y incluso como un posible interceptor de la cadena de radicales libres (Visioli, F. y Calli, C., 1994). Otro estudio realizado en conejos, muestra que antioxidantes dietarios presentes en el aceite de oliva virgen y distintos al tocoferol, muestran una capacidad para alargar el periodo de inducción de la lipoperoxidación en LDL, aunque los dienos conjugados no se ven afectados (Wiseman, S.A. et. al., 1996).

Un estudio "in vitro" sobre la inhibición de la citotoxicidad inducida por especies reactivas del oxígeno sobre líneas celulares humanas Caco-2, muestra una capacidad antioxidativa frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el hidroxitirosol y frente a la oxidación inducida por el sistema xantina-xantina oxidasa a concentraciones más bajas. También se observó la baja efectividad en este campo del tirosol y la necesidad de la estructura orto-dihidroxilo para la actividad antioxidante del hidroxitirosol (Manna, C. et. al., 1997).



La esencialidad de la estructura orto-dihidroxilo, también ha sido observada en otros estudios "in vitro" frente a la citotoxicidad del  $H_2O_2$ , pero en otros compuestos fenólicos como es el caso del ácido cafeico, también se muestra en este estudio que la capacidad antioxidativa en membrana de este compuesto se incrementa con la metilación del grupo carboxilo libre, sugiriéndose que es consecuencia de la posible repulsión electrostática entre la carga negativa de este grupo y los fosfolípidos de membrana (Nakayama, S., 1994).

### 1.2.- Variedades Picual y Arbequina

La variedad Picual (*figura 4*) es conocida con otras muchas denominaciones, entre las que destacan "Marteño", "Nevadillo" y "Lopereño". Es una variedad muy apreciada por su precoz entrada en producción, alta productividad, rendimiento graso elevado y facilidad de cultivo. Destaca por su alto índice de estabilidad y por su alto contenido en ácido oleico y en polifenoles (Barranco, D., 1996).



*Figura 4.-* Aceitunas variedades Picual y Arbequina

En lo que respecta a su distribución en España, se encuentra en la casi totalidad de Jaén, norte de Granada y este de Córdoba.

La variedad Arbequina, al igual que la Picual, es apreciada por su entrada precoz en producción y buen rendimiento graso, aunque su recolección mecánica se ve dificultada por el pequeño tamaño de su fruto. Presenta baja estabilidad, relativamente bajo contenido en polifenoles y un menor contenido en ácido oleico que la variedad Picual. Ocupa casi toda Cataluña (Barranco, D., 1996).

### 1.3.- Aceite de oliva y salud humana

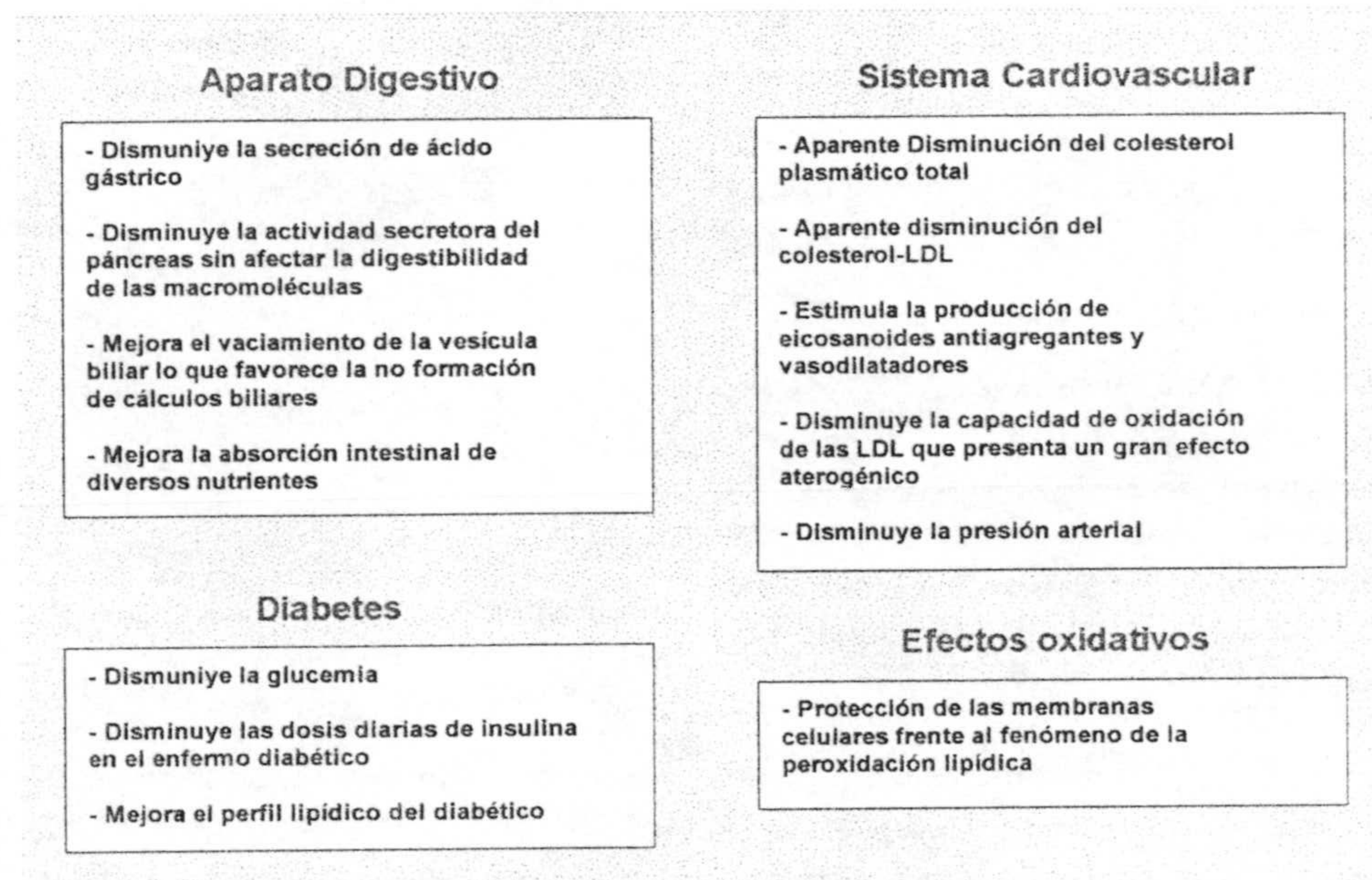
Una de las primeras menciones del papel beneficioso del aceite de oliva, en el ámbito científico, se debe a Key y su estudio de los siete países. En este estudio se observó que Creta consumía altas cantidades de grasa, siendo la principal fuente el aceite de oliva, sin embargo los niveles plasmáticos de colesterol no eran elevados y la incidencia de enfermedad coronaria isquémica era muy baja.

A partir de este estudio, el aceite de oliva deja de ser el gran ignorado y comienzan a mostrarse numerosos aspectos beneficiosos de este aceite de oliva en comparación con otras fuentes grasas, saturadas y poliinsaturadas, y no sólo en el campo de las patologías cardiovasculares, sino en alteraciones gastrointestinales, diabetes, daños oxidativos, etc.



(Mataix, J., 1994; Martínez de Victoria, E. y Mañas, M., 1996).

Así se han observado efectos coleréticos y colagogos del aceite de oliva, marcada inhibición de la secreción gástrica, protección de las membranas mitocondriales y microsomales frente a la peroxidación lipídica, etc. En la *figura 5* se muestra un resumen de los principales efectos del aceite de oliva sobre distintos aspectos relacionados con la salud.



*Figura 5.*- Principales efectos del aceite de oliva sobre distintos aspectos relacionados con la salud.

En el punto de vista antioxidativo, se ha observado en estudios realizados por nuestro grupo de investigación, que el aceite de oliva induce una menor peroxidación lipídica en membranas mitocondriales en hígado, corazón y músculo en ratas sometidas a ejercicio frente en comparación con otros aceites más poliinsaturados, en concreto el aceite de girasol, mejorando además la funcionalidad mitocondrial, lo que repercute en la obtención de energía (Quiles, J. L., 1995). Resultados similares se han observado en otro estudio en el que se comparaba la protección frente a la peroxidación lipídica de estas dos fuentes grasas en ratas tras la administración de adriamicina (De Teresa, C., 1995).



## 2.- MITOCONDRIAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las mitocondrias son pequeños orgánulos presentes en el citoplasma de las células aeróbicas, tanto su forma como tamaño es variable en función del tipo celular y de su estado metabólico. Su función principal es la obtención de energía metabólica (ATP) a través de la fosforilación oxidativa.

Se caracterizan principalmente por su alto grado de autonomía tanto genética como metabólica.

La estructura de la mitocondria está constituida por una doble membrana separando dos compartimentos (*figura 6*).

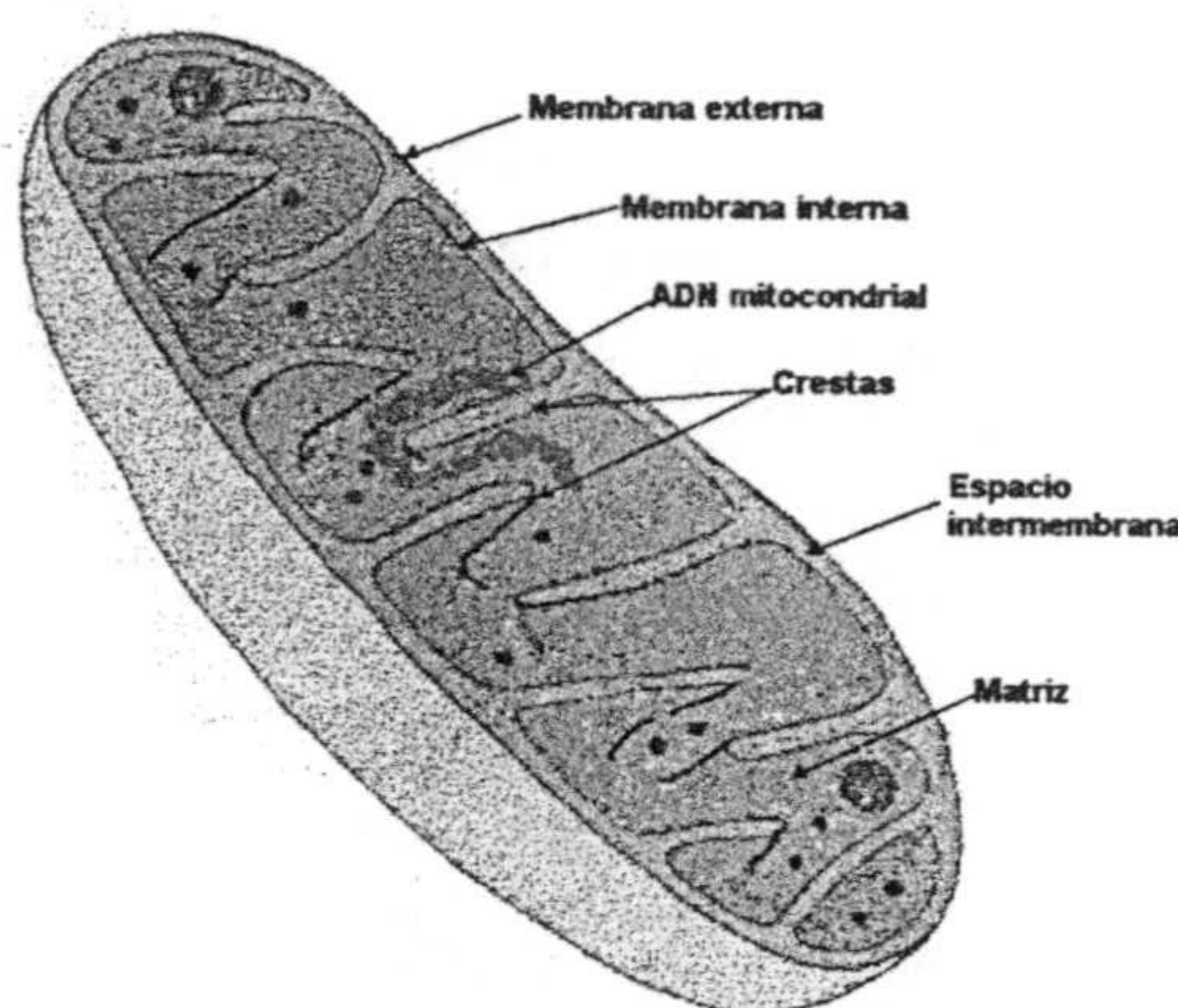
La membrana externa es lisa y algo elástica, con un 40% de lípidos y un 60% proteínas, presenta más colesterol y fosfolípidos que la membrana interna. Esta membrana es permeable a moléculas de bajo peso molecular (no superior a 10000 dalton).

La membrana interna, presenta una serie de pliegues (crestas mitocondriales), las cuales son un recurso para aumentar el área superficial de esta membrana en relación con el volumen mitocondrial y cuyo número está en relación con la intensidad respiratoria del tejido. La membrana interna está constituida por un 20% de lípidos y un 80% proteínas, siendo muy rica en cardiolipina, la cual puede encontrarse presente en la membrana en forma de sal o de complejo de quelación con cationes diferentes, especialmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (de Teresa, C., 1995). Presenta poco colesterol y es muy rica en ácidos grasos no saturados lo cual explica su baja viscosidad. Es impermeable a los iones.

La principal diferencia, en cuanto a composición, entre ambas membranas es la relación lípidos:proteínas, relación que presenta un valor de 0.8 en la membrana externa y de 0.3 en la interna.

Dentro de los lípidos presentes el 75% son fosfolípidos, predominando la fosfatidilcolina y el fosfatidiletanolamina.

La estructura se completa con un espacio intermembrana, localizado entre ambas membranas y una matriz, rodeada por la membrana interna.



*Figura 6.-* Esquema tridimensional de un corte longitudinal de una mitocondria.



La matriz mitocondrial es una fase gelatinosa, donde tiene lugar el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbónicos.

Cada una de estas estructuras, como se muestra en la *tabla 1*, presentan una serie de sistemas enzimáticos pertenecientes a vías oxidativas, biosintéticas, de transporte y las necesarias para la expresión del genoma mitocondrial.

Como se ha mencionado al inicio de este apartado, la función principal de la

*Tabla 1.-* Componentes enzimáticos de los compartimentos mitocondriales

MEMBRANA EXTERNA	NADH-citocromo b <sub>5</sub> reductasa	Monoamino oxidasa	Citocromo b <sub>5</sub>
	Quinurenina hidroxilasa	A. fosfatídico fosfatasa	Lisofosfatidil acil transferasa
	Glicerol fosfato acil transferasa	Nucleosido difosfoquinasa	Elongasa de los ácidos grasos
	Fosfolipasa A		
ESPACIO INTERMEMBRANA	Adenilato quinasa (miocinasa)	Nucleosido difosfoquinasa	
	Nucleosido monofosfoquinasa		
MEMBRANA INTERNA	NADH-coenzima Q reductasa	Succinato-coenzima Q reductasa	
	Ubiquinol-citocromo c reductasa	Citocromo c oxidasa	
	b-hidroxi butirato deshidrogenasa	Piridin nucleotido transhidrogenasa	
	Carnitina acil transferasa	Ferroquelatasa	
	ATP sintetasa	ATP translocasa	
MATRIZ	Piruvato deshidrogenasa	Aspartato aminotransferasa	ARN polimerasa
	a-cetoglutarato deshidrogenasa	Ornitina Carbamiltransferasa	ADN polimerasa
	Citrato sintasa	Carbamil fosfato sintetasa	
	Aconitasa	Acil-CoA sintetasa	
	Isocitrato deshidrogenasa (NAD)	Acil-CoA deshidrogenasa	
	Isocitrato deshidrogenasa (NADP)	Enoil hidrasa	
	Fumarasa	b-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	
	Glutamato deshidrogenasa	b-cetoacil-CoA tiolasa	
	Piruvato carboxilasa	Enzima activadora de los aminoácidos	

mitocondria es la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa, proceso que tiene lugar en la membrana interna mitocondrial.

La fosforilación oxidativa es un proceso mediante el cual la disminución de energía libre que acompaña a la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, se acopla a un desplazamiento vectorial de protones desde la matriz al espacio exterior de la membrana interna. Gracias a este desplazamiento vectorial y a que la membrana interna es impermeable a los protones se crea un gradiente electroquímico entre el exterior y el interior de la mitocondria, cuya energía o fuerza protón-motriz permite la síntesis de ATP mediante la ATP sintetasa.





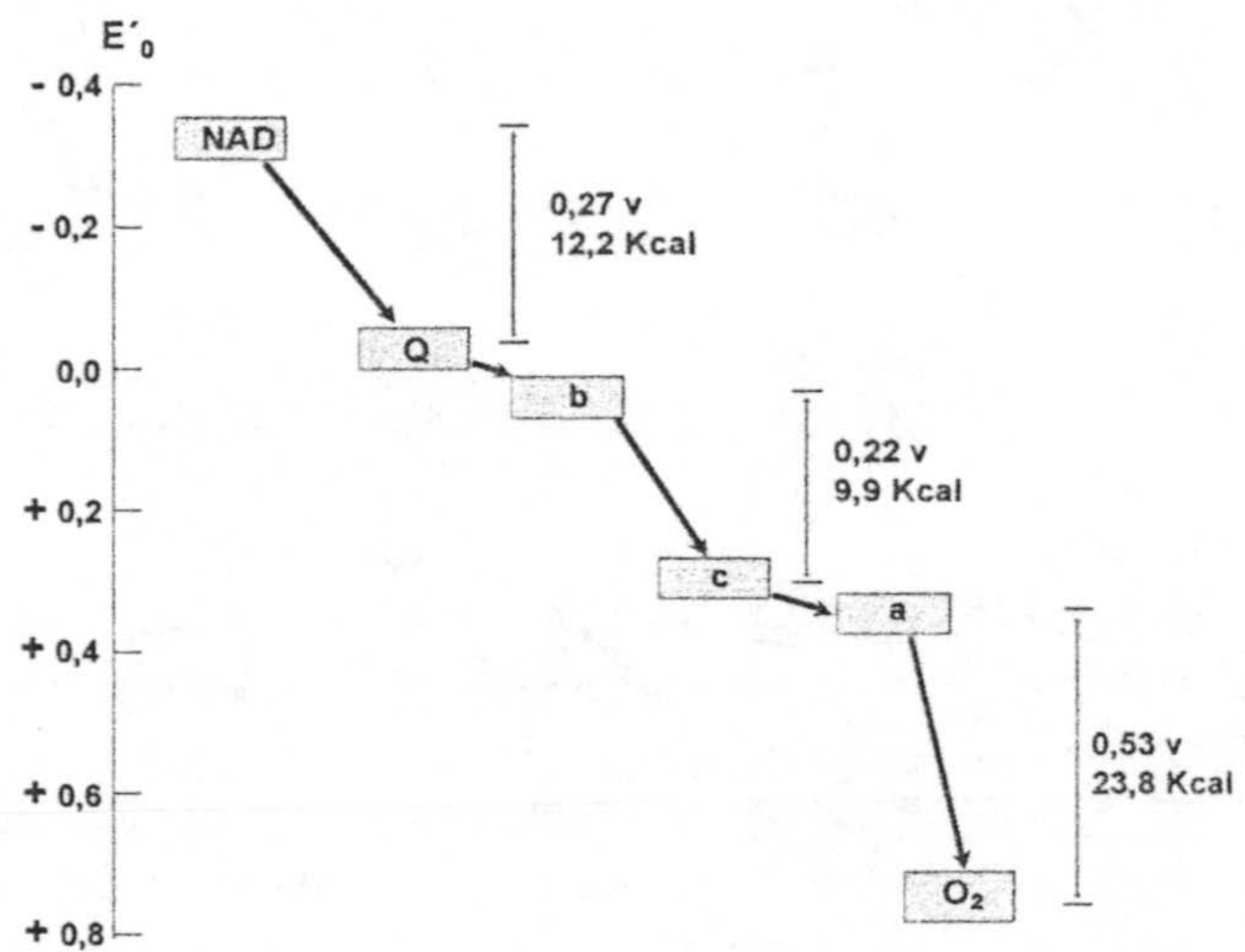


la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

De los aproximadamente 60 polipéptidos que constituyen estos complejos, trece son codificados por el ADN mitocondrial; siete del complejo I, uno del complejo II, tres del complejo III y dos del complejo V.

Los transportadores de electrones son estructuras quinónicas (FMN, FAD, coenzima Q) y complejos metálicos de transición (centros Fe-S, grupos hemo y proteínas con centro de Cu).

Como se observa en la *figura 8*, en la cadena de transporte de electrones hay tres puntos, a nivel de los complejos I, II, y IV, en los que se produce descensos relativamente grandes de energía libre, teniendo lugar el desplazamiento vectorial de protones y aportando la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP.



*Figura 8.*- Puntos en los que se obtiene energía suficiente para generar una molécula de ATP

A partir de la etapa de transferencia de electrones del citocromo  $a+a_3$  al oxígeno, el proceso se hace irreversible, inclinándose así el sistema hacia la síntesis de ATP ( *Battino, M., 1989; Benzi, G., 1992* ).

### 2.1.- NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I)

Este primer complejo es el más grande de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, siendo el encargado de transferir electrones del NADH al coenzima Q, es decir, cataliza la reducción, sensible a la rotenona, de los homólogos de ubiquinona a partir del NADH. Acoplada a dicha transferencia de electrones, tiene lugar una translocación vectorial de protones ( $H^+$ ) desde la matriz al espacio intermembrana.

El complejo presenta un peso molecular de unos  $117 \times 10^4$  daltons, fué aislado por primera vez en 1961 por Hatefi et. al. en mitocondrias de corazón bovino (*Hatefi, Y. et. al., 1961; Hatefi, Y. et. al., 1963*). Se encuentra constituido por cerca de 41 polipéptidos y varios componentes no proteicos como FMN, hierro no hémico, azufre ácido-labil, CoQ y



fosfolípidos (*Ragan, C.I. et. al., 1982; Walker, J.S., 1992; Arizmendi, J.M. et. al., 1992*).

Los polipéptidos componentes de este complejo se pueden dividir en dos dominios, un dominio extrínseco y predominantemente hidrofílico y un dominio insertado en la membrana, hidrofóbico. Esta distribución parece estar relacionada con la codificación de los distintos componentes por el ADN mitocondrial y el ADN nuclear. Así se ha observado que todos los componentes codificados por el ADN mitocondrial se encuentran en el dominio hidrofóbico (*Chomyn, A. et. al., 1986; Friedrich, T., 1989*).

En los componentes hidrofílicos o hidrosolubles nos encontramos dos grupos o fracciones:

- La fracción hidrosoluble flavoproteica (FP), constituida por tres subunidades.
- La fracción hidrosoluble proteica (IP), constituida por 9 polipéptidos o subunidades.

La fracción FP, consiste en una NADH deshidrogenasa-flavin dependiente, que contiene FMN y presenta una notable especificidad por la quinona y el complejo férrico (análogo de la ubiquinona y el citocromo c) como aceptores electrónicos. Conjuntamente a esta NADH deshidrogenasa, el complejo I presenta 5 grupos Fe-S binucleares y 3 tetranucleares.

El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde la NADH a los homólogos ubiquinónicos y al ferrocianuro (como aceptor artificial de electrones), acoplándose a la reducción del coenzima Q, pero no a la del ferrocianuro, una translocación vectorial protónica. La transferencia de electrones es inhibida por rotenona, piericidina A, barbitúricos y mercuriales.

Hoy en día, no está clarificado totalmente el mecanismo de actuación de este complejo, quedando numerosos interrogantes, entre los que se encuentra la estequiometría  $H^+/e^-$  de la translocación protónica asociada a la transferencia de electrones y que según algunos autores podría ser de 1, 1.5 e incluso 2, dependiendo del modelo de transferencia de electrones que se siga. En los diversos modelos de transferencia de electrones entre los componentes del complejo I, se alternan las posiciones de los grupos Fe-S, FMN y del coenzima Q, modificándose así la estequiometría  $H^+/e^-$  (*Ragan, C.I., 1990*).

## **2.2.- Succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II)**

Se trata del complejo más simple de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Es el encargado de catalizar la transferencia de electrones desde el succinato



a la ubiquinona (*Hatefi, Y. et. al., 1976*) y se encuentra ubicado en la cara de la membrana interna mitocondrial que da a la matriz.

El complejo II de mamíferos presenta un peso molecular de unos  $2 \times 10^5$  daltons, se encuentra constituido por cuatro subunidades proteicas codificadas por el ADN nuclear y contiene un grupo prostético FAD unido covalentemente, 3 centros Fe-S y un citocromo del tipo b, siendo estos compuestos los cromóforos del complejo II.

Los componentes del complejo II pueden dividirse en dos grandes fracciones: La enzima succinato deshidrogenasa (SDH) y los péptidos hidrofóbicos asociados con el citocromo  $b_{560}$ .

La SDH, se encuentra constituida por dos subunidades hidrosolubles de 70 y 27 Kdaltons, que contienen un FAD ligado covalentemente a la subunidad mayor, unión covalente cuya finalidad es la de aumentar el potencial redox estándar de la pareja FAD/FADH<sub>2</sub>, asemejándolo al de la pareja redox succinato/fumarato, facilitando así la actividad de la SDH (*Davis, K.A. y Hatefi, Y., 1971; Nichols, D.G., 1982*).

La composición aminoacídica de las dos subunidades de SDH, está altamente conservada entre las especies (*Schroder, I. et. al., 1991*).

El citocromo b del complejo II se diferencia de los encontrados en el citocromo III, no sólo por espectrofotometría, sino también en el origen. Así el citocromo b del complejo II se sintetiza en los ribosomas citosólicos, mientras que los del complejo III están codificados por el ADN mitocondrial (*Weiss, H. y Kolb, H.J., 1979*).

La actividad de la SDH, es estable sólo cuando el enzima está ligado a la membrana, porque la SDH aislada se deteriora rápidamente en condiciones aeróbicas (*Hatefi, Y. y Stiggall, D.L., 1976*).

### 2.3.- Ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (complejo III)

Es el complejo encargado de transferir los electrones de la ubiquinona reducida (CoQH<sub>2</sub>) o ubiquinol al citocromo c, acoplada a esta transferencia tiene lugar una translocación vectorial de protones desde la matriz al espacio intermembrana.

El complejo presenta un peso molecular de 25 Kdaltons, está constituido por 9-10 polipéptidos, tres de los cuales se encuentran asociados al centro redox:

- Hemo de los citocromos  $b_{562}$ ,  $b_{566}$  y  $c_1$



- Grupo (2Fe-2S)

Además, aparecen dos especies de ubisemiquinonas presentes en diferentes zonas del complejo III (Ohnisha, T. y Trunpower, B. L., 1980).

El complejo III se trata de un dímero que se extiende a través de la membrana interna mitocondrial, proyectándose por ambos lados fuera de la membrana (figura 9).

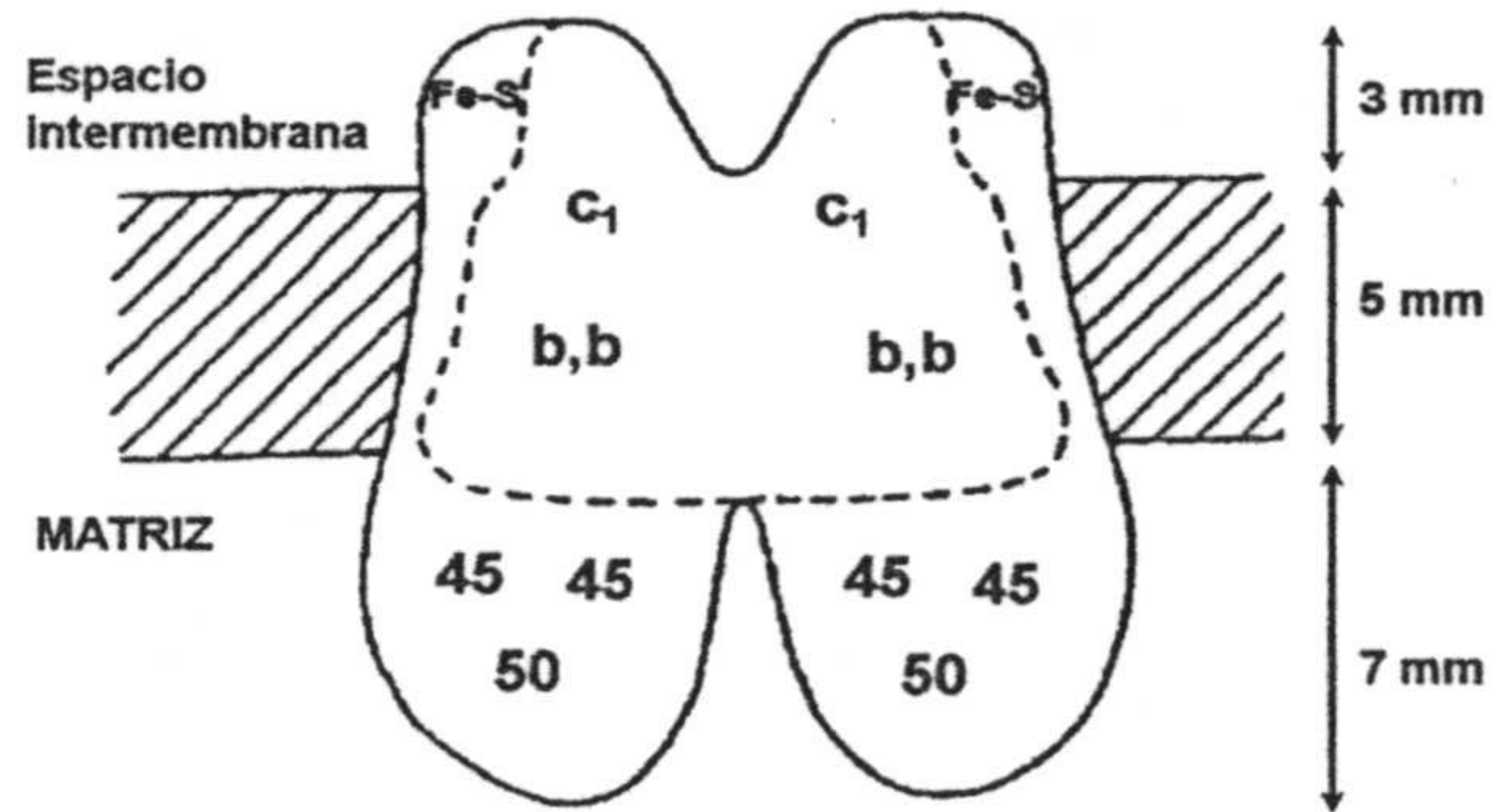


Figura 9.- Esquema posicional del complejo III en membrana.

Como se ha comentado anteriormente, acoplada a la transferencia de electrones tiene lugar una translocación de protones con un estequiometría  $H^+/e^-$  igual a 2.

El mecanismo de actuación de este complejo no está del todo clarificado, existiendo dos posibles hipótesis, una propuesta por Mitchell y denominada "Ciclo Q" (Mitchell, P., 1976; Monstantinov, A.A., 1990) y otra propuesta por Wikstrom denominada "Ciclo b" (Wikstrom, M. et. al., 1981).

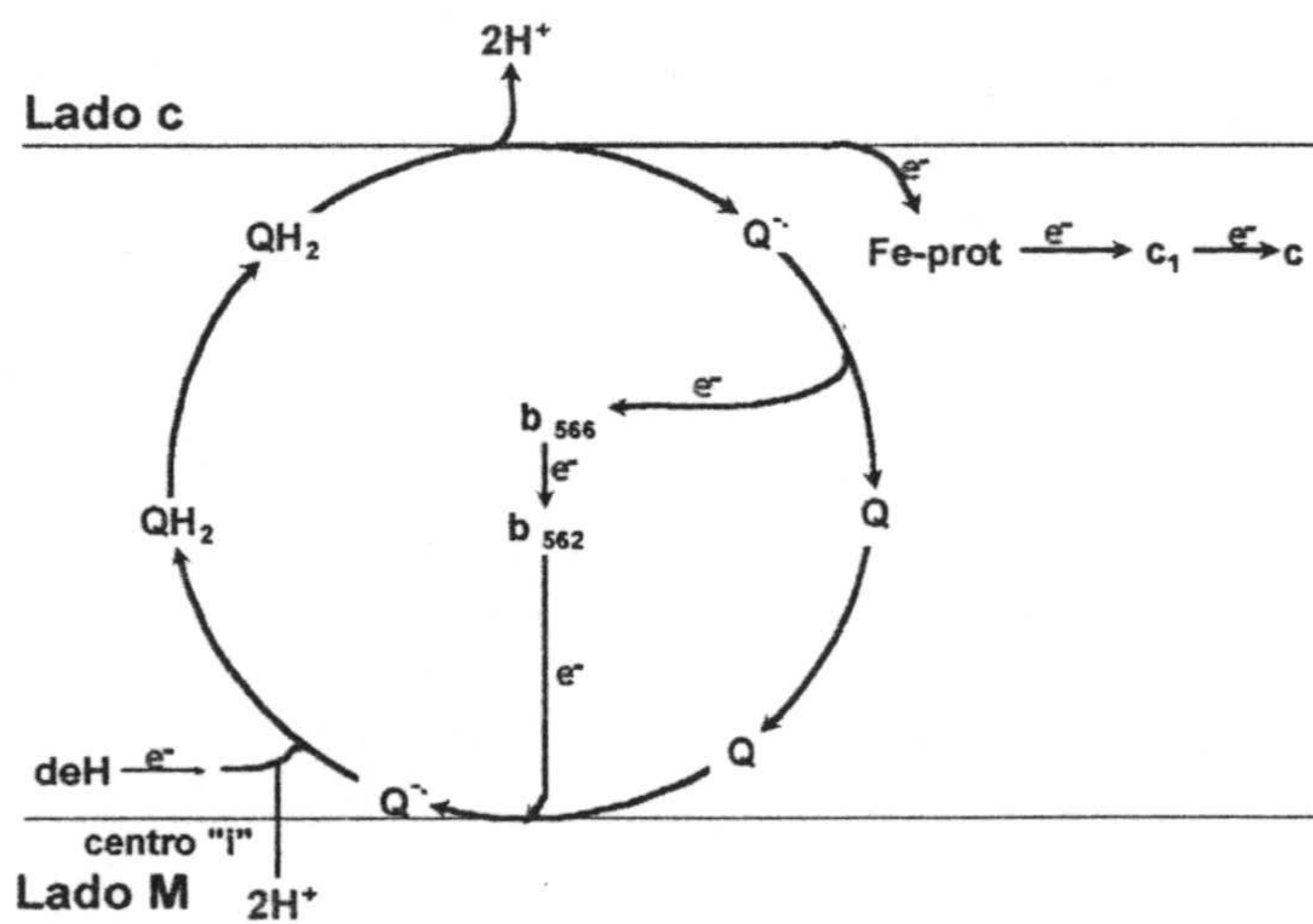


Figura 10.- Ilustración del "ciclo Q".

En ambas hipótesis, el complejo III se puede considerar como una estructura con dos centros redox de alta potencia (proteína Fe-S y citocromo  $c_1$ ), y dos de baja potencia (citocromo  $b_{562}$  y citocromo  $b_{566}$ ): Así, el ubiquinol cede un electrón a los centros de alta potencia y uno a los centros de baja potencia.

Según el "Ciclo Q" (figura 10), el ubiquinol cede un electrón



en un punto próximo al lado citoplasmático de la membrana (denominado centro "o") al citocromo c, mediante la proteína Fe-S y el citocromo  $c_1$ , esto determina la liberación de dos protones al lado citoplasmático de la membrana mitocondrial interna y la formación de semiquinona, la cual debido a su gran inestabilidad, cede rápidamente su electrón a los centros redox de baja potencia. El ciclo se completa cuando la quinona, en el denominado centro "i", situado próximo a la matriz, recibe un electrón del citocromo b, formando así una semiubiquinona que posteriormente es reducida a ubiquinol por la deshidrogenasa. Se tiene por tanto la transferencia escalar de un electrón del ubiquinol al citocromo c acompañado de la translocación vectorial de dos protones.

En el "Ciclo b" (figura 11), por el contrario, la translocación protónica tiene lugar en los citocromos b, por un mecanismo de bomba protónica acoplado a reacciones de oxidoreducción.

Así, en el "Ciclo Q", el transportador de protones es la ubiquinona y la estequiometría de la reacción es  $2H^+/e^-$ , mientras que en el "ciclo en b", el transportador es la molécula transmembrana de citocromo b y la estequiometría puede variar teóricamente según los aspectos moleculares de este mecanismo de translación.

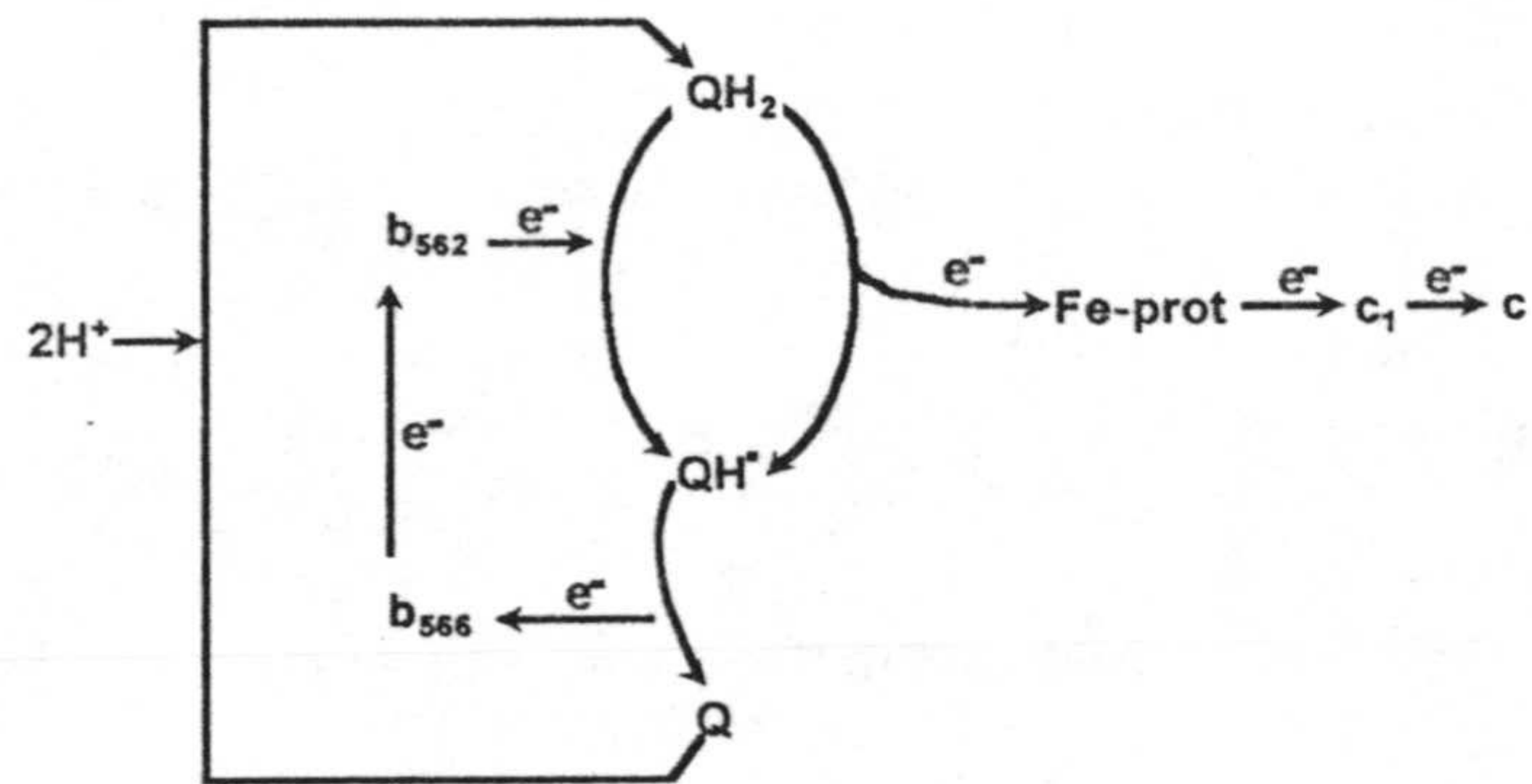


Figura 11.- Ilustración del "ciclo b".

#### 2.4.- Ferrocitocromo c:oxígeno oxidoreductasa o citocromo oxidasa (Complejo IV)

Va a ser el complejo encargado de catalizar la etapa terminal de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, es decir, la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno molecular. Acoplada a esta transferencia de electrones, tiene lugar una translocación protónica. Es inhibida específicamente por el cianuro.

La citocromo oxidasa atraviesa la membrana interna mitocondrial, presentando una estructura en "Y" (figura 12).

En mamíferos el complejo presenta 13 subunidades proteicas, con pesos moleculares que varían de 5000 a 56000 daltons. Las tres subunidades mayores (I, II y III), son codificadas por el ADN mitocondrial, e insertadas en la membrana por el lado de la



matriz (Tzagoloff, *a. et. al.*, 1979; Kadenbach, *B. et. al.*, 1983; Azzi, *A. y Müller, M.*, 1990).

El complejo IV, contiene como grupos protéticos dos hemos iguales ( $a$  y  $a_3$ ), cada uno asociado a un átomo de cobre ( $Cu_a$  y  $Cu_{a_3}$ ). Estos dos hemos, están localizados en dos diferentes ambientes y orientados perpendicularmente al plano de la membrana interna. El hierro hemínico  $a$  ( $Fe_a$ ), presenta seis uniones de coordinación y está unido axialmente al nitrógeno en dos imidazoles neutros (Hatefi, *Y.*, 1985), el hemo  $a_3$ , está unido en la posición axial a un nitrógeno imidazólico y al  $Cu_{a_3}$ .

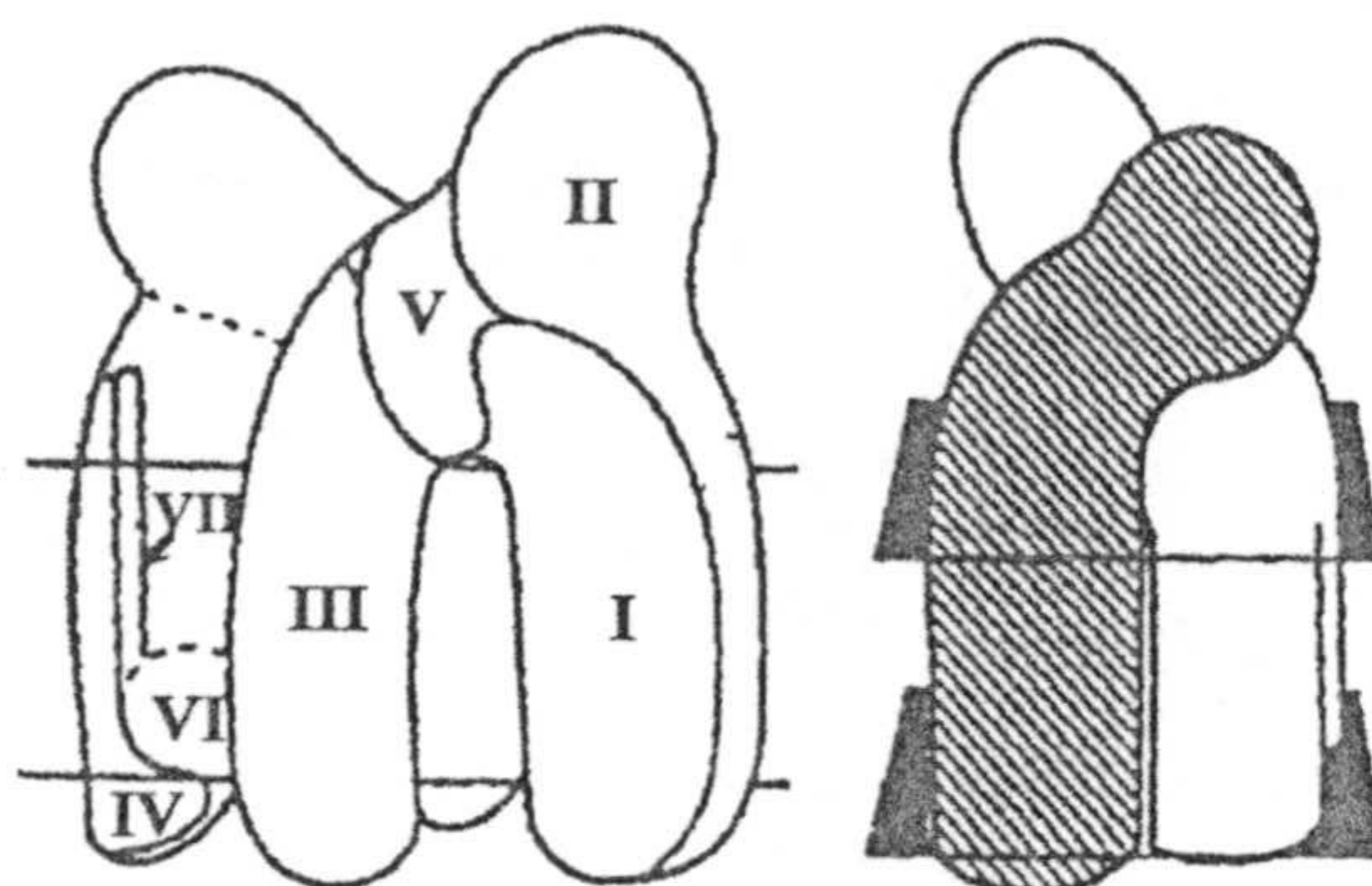


Figura 12.- Estructura tridimensional de la citocromo oxidasa.

Los grupos prostéticos de la citocromo oxidasa, se hallan localizados en las subunidades I y II (Ludwig, *B. y Schatz, G.*, 1980). En la subunidad III no aparecen centros metálicos, estando relacionada esta subunidad con la función de bomba protónica del enzima, ya que en experimentos realizados por Casey *et. al.* (Casey, *R.P. et. al.*, 1979), se observó que la dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) inhibía casi en un 80% la función de translocación protónica por reacción con la subunidad III, esta función también se ha observado en estudios posteriores (Malatesta, *F. et. al.*, 1983; Saraste, *M. et. al.*, 1981).

La citocromo oxidasa estaría compuesta por dos centros redox con una diferencia de potencial de 0.1 V, siendo el primer centro el citocromo  $a-Cu_a$  que es el aceptor de electrones del ferrocitocromo  $c$  y el segundo centro el citocromo  $a_3-Cu_{a_3}$ , encargado de reducir al oxígeno molecular.

La citocromo oxidasa tiene en cada monómero un sitio de alta afinidad y uno de baja afinidad para su unión al citocromo  $c$ .

Un mecanismo propuesto para explicar la reducción del oxígeno, prevee la captación de electrones con la formación de tres compuestos intermediarios: el intermediario I, se forma por la adquisición de dos electrones por el oxígeno molecular con reducción a peróxido; el intermediario II, se constituye por la adquisición de un tercer electrón que rompe la unión oxígeno-oxígeno, con la consecuente reducción del primer



átomo de oxígeno con formación de agua; el intermediario III, se debe a la adquisición de un cuarto electrón que reduce completamente el segundo átomo de oxígeno, terminándose así la reducción tetraelectrónica del oxígeno molecular (*Capaldi, R.A., 1990*).

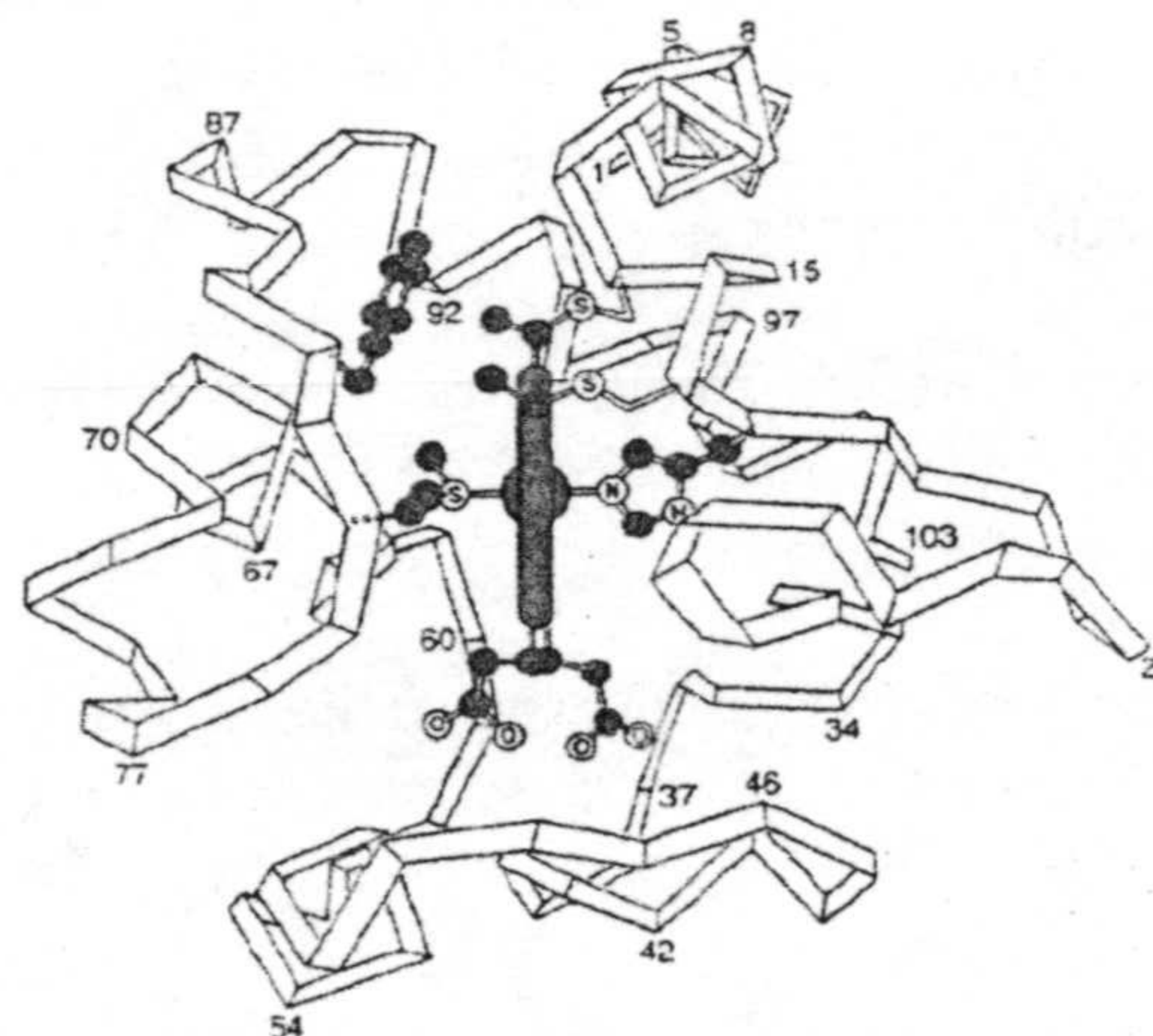
La estequiometría  $H^+/e^-$  tiene valores comprendidos entre uno y dos (*Wikstrom, M., 1979*).

## 2.5.- Citocromo c

El citocromo c es la única proteína de la cadena respiratoria extremadamente hidrófila y por ello fácilmente extraíble de la membrana mitocondrial, propiedad que ha permitido su purificación y cristalización.

Presenta una única cadena polipeptídica de 104 aminoácidos, con un grupo prostético hierro.protoporfirina IX, unido covalentemente a la cadena polipeptídica por enlaces tioester (*figura 13*).

La posiciones de coordinación del hierro, V y VI, se encargan de la unión con el nitrógeno imidazólico de la histidina 18 y con el azufre de la metionina 80, obligando así al hemo a adoptar una conformación planar tanto en el estado oxidado como en el reducido.



*Figura 13.- Estructura del citocromo c.*

La superficie de la molécula está densamente cargada, con distintas áreas en las que los residuos catiónicos, en particular los de la lisina, son responsables de la interacción con el citocromo  $c_1$  y  $a + a_3$  en el funcionamiento normal de la cadena respiratoria.

El hierro del citocromo c pasa reversiblemente de la forma ferrosa a la férrica, haciendo posible la transferencia de electrones. La carga del hierro en el estado oxidado del citocromo c parece localizarse en el átomo de azufre de la metionina 80 y se estabiliza gracias a la interacción del azufre y la carga de los aminoácidos adyacentes. La llegada de un electrón desestabilizaría este equilibrio y facilitaría la reducción del hemo.



### Coenzima Q

El coenzima Q o ubiquinona (2,3 dimetoxi-5-metil-6-poliprenil benzoquinona) (figura 14), es una benzoquinona que presenta en la posición 6 una cadena lateral constituida por un número variable (de 1 a 15) de unidades isoprenoides. Fue descubierta independientemente por crane, en 1954, en los Estados Unidos y por Norton en Inglaterra (Crane, F.L. et. al., 1957).

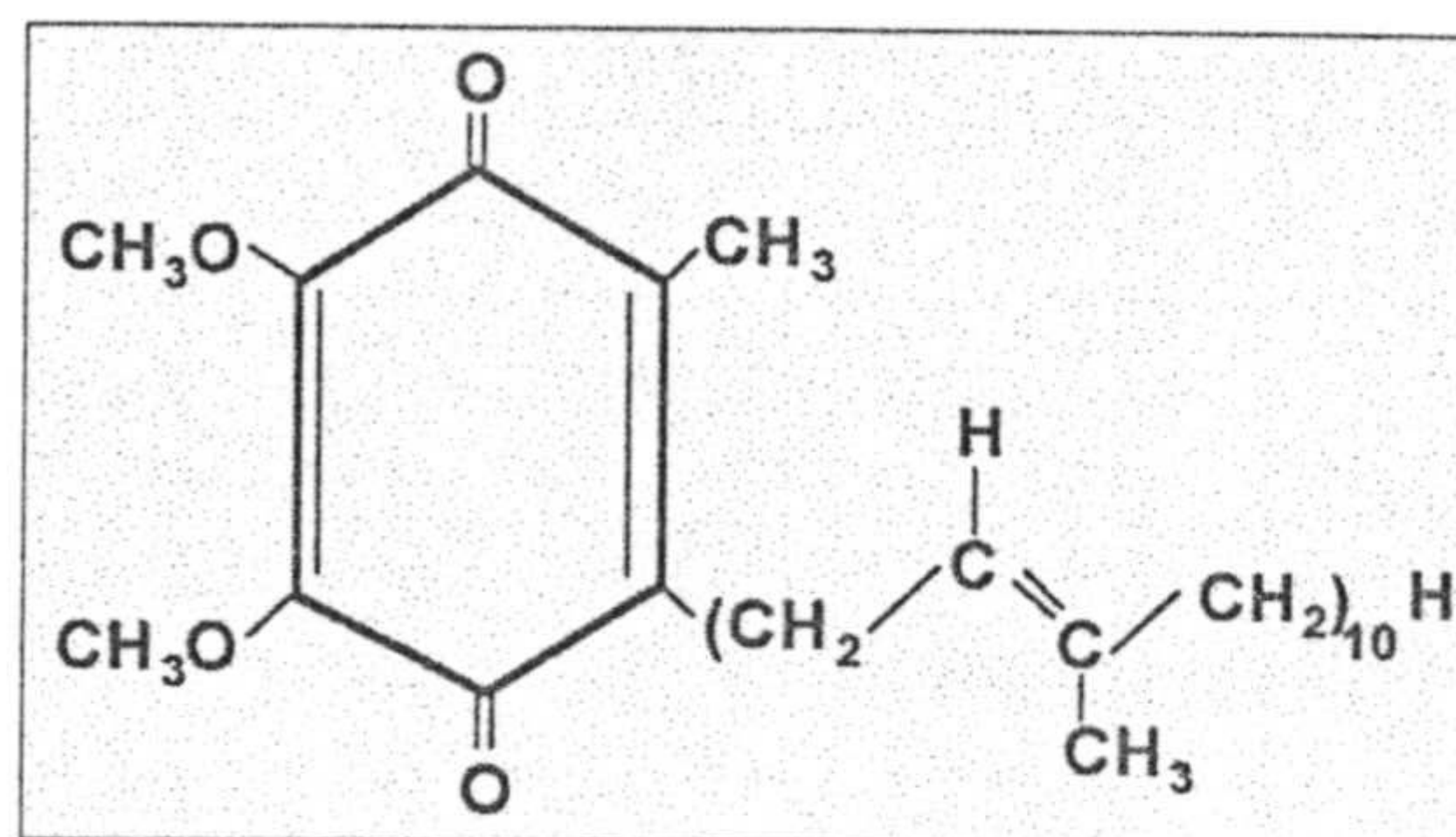


Figura 14.- Ubiquinona 10.

Las quinonas son dicetonas con estructura  $O=C-(C=C)_n-C=O$  derivadas de componentes aromáticos, sus grupos carbonilo se pueden encontrar en el mismo anillo o anillos separados, y su actividad electrófila determina la mayor parte de las propiedades oxidorreductoras de las quinona.

Las quinonas, representan la clase más amplia de compuestos quinónicos y están ampliamente difundidas en la naturaleza, se encuentran de hecho, como componentes de diversos sistemas biológicos.

Las quinonas metabólicamente importantes presentan una cadena lateral terpénica (ubiquinona, plastoquinona, vitamina K), que les permite localizarse en la fase lipídica de la membrana.

En los mamíferos, a excepción de los roedores que presentan  $CoQ_9$ , la ubiquinona presente es el  $CoQ_{10}$  (Ramasarma, T., 1985), es decir, la quinona dotada de 10 unidades isoprenoides en su cadena lateral.

Su función en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, es la de transferir electrones desde todos los complejos tipo DH (NADH:CoQ reductasa, Succinato:CoQ reductasa, colina DH,  $\alpha$ -glicerol P DH, etc.) al complejo III.

La ubiquinona parece estar localizada en el plano medio de la bicapa lipídica, con la cabeza polar oscilando transversalmente de un lado a otro de la

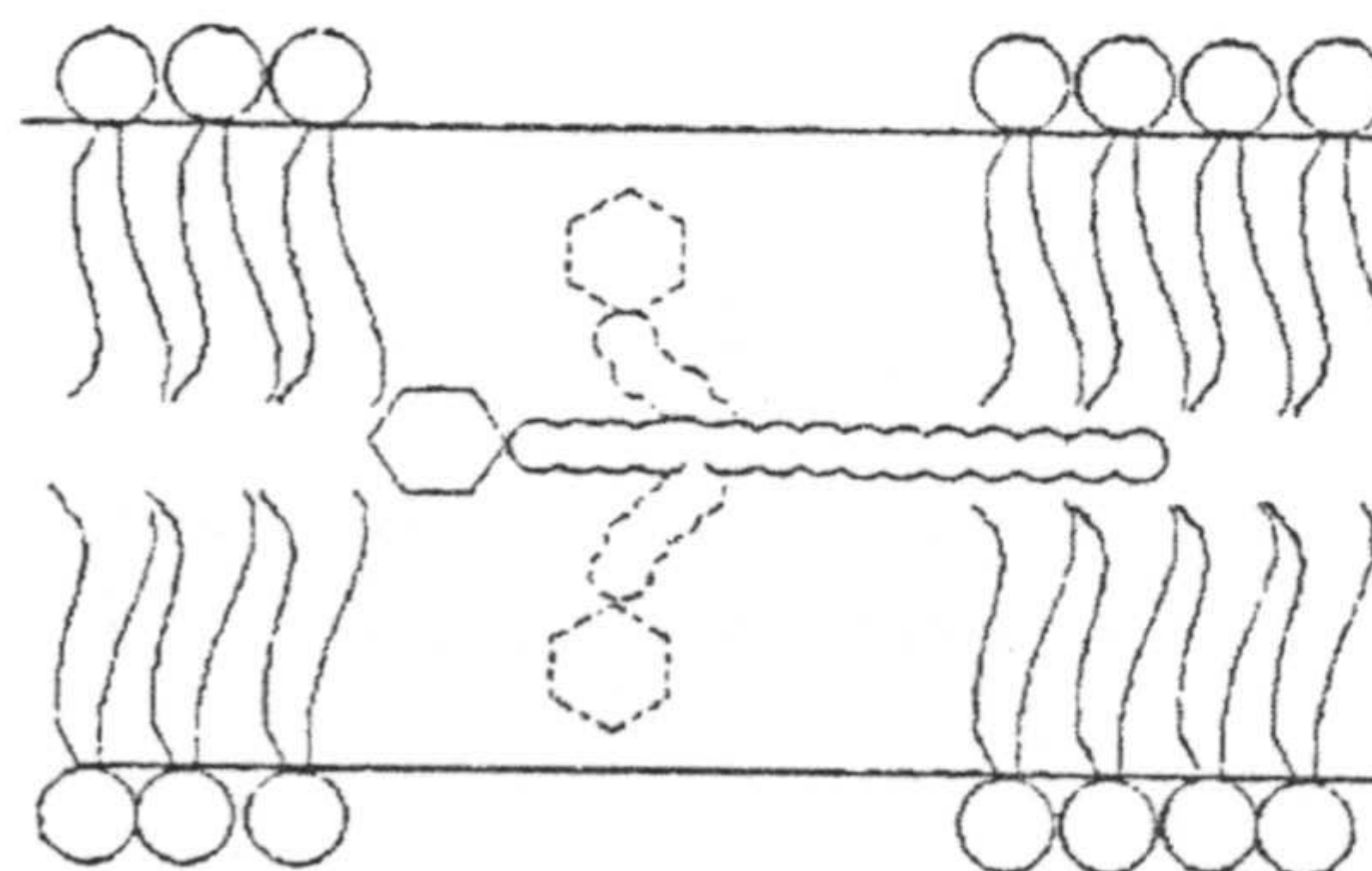


Figura 15.- Esquema de la posición y oscilaciones transversales de la ubiquinona 10.



membrana (Lenaz, G., 1988; Lenaz, G. et al., 1995; Samori, B. et al., 1992) (figura 15). Este movimiento transversal de la ubiquinona, es probable que este limitado a oscilaciones de su grupo polar, permitiendo las interacciones con los agentes redox solubles en agua.

Debido a su capacidad de difusión en los lípidos de membrana, se penso que podría ser un factor limitante, pero en condiciones fisiológicas la difusión de la ubiquinona no parece ser un afactor limitante para la actividad respiratoria (Fato, R. et al., 1986; Lenaz, G., 1988). Aunque si se ha comprobado que una disminución de los niveles fisiológicos de CoQ, disminuiría la capacidad de transferencia electrónica y por tanto la síntesis de ATP (Parenti-Castelli, G. et al., 1987; Battino, M. et al., 1989).

### 3.-RADICALES LIBRES

Los radicales libres, pueden ser definidos como especies químicas ,moléculas o átomos, capaces de existir independientemente con uno o más electrones desapareados en su última capa u orbital electrónico, es decir, con un número impar de electrones (Halliwell, B. et al., 1992; Cheesman, K.H. y Slater, T.F., 1993). Pueden estar cargados positivamente, negativamente o ser eléctricamente neutros.

Tabla 2.- Ejemplo de radicales libres y especies reactivas del oxígeno.

Radical	Nombre	Moléculas diana
$O_2^{\cdot -}$	Superóxido	Enzimas
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
$HO^{\cdot}$	Hidroxilo	Todas las moléculas
$R^{\cdot}$	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
$RO^{\cdot}$	R-oxilo	Ácidos grasos insaturados
$ROO^{\cdot}$	R-dioxilo (peroxilo)	Ácidos grasos insaturados
$ROOH$	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
$^1O_2$	Oxígeno singlete	Distintas moléculas
$NO^{\cdot}$	Nitroxilo	Distintas moléculas
$CCl_3^{\cdot}$	Triclorometilo	Oxígeno

La existencia del electrón desapareado, es lo que le confiere su altísima reactividad con gran cantidad de moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), ya que



tiende rápidamente a ganar o ceder un electrón para conseguir así una conformación estable. Esta misma rapidez hace que su vida media sea muy corta, lo cual confiere una enorme dificultad a su estudio.

En los sistemas biológicos, los radicales libres se están formando continuamente, algunos ejemplos de estos son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidróxilo ( $HO^{\cdot}$ ), siendo ambos radicales centrados en el oxígeno, el radical triilo ( $RS^{\cdot}$ ) (radical centrado en el azufre), el triclorometilo ( $CCl_3^{\cdot}$ ), radical centrado en el carbono y formado por metabolismo del  $CCl_4$  en el hígado, etc, (*Halliwell, B. et. al., 1992*). En la *tabla 2* se muestran algunos radicales libres y las moléculas sobre las que actúan predominantemente.

Siempre que un radical da un electrón a, toma un electrón de o simplemente se une a una molécula no radical, esta se transforma en radical (*Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., 1989; Sies, H., 1991*). Siendo una característica importante en las reacciones de radicales con no radicales, el hecho de que normalmente se comporten como reacciones en cadena, así un radical produce otro y este otro, etc.

Sólo cuando dos radicales se unen, desaparecen como tales radicales (*Halliwell, B. et. al., 1992*).

De entre la gran cantidad de especies químicas que se pueden considerar como radicales, por su mayor abundancia e importancia desde un punto de vista fisiológico y patológico, son los radicales centrados en el oxígeno los que más interés han despertado.

Los radicales centrados en el oxígeno, se agrupan dentro del término genérico de "especies reactivas del oxígeno" (ERO), haciéndose referencia con este término, a un conjunto de moléculas que incluyen no sólo a los radicales del oxígeno propiamente dichos, entre los que se encuentran el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $HO^{\cdot}$ , sino también a algunas moléculas, no radicales, derivadas del oxígeno, e involucradas directamente en la producción de radicales del oxígeno, como puedan ser el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el ácido hipocloroso (ClOH).

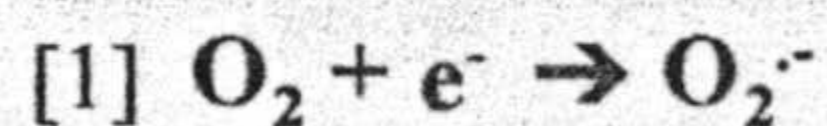
Como se ha comentado anteriormente, los radicales libres se forman continuamente en el organismo bien de forma accidental, como sucede en los casos de escape de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial o autoxidaciones (*Fridovich, I., 1989; Imlay, J.A. y Fridovich, I., 1991*), o bien de modo deliberado como puede ser en la activación de fagocitos y en menor grado en células diferenciadas tipo fibroblastos o linfocitos (*Murrell, G.A.C. et. al., 1990; Meier, B. et. al., 1990*).

Como consecuencia de esta formación continuada de radicales libres debe de existir en el organismo un adecuado sistema no sólo de defensa antioxidante sino también de reparación del daño oxidativo producido (*fridovich, I., 1989*).



### 3.1.- Radical superóxido

Se trata de un radical libre cargado, formado como consecuencia de una reducción monovalente o monoelectrónica del oxígeno molecular [1].



Es una especie menos reactiva que otros radicales como pueda ser el HO·, y aunque su participación en procesos citotóxicos ha sido observada en numerosos estudios (*Fridovich, I., 1796; McCord, J.M., 1979*), no parece ser una agente citotóxico que actúe directamente, sino que su principal efecto sería el de actuar como fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (*Cheeseman, K.H. y Slater, T.F., 1993*).

Son muy variados los sistemas enzimáticos y no enzimáticos en los que se produce este radical, así como otros radicales. Al parecer, la principal fuente de producción de anión superóxido se encuentra en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, ya que de un 5 a 10% del oxígeno consumido es parcialmente reducido por electrones provenientes de los transportadores de dicha cadena (*Borevis, A. y Chance, B., 1973*). Así, la ubisemiquinona aparentemente es la responsable de cerca del 75% de superóxido formado por esta vía (*Borevis, A. y Cadenas, E., 1975*) y la NADH deshidrogenasa la productora del resto (*Turrens, J.F. y Borevis, A., 1980*).

Entre otras fuentes nos encontramos, el escape de electrones del citocromo P<sub>450</sub> en el retículo endoplasmático hepático, la autooxidación de moléculas como hemoproteínas, hidroquinonas, catecolaminas, ascorbato, tioles, etc., o como productos durante los procesos de fagocitosis en la respuesta inflamatoria, o reacciones como las catalizadas por xantina oxidasa y aldehído oxidasa, etc., (*McCord, J.M., 1989*).

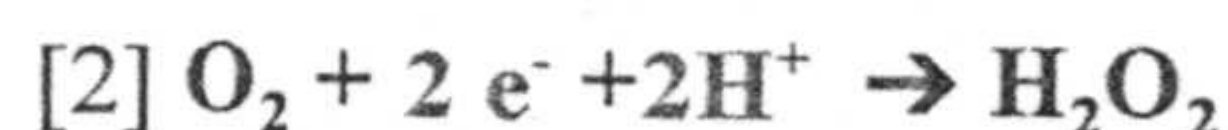
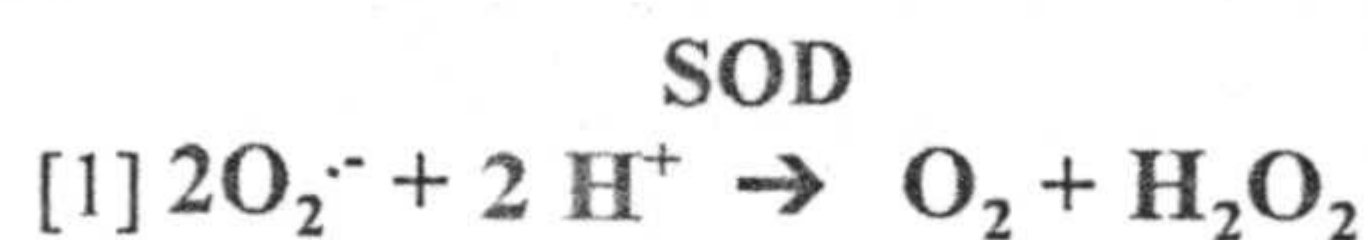
Entre sus actividades, se ha observado su función como vasoconstrictor en células del músculo liso (*Laurindo, F.R.M. et. al., 1991*).

A pH bajos el anión superóxido podría protonarse, transformándose en el radical perhidroxilo (HO<sub>2</sub>·), siendo esta forma protonada más reactiva y capaz de generar lipoperoxidación, "in vitro", al poder reaccionar directamente con ácidos grasos polinsaturados libres, aunque "in vivo" se ha demostrado que su tendencia es reaccionar con lipoperóxidos ya formados dando lugar a radicales peroxilo (*Bielski, B.H.J. et. al., 1983*). Sin embargo, a pH fisiológicos menos del 1% del superóxido se encuentra en su forma protonada (*Cheeseman, K.H. y Slater, T.F., 1993*).

### 3.2.- Peróxido de hidrógeno



Es un metabolito del oxígeno intracelular, formado por una dismutación del anión superóxido (catalizada por la superóxido dismutasa (SOD))[1], o bien directamente vía reducción bivalente del oxígeno[2].



El  $\text{H}_2\text{O}_2$  al igual que el anión superóxido, presenta un reactividad química limitada, pero su capacidad para atravesar membranas y el hecho de poder generar en presencia de iones metálicos de transición o del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), hace que se incluya dentro del término genérico de “especies reactivas del oxígeno”, a pesar de no ser en sí un radical libre ya que no presenta electrones desapareados.

En mitocondrias, en condiciones fisiológicas, se ha estimado una producción de 0.3 a 0.6  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min/g de proteína, pudiéndose incrementar dicha producción con un aumento de  $\text{PO}_2$  en el medio, lo que implica al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el efecto letal inducido por altas presiones parciales de este gas (*Chance, B. et. al., 1992*).

Se ha observado que pequeñas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producen lisis eritrocitaria, asimismo puede producir la oxidación directa de compuestos sulfidrilos, tales como residuos de metionina de diversas proteínas, e inducir indirectamente la peroxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares (*Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1984*). Igualmente, se ha mostrado la inducción de la producción del factor activador plaquetario por el endotelio en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Redl, H. et. al., 1993*).

En otros estudios se ha encontrado que altos niveles de peróxido de hidrógeno, pueden inactivar a la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa en células de mamífero, así como a la fructosa bifosfatasa y aconitasa en plantas (*Halliwell, B. et. al., 1992*).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tiene la capacidad de atravesar con facilidad las membranas biológicas, pudiendo causar o promover el daño oxidativo en macromoléculas distantes de su lugar de producción (*Chance, B. et. al., 1992*).

### 3.3.- Radical hidroxilo

Es el radical más reactivo entre las especies oxigénicas conocidas, capaz de reaccionar, de un modo directo, con prácticamente cualquier molécula biológica, con una constante de segundo orden cercana a  $10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ .

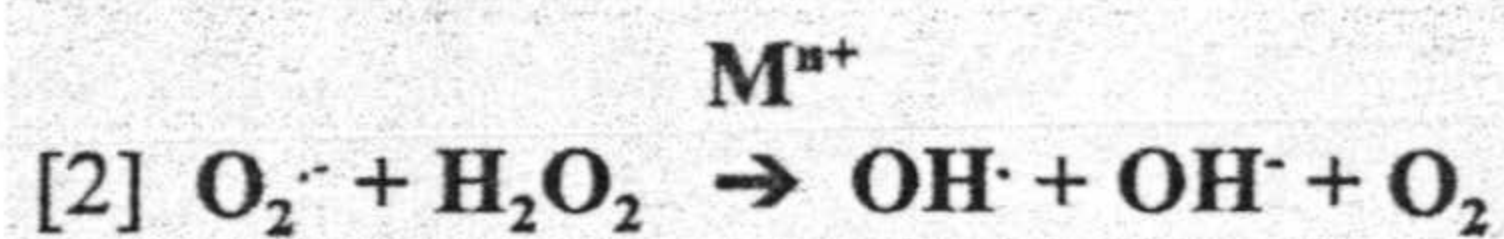


En su producción radical, en la mayoría de los casos, la citotoxicidad de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ , ya que como se ha comentado estas moléculas presenta una baja reactividad.

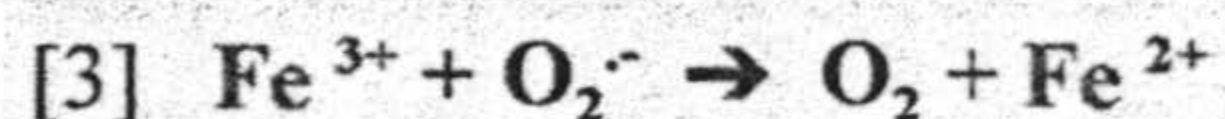
En organismos vivos, la principal fuente de producción de radical hidroxilo, parece ser la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente hierro ( $Fe^{2+}$ ) (Minotti, G. y Aust, S.D., 1987) y cobre ( $Cu^{2+}$ ) (Anuona, O.I. et al., 1991). Siendo en el caso del hierro a través de la denominada reacción de Fenton [1].



La reacción de Fenton presenta una química más compleja. La producción de hidroxilo puede estimularse por el anión superóxido, mediante la denominada reacción de Haber-Weiss o también denominada en algunos casos reacción de Fenton conducida por el  $O_2^{\cdot-}$  (Halliwell, B. et al., 1992).[2]



La reacción de Haber-Weiss, se podría entender como el resultado de la unión o colaboración de la reacción de Fenton [1] con la capacidad del anión superóxido para reducir metales iónicos de transición [3].



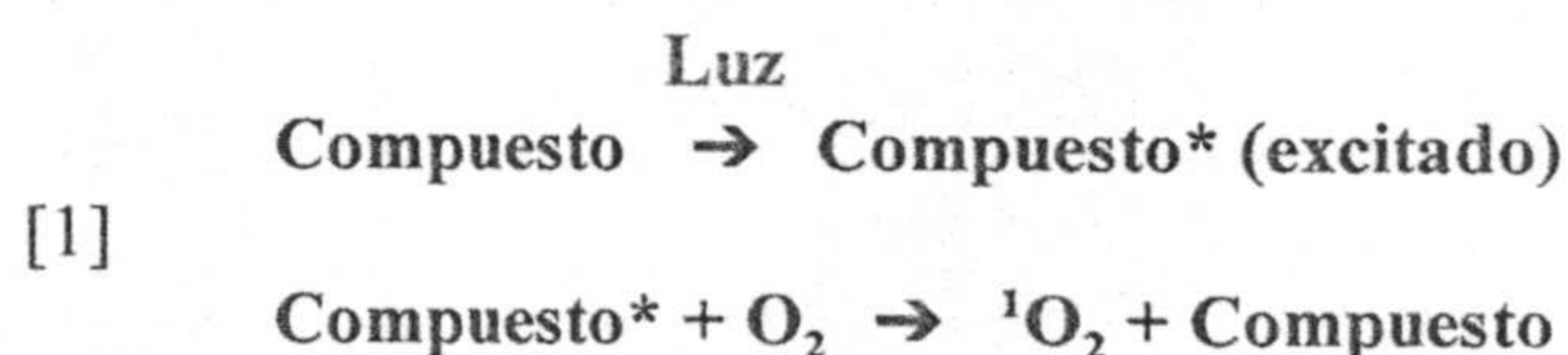
Hay otras vías de producción de radical hidroxilo en organismos vivos, entre los que se encuentra la fisión homolítica del agua provocada por excesiva exposición a radiaciones ionizantes (Von Sonntag, C., 1987) o bien la descomposición de peroxinitrilo, independiente de metales iónicos de transición, (Beckman, J.S. et al., 1990). En esta última vía también interviene el anión superóxido, ya que es el causante de la formación de radical peroxinitrilo al reaccionar con el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), especialmente en fagocitos y células endoteliales vasculares (Saran, M. et al., 1989).

### 3.4.- OXIGENO SINGLETE

No se trata de un radical en sí, pero junto al radical hidroxilo, es considerada como una de las principales especies oxigénicas capaces de reaccionar directamente con macromoléculas como puedan ser ácidos grasos (Sevanian, A y Hochstein, P. 1985; Halliwell, B. y Chirico, S., 1993).



Es producido por absorción de energía por una molécula de oxígeno, lo que causa una nueva disposición de los electrones como consecuencia del cambio de orientación de uno de sus espines. La vía más importante de producción en sistema biológicos se da cuando ciertos compuestos son iluminados en presencia de oxígeno, estos compuestos absorben la luz, entrando en un estado de alta excitación electrónica, y transfiriendo ese exceso de energía al oxígeno con lo que se convierte en oxígeno singlete (*Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*) [1].



Entre estos agentes fotosensibles, nos encontramos colorantes (p.ej. eosina), cierto tipo de drogas (p.ej. tetraciclinas) y una serie de sustancias encontrados en el cuerpo humano, como pueden porfirinas, riboflavinas y bilirrubina (*Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*). Así, por ejemplo, en pacientes con cierto tipo de profiria, se produce acumulación de porfirinas que pueden provocar daño en la piel, al interactuar la luz solar con las porfirinas para dar oxígeno singlete (*Krinsky, N.I., 1989*).

A pesar de la capacidad del oxígeno singlete para reaccionar con ácidos grasos, no se puede considerar como un inductor de la peroxidación lipídica, como pueda serlo el OH·, puesto que reacciona directamente con el ácido graso para dar peróxidos [2], sin que exista sustracción de hidrógeno, no dándose por lo tanto las reacciones en cadena (*Halliwell, B. Chirico, S. 1993; Frankel, E.N., 1984*).



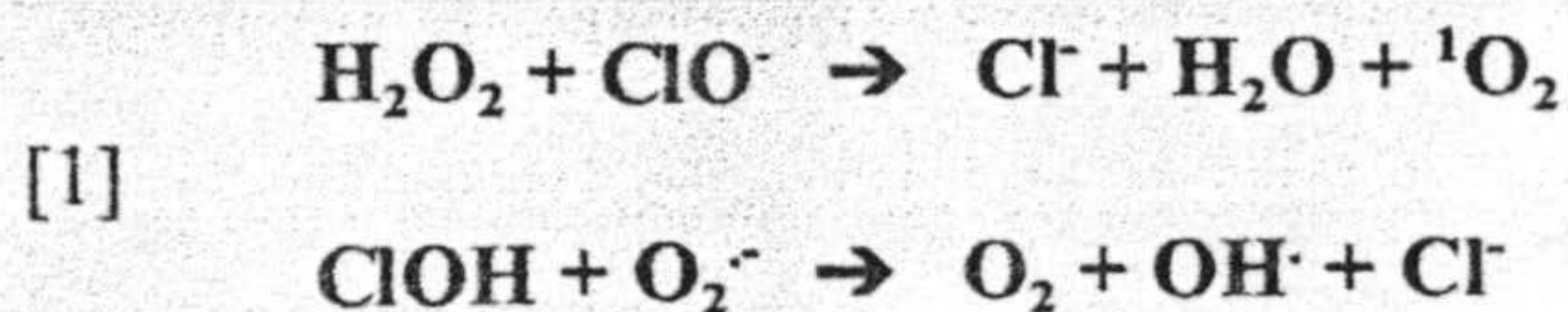
La reacción de peróxidos entre sí, pueden producir oxígeno singlete, siendo esta otra vía de producción, aunque menor, puesto que la probabilidad de colisión entre estos peróxidos es baja.

Otra vía de producción es la observada por Kanofsky y Sima (*Kanofsky, J.P. y Sima, P., 1991*), en la que la interacción del ozono con ciertas moléculas biológicas produce oxígeno singlete.

### 3.5.- Ácido hipocloroso

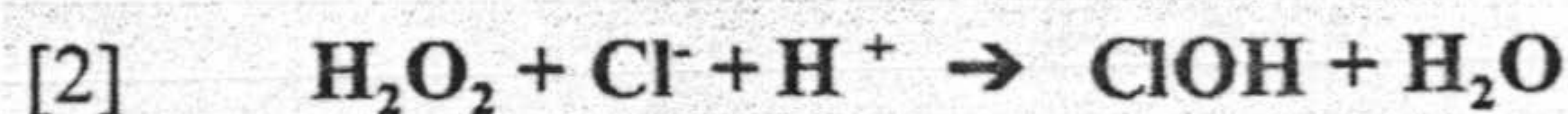


Al igual que el  $H_2O_2$  y el  $^1O_2$ , el ácido hipocloroso no se puede considerar un radical libre en sí, pero se incluye dentro del término ERO, por su capacidad para oxidar importantes moléculas biológicas así como producir e interactuar con otros radicales [1].



Puede atacar grupos sulfidrilo (-SH) de ciertos residuos aminados de proteínas como puede ser el caso de la  $\alpha$ -1 antiproteasa pulmonar.

Es formado por acción de la mieloperoxidasa sobre inones cloruro en presencia de  $H_2O_2$  [2], reacción que tiene lugar en la vacuolas de fagocíticas de los neutrófilos tras su fusión con las vesículas de lisosomas que contienen mieloperoxidasa (Flitter, W.D., 1993).



#### 4.- BALANCE Y ESTRES OXIDATIVO

Como se ha comentado previamente, los radicales libres se están formando continuamente en el organismo, presentando este un adecuado sistema de protección para eliminar y/o reparar el daño producido por estos radicales.

Sin embargo estas defensas antioxidantes no son efectivas al 100% (Halliwell, B. y Chirico, S., 1993), debido a que estas especies químicas son en muchos casos sintetizadas deliberadamente por el organismo, estando implicados en numerosos procesos metabólicos y cumpliendo por tanto una función biológica. Así, en estudios realizados con animales transgénicos se ha observado el potencial efecto deletéreo de un exceso de SOD en ciertos tejidos (Groner, Y, et al., 1990; Scott, M.D., et al., 1989).

Así, algunos enzimas utilizan radicales libres en sus centros activos, durante los

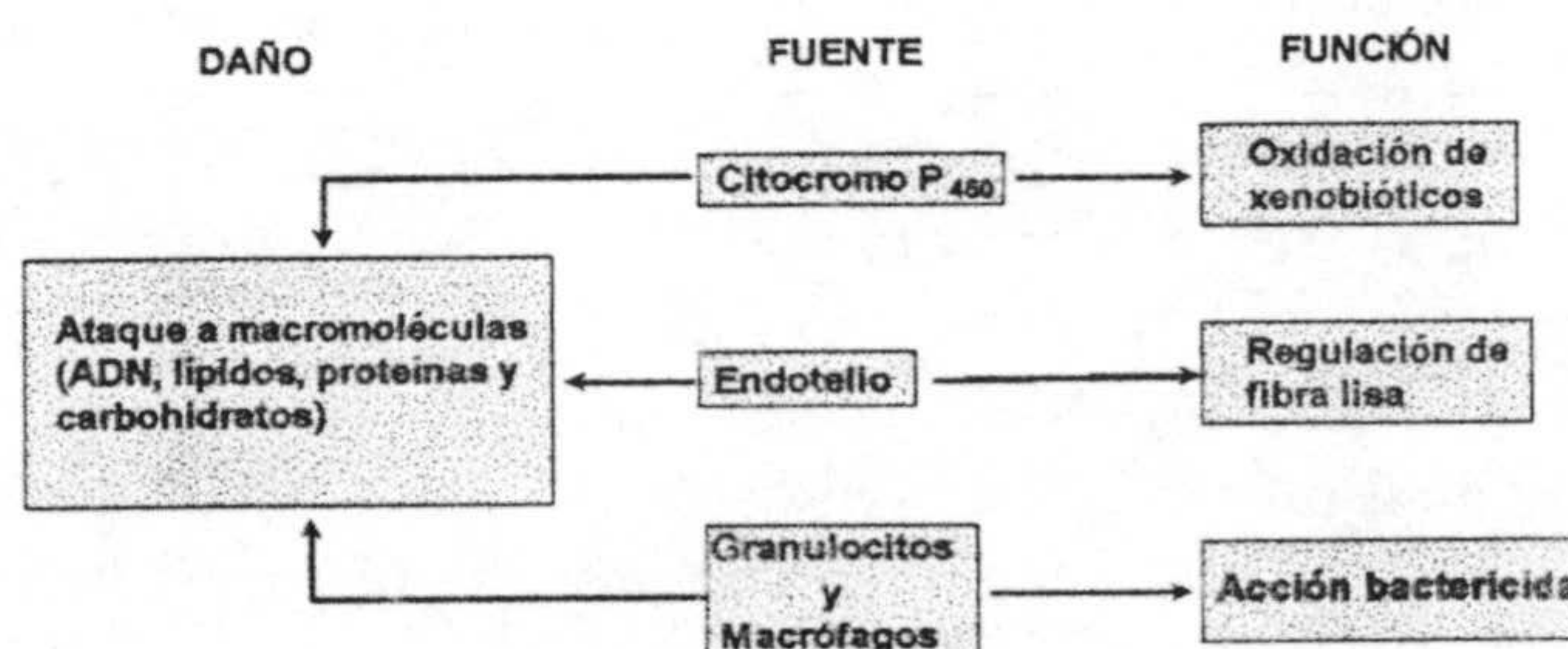


Figura 16.- Representación esquemática de la dualidad de funciones de algunos radicales libres.



procesos de catálisis, como por ejemplo en la ribonucleotido reductasa (Stubbe, J., 1990), pueden ser generados por fagocitos como parte de su papel bactericida (Babior B.M., 1978), o encontrarse involucrados en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, en procesos de detoxificación de xenobióticos, en procesos de maduración, como por ejemplo la maduración de reticulocito a eritrocito (Sevanian, A. y Hochstein, P. 1985), etc.

Por lo tanto es necesario que exista un tenue balance entre las propiedades fisiológicas de los radicales libres y sus propiedades dañinas, por ejemplo bajas concentraciones de hidroperóxidos lipídicos podrían activar las enzimas lipooxigenasa y ciclooxigenasa afectando así a la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos en vivo, mientras que altas concentraciones podrían inactivarlas (Halliwell, B. y Chirico, S., 1993). En la figura 16 se esquematiza esta dualidad de funciones.

Son los sistemas antioxidantes los encargados de mantener el equilibrio adecuado entre estas funciones, dando lugar a lo que se conoce como "balance oxidativo". Cuando este balance, bien por exceso de producción de radicales libres o por disminución de las defensas antioxidantes, se desequilibra hacia las propiedades dañinas de los radicales libres se produce el "estrés oxidativo", lo cual puede repercutir en un daño en el tejido directo o indirecto, siendo la importancia del daño dependiente de la duración y de la naturaleza del sistema estresado.

El estrés oxidativo, o más bien el exceso de RL, esta involucrado en mayor o menor grado en múltiples enfermedades, alguna de las cuales se pueden ver en la tabla 3. Manteniéndose hoy en día, en numerosos estudios, la ambigüedad desatada a mediados de los 80, acerca de si es el estrés oxidativo el causante del daño celular, o más bien el daño celular el causante del estrés oxidativo, por aumento de los radicales libres de forma secundaria, inclinándose esta ambigüedad, en la mayoría de las patologías en las que los RL actúan en mayor grado, hacia la primera suposición (Orrenius, S. et. al., 1989; Coghlan, J.G. et.al., 1991).

**Tabla 3.-** Ejemplo de las múltiples patologías en las que se observa la implicación, en mayor o menor grado, de radicales libres.

Infarto agudo de miocardio	Pulmón del ozono
Fibrinólisis	Pancreatitis
Angioplastia coronaria (ACTP)	Esofagitis
Cardioplejia	Artritis reumatoide
Transparte y preservación de órganos	Preeclampsia
Isquemia intestinal	Cáncer cervical
Isquemia cerebral	Degeneración alcohólica del hígado
Necrosis tubular aguda	Diabetes
Enteritis	Pancreatitis
Deficiencias inmunitarias	Síndrome de Down
Colagenosis	Síndrome de Batten
Arteriosclerosis	Aterosclerosis
Deficiencia de mieloperoxidasa	Cataratas
Enfermedad granulomatosa crónica	Tumores
Enfisema	Envejecimiento
Hiperreactividad bronquial	Schock, etc.



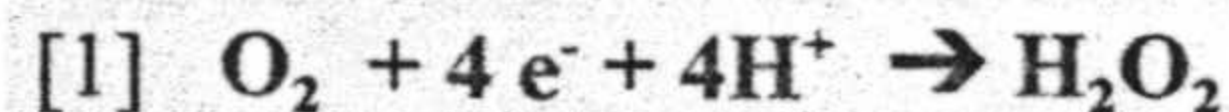
## 5.- FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES

Como se ha comentado previamente, en el organismo se están produciendo de un modo continuado radicales libres, ya sea de manera deliberada, cumpliendo funciones fisiológicas, o accidental, siendo algunas de las vías más importantes de producción las que se comentarán a continuación.

### 5.1.- Cadena de transporte de electrones mitocondrial

Bajo condiciones fisiológicas normales, esta puede ser considerada como la mayor fuente de producción de radicales libres, de forma accidental.

Del total del oxígeno que llega a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el 90 al 95% del mismo es metabolizado a agua mediante la vía de la reducción tetravalente, sin formación de intermediarios tóxicos [1].



Sin embargo, el 5-10% del oxígeno consumido sufre una reducción monovalente, por electrones procedentes de los transportadores de la cadena y que escapan al control de la misma (*Borevis, A. y Chance, B., 1973*), dando lugar a la formación de anión superóxido, el cual rápidamente se dismuta, por acción de la superóxido dismutasa a peróxido de hidrógeno (*Boveris, A. y Cadena, E., 1975*), con la consecuente formación posterior de radical hidróxilo mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss.

Se han observado dos sitios principales en la formación de estos radicales libres, uno es el paso de ubiquinona hacia citocromo C<sub>1</sub>, donde el intermediario semiubiquinona es capaz de reducir oxígeno a anión superóxido, siendo este paso el responsable de prácticamente el 75% de anión formado (*Borevis, A. y Cadenas, E., 1975*); el otro paso es a nivel de la NADH deshidrogenasa (*Turrens, J.F. y Borevis, A., 1990*).

Se ha observado que la producción de superóxido por esta vía aumenta bajo dos diferentes condiciones físicas, principalmente, una de estas vías, es cuando la concentración o consumo de oxígeno se encuentra incrementado, como puede ser por ejemplo en el caso de actividad física (*Litarru, G.P., 1994*), en la que el consumo de oxígeno puede aumentar de 10 a 40 veces con respecto al estado de reposo (*Aw, T.Y. et. al., 1986*).

La otra vía, se da cuando la cadena de transporte de electrones está completamente reducida, como puede suceder durante el periodo de isquemia y posterior reperfusión (*McCord, J.M., 1989; Flitter, W.D., 1993*).



## 5.2.- Xantina oxidasa

Se trata de un enzima encargado de catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y de esta a ácido úrico, acoplando a dicha oxidación una reducción monovalente del oxígeno molecular, con la consiguiente formación de anión superóxido.

En condiciones fisiológicas normales se encuentra en su forma nativa, xantina deshidrogenasa, la cual utiliza  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones, no teniendo lugar por lo tanto la reducción de oxígeno molecular ni la formación de  $\text{O}_2^-$ . En tejidos sanos, el porcentaje del enzima en su forma oxidada es muy bajo, habiéndose observado en algunos estudios un valor aproximado de un 10%, aunque este porcentaje podría ser debido a intermediarios proteolíticos, creados durante la degradación normal de la proteína en la célula (Roy, R.S. y McCord, J.M., 1983).

Sin embargo, durante alteraciones de los mecanismos homeostáticos celulares, como puede suceder en isquemia (figura 17) o hipoxia, tiene lugar un gran aumento en la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, aumento consecuente de un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y activación de determinadas proteasas. La proporción y mecanismo de transformación de xantina deshidrogenasa a oxidasa podría ser específica del tejido en la que tiene lugar (Roy, R.S. y McCord, J.M., 1983), pudiendo ser convertida por una proteólisis limitada (Batelli, M.G. et al., 1972), o por oxidación de grupos tioles (DellaCorte, E. y Stirpe, F., 1972).

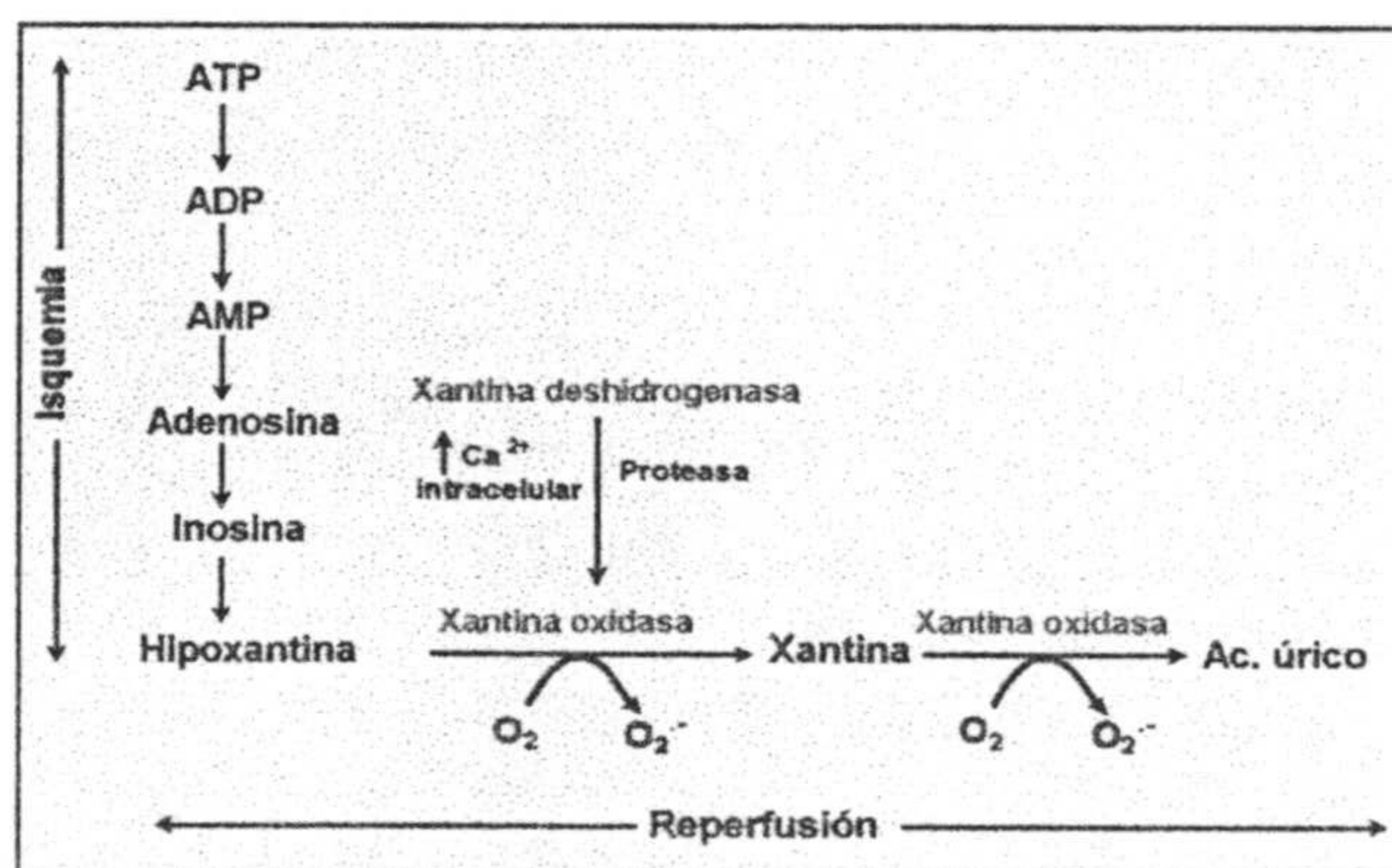


Figura 17.- Esquema del mecanismo de generación de anión superóxido por xantina oxidasa durante isquemia/reperfusión.

En numerosos estudios se ha observado la participación de esta fuente de producción de radicales en distintas patologías o daños fisiológicos, como por ejemplo en la isquemia/reperfusión (Friedl, H.P. et al., 1990; Granger, D.N. et al., 1981), síndrome de distres respiratorio del adulto (Grun, C.M. et al., 1987), shock hemorrágico o traumático (Redl, H. et al., 1993), quemaduras (Friedl, H.P. et al., 1989), etc., observándose en todas ellas degradación del pool de nucleótidos de adenina, degradándose el ATP a hipoxantina y xantina, aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, aumento de ácido úrico consecuente de la actividad de la xantina oxidasa, etc. El ejercicio físico intenso presenta similitud con las observaciones anteriores, por lo que en esta situación también podría actuar esta vía de



producción de radicales libres (*Sjodin, B. et al., 1990*).

Igualmente, se ha observado que la adición de alopurinol inhibe la xantina oxidasa, lo cual representa una protección frente al daño producido por isquemia/reperfusión en distintas especies animales (*Parks, D.A. et al., 1982; McCord, J.M., et al., 1985; Werns, S.W. et al., 1986; Johnson, W.D. et al., 1991*).

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre este enzima, sigue existiendo controversia acerca de su papel real en ciertas patologías, controversia basada en las marcadas diferencias, tanto en la distribución como en la concentración de la misma en los distintos modelos animales usados, observándose por ejemplo una gran actividad de xantina oxidasa cardiaca en ratas, perros y ratones mientras que en conejos, cerdos y humanos se ha mostrado una muy pequeña actividad de la misma (*de Jong, J.W. et al., 1990*).

### 5.3.- Metabolismo del ácido araquidónico

La síntesis de prostaglandinas y leucotrienos a partir de ácido araquidónico se puede convertir en una fuente de radicales libres, encontrándose en el endotelio vascular una gran fuente de radicales generados por esta vía.

Sobre el ácido araquidónico ejercen su acción catalítica dos enzimas, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa. Vía ciclooxigenasa, el araquidónico sufre una primera oxigenación que da lugar a la prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ), la cual por acción de la prostaglandina  $H_2$  sintetasa da lugar a la prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ), etapa en la que se puede generar  $O_2^-$ , si hay disponibilidad de NADH o NADHP (*Kukreja, R.C. et al., 1986*). La vía lipooxigenasa parece estar involucrada en la síntesis de  $^1O_2$  (*Duran, N. et al., 1984*).

Este metabolismo se encuentra estimulado en situaciones fisiológicas en las que tiene lugar un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, como es en el caso de la isquemia/reperfusión, en la que se estimula la actividad de fosfolipasas calcio dependientes, entre las que se encuentra la fosfolipasa  $A_2$ , responsable de la liberación de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, incluyendo el ácido araquidónico (*Bersohn, M.M. et al., 1982*).

Igualmente, hay que destacar la formación de peróxidos intermediarios en ambas vías, los cuales junto a los radicales libres pueden incrementar el daño en situaciones patológicas, como en el caso de isquemia/reperfusión (*Flitter, W.D., 1993*).

### 5.4.- Formación de radicales por células fagocíticas

Las células fagocíticas generan radicales libres, entre los que se encuentra el  $O_2^-$ , como parte de su papel antibactericida y aunque estos radicales son formados en el entorno de la membrana plasmática que engloba a la bacteria, es inevitable que escape de algunos



de estos radicales.

Neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares, poseen en su membrana el sistema flavoproteico citocromo b254-NADPH oxidasa, sistema productor de radicales libres. Así, durante la actividad fagocitaria se produce un incremento en el consumo de oxígeno, en el denominado “estallido respiratorio”, siendo entre un 70 y 90% de este oxígeno utilizado en la producción de  $O_2^-$  (Babior, B.M., 1984), vía producción de NADPH a partir de hexosas monofosfato [1] (Winrow, V.R. et. al., 1993).



A partir de este  $O_2^-$ , se produce una cascada de radicales libres, ya que rápidamente dismuta a  $H_2O_2$ , el cual es sustrato de la mieloperoxidasa para la formación de HClO.

La presencia de iones metálicos de transición puede dar lugar la formación de radical hidroxilo. Estos iones metálicos, aunque normalmente no están libres en los sistemas biológicos, en determinadas situaciones fisiológicas como es el caso de fagocitosis e inflamación, el bajo pH puede ayudar a la liberación de los mismos (Winrow, V.R. et. al., 1993).

Otro de los radicales libres formados durante los procesos de fagocitosis es el óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), este radical muestra un importante efecto citotóxico en la defensa contra células tumorales, hongos parásitos, protozoos, helmintos y micobacterias (Moncada, S. et. al., 1991). Su reacción con el  $O_2^-$  da lugar a peroxinitrilos los cuales por descomposición dan lugar a  $OH\cdot$ .

El  $NO\cdot$  es generado en un proceso NADP-dependiente, proviniendo de la arginina, actuando en la regulación de la presión sanguínea al ser un potente vasodilatador (Kolb, H. y Klob-Bachofen, V., 1992).

La peligrosidad del daño a membranas por escape de radicales libres durante los procesos de fagocitosis, se ve aumentada por un aumento durante este proceso del metabolismo del araquidónico, cuya liberación de las membranas se incrementa durante la fagocitosis.

### 5.5.- Metabolismo de las catecolaminas

Se ha observado que, en situaciones de alteraciones fisiológicas, como es el caso de isquemia/reperfusión, la autooxidación de las catecolaminas puede causar daño miocárdial, mediante la generación de radicales libres (Singal, P.K. et. al., 1983).



Durante la isquemia/reperfusión y otras situaciones aumenta la cantidad de catecolaminas circulantes, en parte debido a la liberación miocardiaca, mostrándose que durante su degradación espontánea y mediada por monoaminooxidasas o catecol-o-metil transferasa son capaces de ofertar electrones para la formación de radicales libres, siendo sólo una fuente de radicales libres en estados de patología, ya que su proporción de oxidación a pH fisiológico es muy bajo (*Jewett, S.L. et. al., 1989*).

### 5.6.- Citocromo P450

El sistema NADPH/NADPH citocromo P450 reductasa/citocromo P450, es un sistema capaz de reducir ciertos compuestos, en una reducción monovalente, generando radicales libres. Así, en la eliminación de xenobióticos y compuestos químicos extraños, mediante la actuación del citocromo P450 tiene lugar la formación de radicales libres.

En numerosos estudios se ha observado la participación de este sistema en la generación de radicales, así, en células tipo II alveolares la reducción del paraquat (potente herbicida) por este sistema da lugar a la formación del radical catión paraquat, que reacciona rápidamente con el oxígeno molecular, formando  $O_2^-$  (*Ryrfeldt, A. et. al., 1993*).

Un estudio pionero que implica directamente a los radicales libres en el daño al hígado es el de la eliminación del tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ), a nivel del citocromo P450 microsomal hepático, con la formación del radical triclorometilo ( $CCl_3\cdot$ ), radical que reacciona con el oxígeno, dando lugar al radical triclorometiloperoxilo ( $CCl_3O_2\cdot$ ) (*Slater, T.F., 1984*). También en hígado, la eliminación de etanol o alcohol por el citocromo P450 da lugar a la formación de radical hidroxietilo ( $CH_3-C\cdot HOH$ ) (*Poli, G., 1993*).

Otros estudios de participación de este sistema en el daño por radicales libres muestran un aumento en su actividad en células tumorales, así como en líneas celulares con resistencia a adriamicina y mitomicina niveles reducidos de este sistema (*Singh, S.V. et. al., 1990; Hoban, P.R. et. al., 1990*).

### 5.7.- Contaminantes atmosféricos

La inhalación del aire que nos rodea nos expone a múltiples radicales y polucionantes, entre los que se encuentran del dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) ( radical libre generado en la combustión de carburantes fósiles), el ozono (poderoso agente oxidante), dióxido de azufre ( $SO_2$ ), etc.

El humo del tabaco es una peligrosísima fuente de radicales, conteniendo altas concentraciones de óxidos del nitrógeno, especialmente óxido nítrico, radicales peroxilo y radicales centrados en el carbono entre otros. Además, en los pulmones de los fumadores se producen grandes acumulaciones de hierro, lo cual potencia el daño de estos radicales.



Exposiciones a estos gases en altas concentraciones producen características lesiones del tracto respiratorio, potenciando este daño la acumulación de macrófagos en estas regiones (*Ryrfeldt, A. et. al., 1993*).

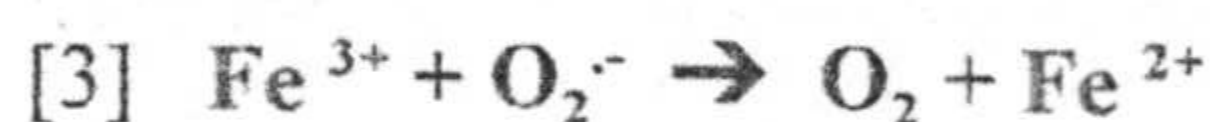
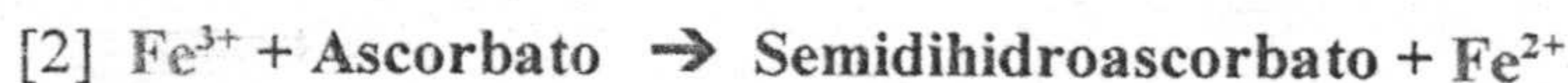
### 5.8.- Metales iónicos en la producción de radicales libres

Radicales libres como  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  han sido mostrados como radicales con baja reactividad directa sobre macromoléculas, centrándose su mayor peligrosidad en la producción de otros radicales mucho más reactivos, como el  $OH^{\cdot}$ , para lo cual requieren la participación de iones metálicos de transición.

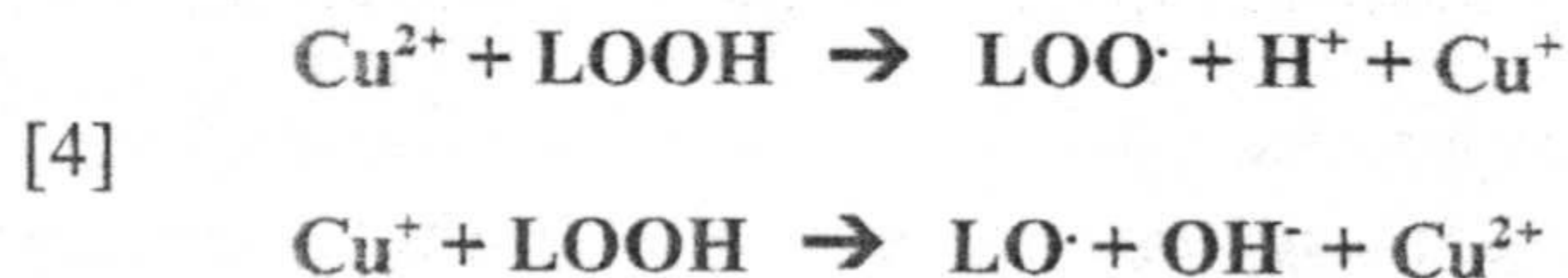
Entre estos metales, el hierro ha despertado gran interés, por su abundancia y por su participación en la generación de  $OH^{\cdot}$ , mediante la clásica reacción de Fenton [1].



La reacción de Fenton se ve estimulada por agentes reductores, lo cuales son capaces de oxidar el ión ferrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso, ya que el  $\text{Fe}^{3+}$  no es nada reactivo con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entre estos agentes reductores se encuentra el ascorbato [2] o el anión superóxido [3].



Otro ión metálico que despierta un interés creciente es el cobre, ya que es frecuentemente utilizado "in vitro" para estimular la lipoperoxidación de lipoproteínas de baja densidad, aunque necesita la presencia de trazas de peróxidos lipídicos [4] (*Estrebauer, H. et. al., 1989*).



Se ha observado que el cobre "in vitro" estimula más la formación de especies reactivas del oxígeno que puedan causar daño a bases del ADN, que el hierro (*Guyton, K.Z. y Kensler, T.W., 1993*).



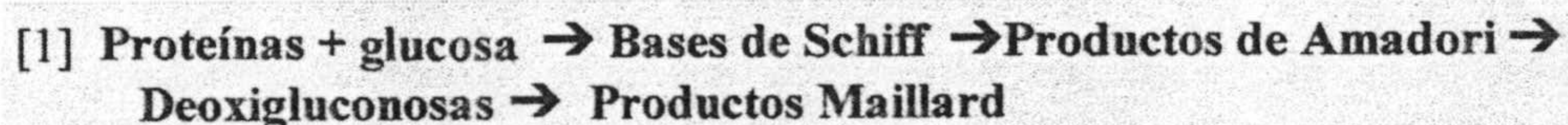
En vista a las actuaciones de los iones metálicos en la formación de radicales libres, un sistema preventivo de la oxidación podría ser la utilización de compuestos que atraparan estos iones, dificultando su encuentro con los radicales libres. De hecho el organismo tiene un perfecto sistema de transporte y almacenamiento de estos iones mediante proteínas especiales, sin embargo el estrés oxidativo puede liberar iones metálicos de las estructuras que los contiene, por ejemplo, el  $O_2^-$  puede movilizar hierro desde la ferritina y el  $H_2O_2$  puede atacar grupos hemo, liberando el hierro (Saran, M. y Bors, W., 1990).

## 6.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES E HIDRATOS DE CARBONO

Las interacciones entre radicales libres y azúcares o hidratos de carbono, son interesantes tanto desde un punto de vista bioquímico como desde un punto de vista clínico, al conocerse su implicación en la producción de la patología secundaria en la diabetes (Wolff, S.P., 1993), en procesos debidos al humo del tabaco y en general en patologías en las que el ácido hialurónico existe en concentraciones anormales, por ejemplo, enfermedades reumatoides o cataratas, siendo la duración de la interacción determinante de los efectos consecuentes.

Se ha observado que azúcares como glucosa, manitol y desoxiazúcares reaccionan rápidamente con el  $OH^\cdot$ . Un ejemplo de reacción con el  $OH^\cdot$ , se encuentra en el ácido hialurónico, un glucosaminoglucano constituido por repetidas unidades de ácido glucorónico, un disacárido, y N-acetil-glucosamina, el cual es el encargado de mantener la viscosidad del fluido o líquido sinovial. Cuando este compuesto es expuesto a sistemas productores de radicales libres, se fragmenta (Greenwald, R.A. y Moy, W.W., 1980), desestabilizándose el tejido conectivo y produciéndose pérdida de la viscosidad del líquido sinovial. Esta fragmentación es atribuible al  $OH^\cdot$ , pero siempre en presencia de metales de transición (Grootveld, M. C. et. al., 1991).

Por otra parte, los monosacáridos, en condiciones fisiológicas son capaces de reducir el oxígeno molecular, autooxidándose y formando cetoaldehidos e intermediarios oxidantes, como  $O_2^-$ , autooxidación catalizada por metales de transición (Wolff, S.P. et al., 1984; Wolff, S.P. y Dean, R.T., 1987). Paralelamente la glucosa es capaz de unirse a proteínas en los grupos amino terminal, iniciando la glicación de las proteínas (Grandhee, S.K. et.al., 1991), según la reacción [1]:



Estos productos son extremadamente reactivos y capaces de alterar la estructura espacial de las proteínas (aparición de puentes, entrecruzamientos, acortamientos, cambios conformacionales, etc.), observándose que tanto la autooxidación como la producción de



estos productos están íntimamente relacionados a través de la interacción con metales de transición; igualmente, existen evidencias de que los radicales libres e intermediarios oxidantes ( $H_2O_2$ ) de la autooxidación son causa del daño estructural a proteínas expuestas a glucosa in vitro (Jiang, Z.Y. et. al., 1990).

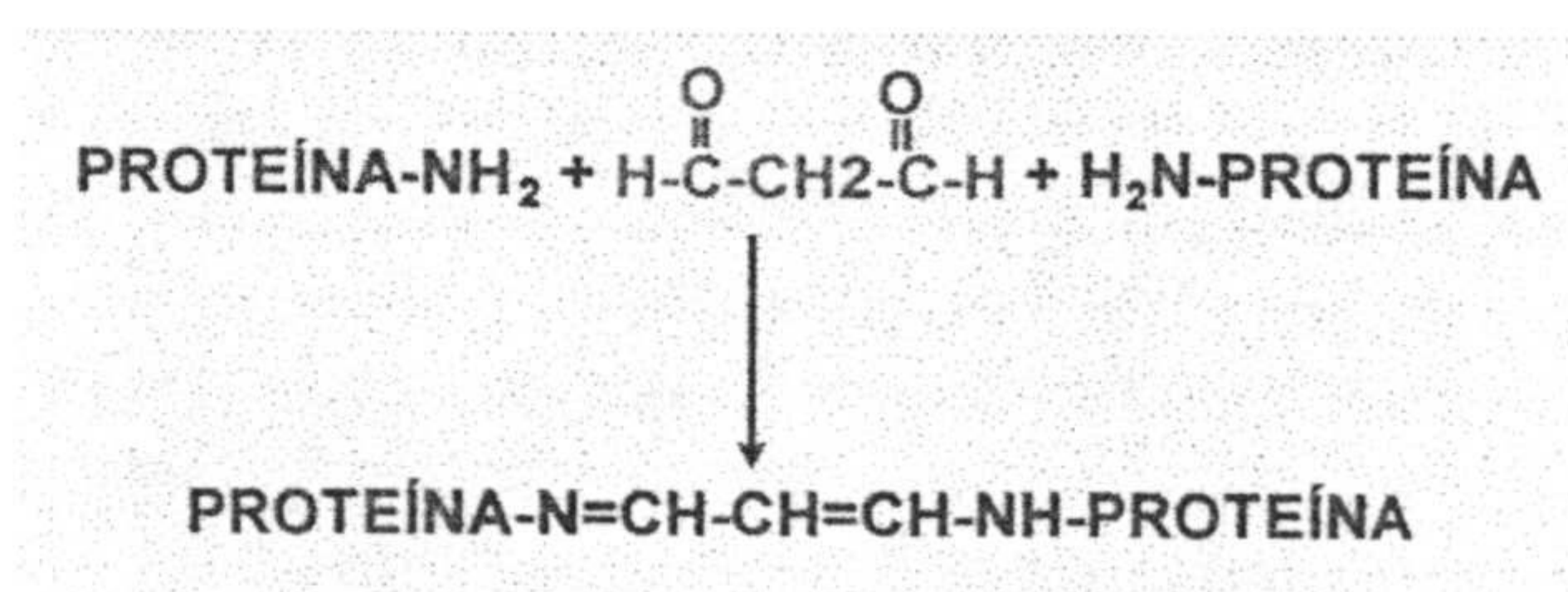
## 7.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES Y PROTEÍNAS

Los radicales libres son capaces de atacar residuos aminoacídicos de proteínas, dando lugar a entrecruzamientos catalíticos, cambios en la conformación y pérdida de funciones (Winrow, V.R. et. al., 1993). Este daño es rápidamente eliminado por proteasas, evitando la acumulación de proteínas dañadas, y existiendo un fino balance entre daño y reparación.

El ataque de radicales libres a proteínas podría ser clasificado en dos categorías (Litarru, G.P., 1994):

- Ataques difusos, dando lugar a modificaciones generalizadas.
- Ataques selectivos, dando lugar a modificaciones en sitios específicos.

En las primeras modificaciones se producen ataques en diferentes regiones de la estructura proteica, dando lugar a alteraciones estructurales, agregaciones intra e intercadenaarias, fragmentación y/o desnaturalización. Este daño es comunmente observado como consecuencia de exposiciones a radiaciones ionizantes, ozono o como consecuencia secundaria de cadenas de propagación de radicales libres, entre las que destaca la lipoperoxidación y especialmente la producción de entrecruzamiento catalítico por parte del malondialdehído (figura 18) (Gillery, P., et. al., 1991).



**Figura 18** .- Entrecruzamiento de proteínas mediado por MDA.

Las modificaciones específicas, son extremadamente selectivas, siendo los aminoácidos lisina, histidina, arginina y prolina los más frecuentemente atacados (Litarru, G.P., 1994). En este tipo de daño oxidativo juega un papel importante los metales de transición, siendo los enzimas que contienen metales de transición los que aparentemente presentan mayor riesgo de sufrirlas (Stadtman, E. R., 1990). Estas modificaciones son normalmente llamadas "oxidaciones catalizadas por metales" y casi siempre implican



cambios covalentes, siendo estas proteínas las más susceptibles a la acción proteolítica de proteasas intracelulares específicas .

Estos ataques oxidativos a proteínas, dan lugar, entre otras consecuencias, a alteraciones a la permeabilidad de las células de diferentes tejidos, así, en células miocárdicas se ha observado una disminución en la permeabilidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  e incremento en la salida de  $\text{K}^+$ , como consecuencia de ataques oxidativos a ATPasas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Ramón, J.R., 1993). También se han observado ataques a ATPasas dependientes de calcio, dando lugar a alteraciones de la homeostasis del calcio intracelular, pudiéndose producir daños a nivel del citoesqueleto y roturas de ADN y ARN (Orrenius, S. et al., 1989).

Numerosos estudios han mostrado el daño producido por sistemas generadores de radicales libres a gran variedad de proteínas celulares y plasmáticas, por ejemplo en procesos inflamatorios se ha observado el daño a inmoglobulina G (IgG), dando lugar a IgG alteradas (Lunec, J. et al., 1986; Griffiths, H.R. y Lunec, J., 1989), y a la antiproteasa alfa-1-antitripsina como consecuencia de la oxidación de residuos de metionina (Carp, H., et al., 1982).

## 8.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES Y DNA

Las alteraciones del ADN, como molécula portadora del material genético, merece una atención muy especial, siendo importante conocer las consecuencias de la interacción del ADN con el estrés oxidativo. Así, en patologías en las que el estrés oxidativo es elevado, tales como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, esclerodermia, cáncer, hipertensión arterial, envejecimiento, etc., se observa un mayor nivel de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas, pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de determinados cromosomas, como es el caso del X en ciertos casos de envejecimiento en mujeres (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996).

Las alteraciones de ADN que más frecuentemente se observan en situaciones de estrés oxidativo son incremento en los niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimídicas.

El papel del oxígeno en la mutagenicidad del ADN en bacterias fue demostrada hace casi treinta años (Fenn, W.O. et al., 1957). Se ha demostrado la interacción de los radicales libres del oxígeno con el ADN, bien directamente mediante el radical hidroxilo o indirectamente como es el caso del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ , en presencia de metales de transición y como consecuencia de la formación de radical hidroxilo, siendo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  altamente peligroso por su capacidad para atravesar membranas y producir  $\text{OH}^\cdot$  (Nassi-Caló, L. et al., 1989; Breimer, L.H., 1990).



Otro daño indirecto sobre el ADN por parte de los radicales libres, es el producido mediante endonucleasas calcio dependientes, cuya actividad se incrementa como consecuencia de un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996).

Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas, destaca la formación del 8-hidroxiguanina, con un alto efecto mutagénico y responsable de que durante la replicación se empareje con la adenina en vez de la citosina. Respecto a las bases pirimídicas, se encuentran los glicoles de timina y citosina y los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a fragmentación ya que las bases afectadas no pueden emparejarse correctamente (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996). Igualmente, pequeñas proporciones de  $\text{OH}\cdot$  pueden interactuar con los azúcares componentes del ADN, dando lugar a la formación de radicales de azúcares (Dizdaroglu, M., 1993).

El NO, también puede dar lugar a reacciones de desaminación y despurinización, mediante el  $\text{N}_2\text{O}_3$  formado en la interacción de NO, oxígeno y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . También se ha observado entrecruzamientos producidos por la interacción del MDA con los grupos aminos del ADN (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996).

En los procesos de excitación fotoquímica, como sucede en la exposición a radiaciones UV, el oxígeno molecular da lugar a la formación de anión superóxido y conjuntamente a la formación de oxígeno singlete, interactuando este último directamente con el ADN, aumentando el daño directo que produce el radical hidroxilo. En la figura 19 se esquematiza el daño al ADN por varias vías en los procesos de excitación fotoquímica.

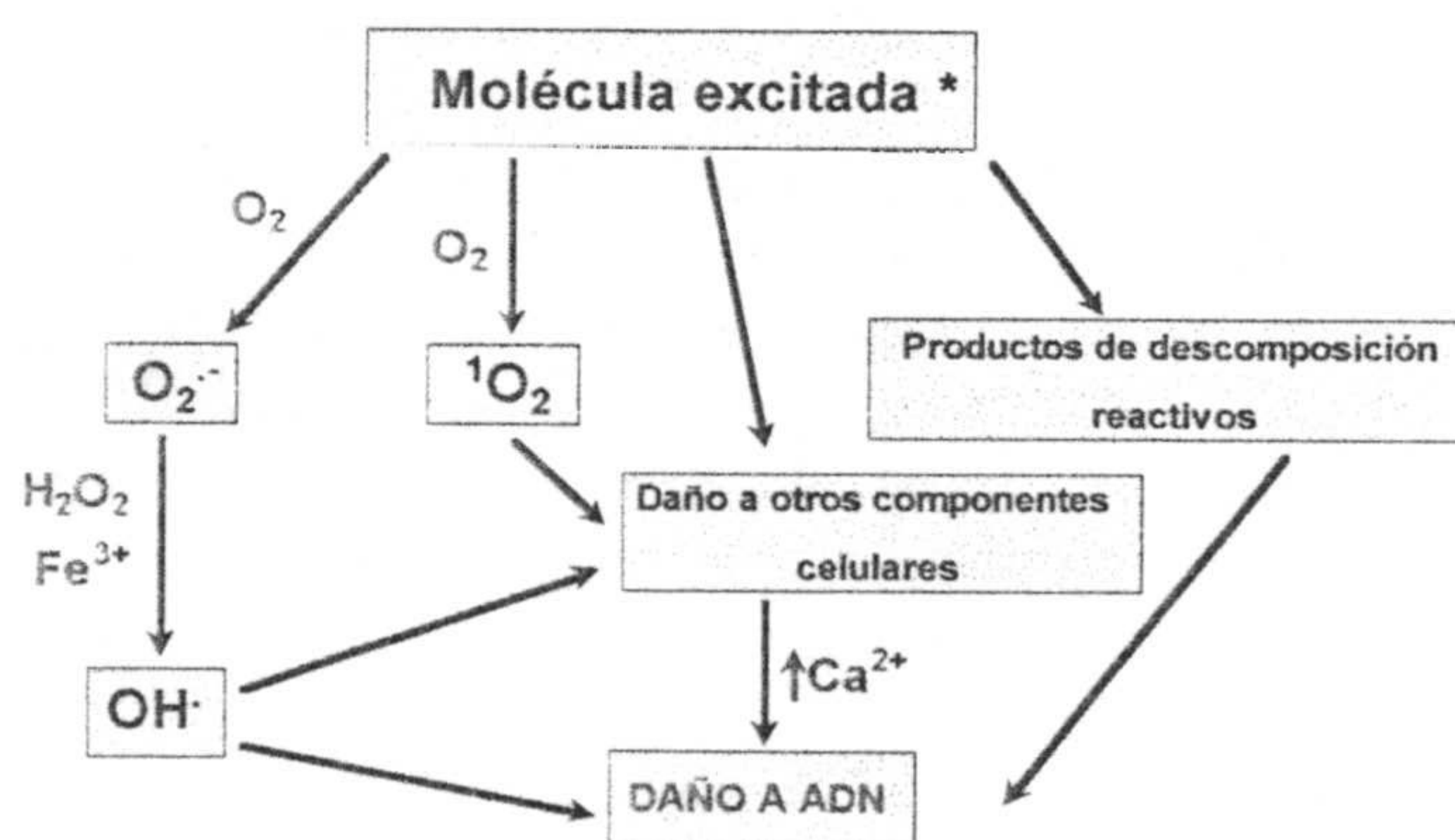


Figura 19.- Esquema del daño oxidativo al ADN en irradiación.

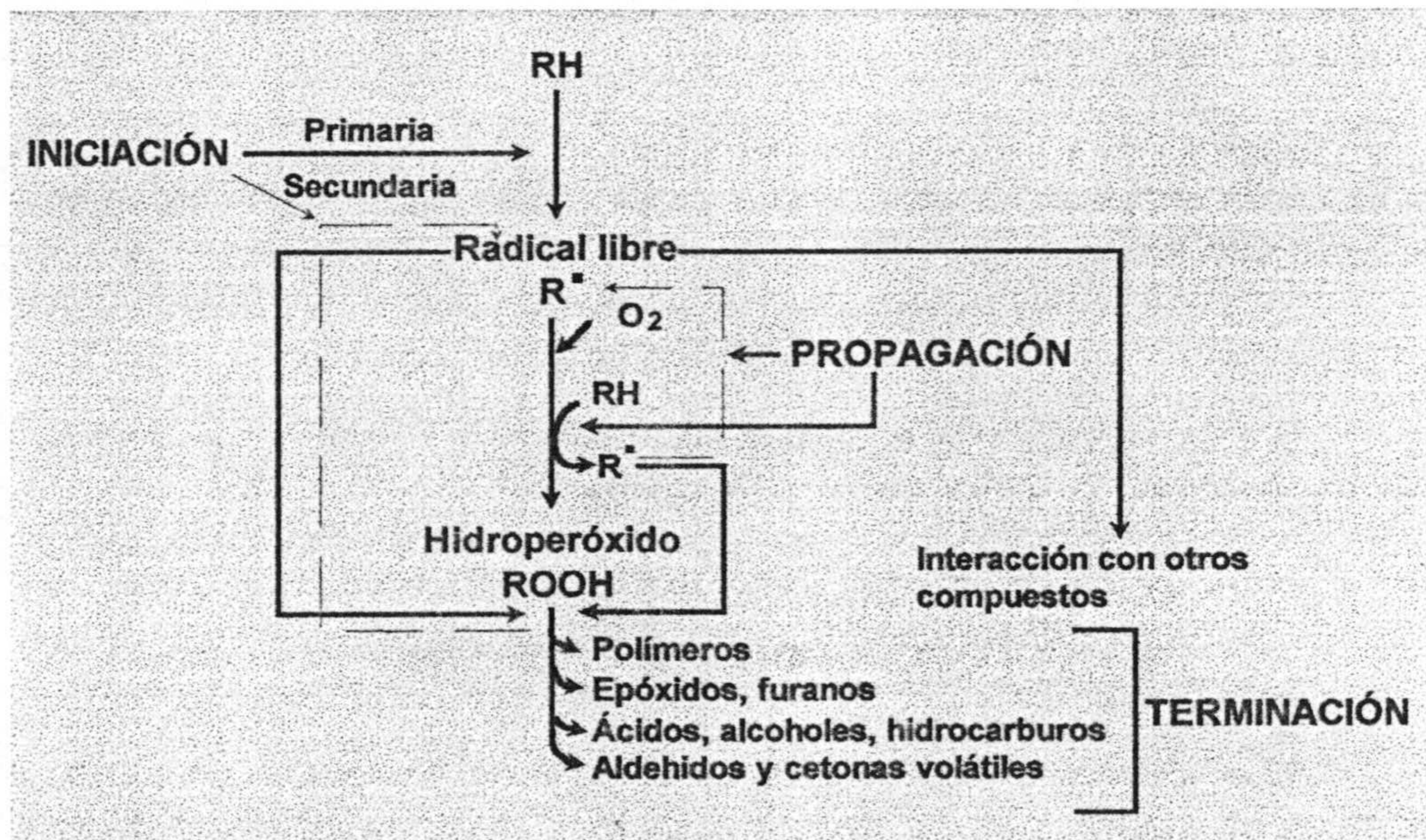
El ADN mitocondrial, por su localización en el entorno de la cadena de transporte de electrones, principal fuente de especies reactivas del oxígeno, presenta una mayor tasa de fragmentaciones y mutaciones por modificaciones oxidativas de sus bases, por ejemplo la presencia de 8-hidroxi-2desoxiguanosina es 16 veces superior a la encontrada para el ADN nuclear (Ritcher, C. et. al., 1988), siendo esta mayor tasa de mutación muy importante en los procesos de envejecimiento.



## 9.- RADICALES LIBRES Y LÍPIDOS

La peroxidación lipídica puede entenderse como una destrucción oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados en un autocatalítico e incontrolable proceso, que da lugar a la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos y una serie de productos secundarios, incluyendo un amplio rango de compuestos aldehídos.

El término autoxidación es utilizado no con la intención de indicar la no intervención de agentes externos, sino para diferenciar este proceso de la oxidación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados llevada a cabo directamente por enzimas tales como ciclooxigenasa o lipooxigenasa. En este término no aparece el colesterol, pero por que el sustrato preferido son los ácidos grasos poliinsaturados (*Cheeseman, K.H., 1993*).



*Figura 20.-* Reacciones de oxidación de los lípidos.

Los ácidos grasos más comúnmente encontrados en células animales, el linoleico (C18:2), araquidónico (C20:4) y docosahexaenoico (C22:6), son potenciales dianas para sufrir el ataque de radicales, lo que indica una mayor susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces, por lo que ácidos grasos monoinsaturados, por ejemplo el ácido linoleico (C18:1), son relativamente resistentes a este ataque y los saturados solo son oxidables bajo condiciones extremas (*Cheeseman, K.H., 1993*).



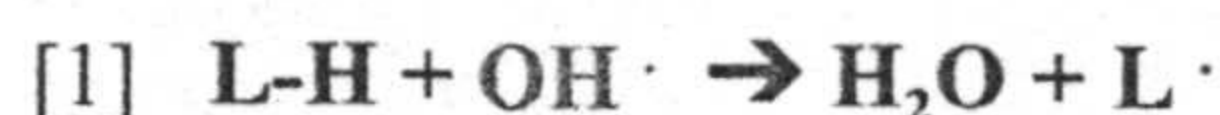
Clasicamente se consideran tres fases en la peroxidación lipídica: iniciación, propagación y terminación (*figura 20*).

### 9.1.- Iniciación

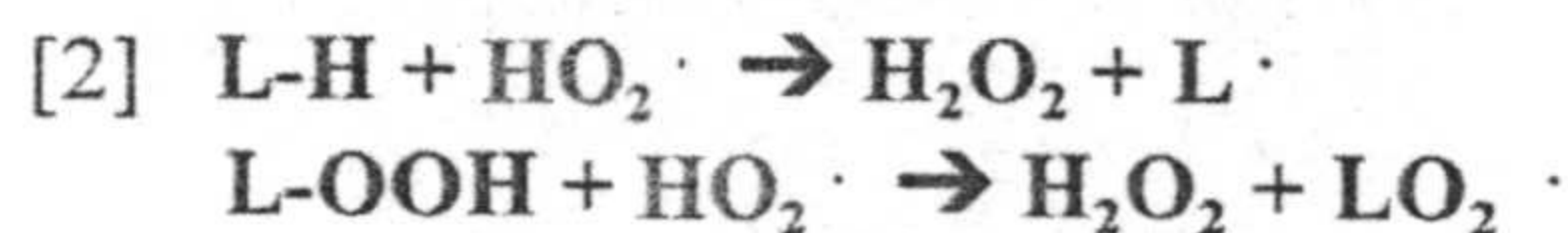
Las reacciones de iniciación dan lugar a la formación de radicales libres a partir de ácidos grasos no saturados y/o de peróxidos lipídicos o hidroperóxidos.

La peroxidación lipídica comienza con el ataque de especies radicales con suficiente poder oxidativo como para abstraer un átomo de hidrógeno de un metilo de la cadena del ácido graso, dando lugar a un radical lipídico centrado en el carbono (*Halliwell, B. y Chirico, S., 1993; Cheeseman, K.H., 1993*). La presencia de dobles enlaces cercanos en el ácido graso facilita la pérdida del hidrógeno, porque el radical formado se estabiliza deslocalizando el electrón desapareado en los dobles enlaces adyacentes (*Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*).

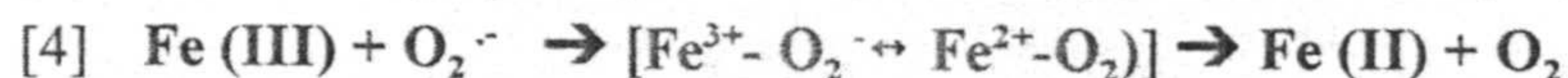
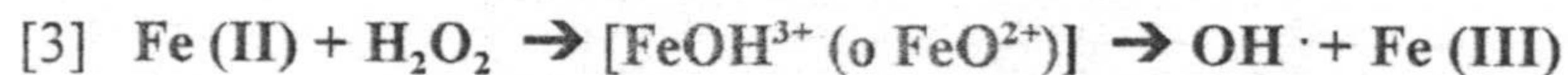
Dentro de las especies reactivas del oxígeno que podrían iniciar la lipoperoxidación se encuentra el radical hidroxilo, el cual puede atacar todas las moléculas biológicas incluyendo los lípidos de membrana [1].



El anion superóxido no es capaz de iniciar por si solo la peroxidación lipídica, pero su forma protonada ( $\text{HO}_2 \cdot$ ) si que lo es [2] (*Bielski, B.H.J. et. al., 1983*).



Los complejos hierro son considerados como verdaderos iniciadores de la peroxidación lipídica, ya que la mayoría de los estudios involucran a metales iónicos de transición, observándose una tendencia a favor de las especies ferrilo [3] y perferrilo [4], aunque se piensa que es en definitiva un complejo  $\text{Fe}^{2+} - \text{Fe}^{3+} - \text{O}_2$  el iniciador de la lipoperoxidación (*Shaich, K.M., 1992; Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*).



Para que tenga lugar esta iniciación es requerida la presencia de dobles enlaces, siendo el lugar donde se produce la abstracción el metilo que presenta un doble enlace en el carbono adyacente, por ejemplo el carbono en posición 11 del ácido linoleico.



El producto de esta abstracción es un radical lipídico centrado en el carbono ( $L\cdot$ ), el cual inmediatamente se reagrupa en una estructura de dienos conjugados. Estos radicales centrados en el carbono rápidamente reaccionan con el oxígeno dando lugar a la formación del radical lipídico peroxilo ( $LOO\cdot$ ). Estos radicales son capaces de reaccionar con otros ácidos grasos y comenzar una nueva cadena de oxidación y la formación de hidroperóxidos lipídicos ( $LOOH$ ) (*Cheeseman, K.H., 1993*). Los hidroperóxidos lipídicos formados son múltiples por la gran variedad de formas isoméricas que pueden formarse de un mismo ácido graso, así por ejemplo, para el ácido linoleico se pueden formar 2 isómeros posicionales diferentes, para el araquidónico 6 isómeros diferentes, en definitiva el número de isómeros va a depender del número de dobles enlaces ( $n$ ), siendo iguales a  $2n-2$  (*Sterbauer, H., 1993*).

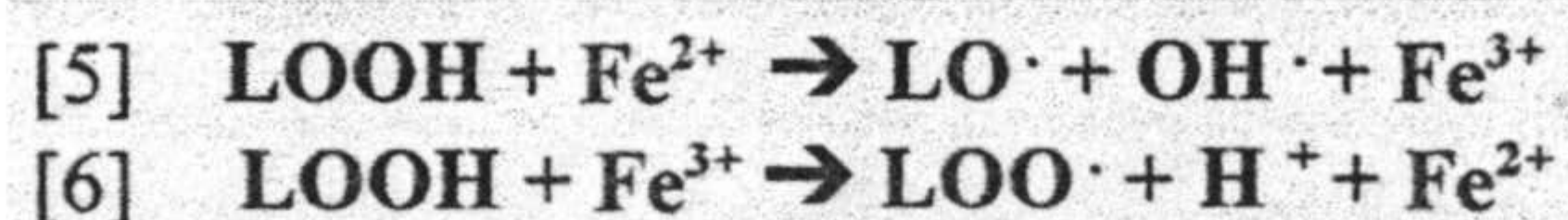
Los hidroperóxidos lipídicos son generalmente considerados como productos primarios de la peroxidación lipídica (*Corongiu, F.P. et al., 1986*).

## 9.2.- Propagación

La iniciación de la peroxidación lipídica por un radical lipídico es conocida como propagación, aunque también se suele denominar como iniciación secundaria. Se caracteriza por un acúmulo de peróxidos lipídicos (*Cheeseman, K.H., 1993*).

La longitud de la cadena de propagación depende de múltiples factores, entre los que se encuentran, la proporción lípido:proteína existente en la membrana (a mayor cantidad de proteínas, mayor probabilidad de reacción de un radical con ellas), la composición de ácidos grasos, la concentración de oxígeno y la presencia de antioxidantes entre otros (*Halliwell, B. y Chirico, S., 1993*). Siendo muy variados los productos que se pueden formar en esta etapa como consecuencia de los diferentes isómeros que pueden formarse (*Porter, N.A., 1990*).

La peroxidación lipídica se puede ver como una cadena de reacciones autocatalíticas con el suficiente potencial como para consumir todos los pufas existentes en el sistema iniciado.



Los peróxidos lipídicos son muy inestables en presencia de metales de transición como hierro o cobre, sales ferrosas reaccionan rápidamente con hidroperóxidos lipídicos [5], generando radicales alcoxilo lipídicos y sales ferricas las cuales pueden generar radicales peroxilo [6].



La presencia de iones metálicos es casi imprescindible para romper los hidroperóxidos lipídicos, con generación de radicales libres que inicien nuevas cadenas de lipoperoxidación, de hecho, en estudios que pretenden determinar la certeza de la lipoperoxidación iniciada por complejos de hierro, se observa que es extremadamente difícil diferenciar entre la genuína iniciación por complejos de hierro de las reacciones de propagación dependientes de la presencia de hidroperóxidos lipídicos preformados (*Cheeseman, K.H., 1993*).

Las sales ferrosas son más activas en estimular la lipoperoxidación que las sales férricas, son más solubles y reaccionan rápidamente con peróxidos generando gran cantidad de radicales alcoxilo reactivos, mientras que las sales férricas generan menos radicales peroxilo. Por esta razón en presencia de agentes reductores se incrementa la proporción de lipoperoxidación al mantener al hierro en su forma ferrosa, por ejemplo el ascorbato (*Slater, T.F. y Cheeseman, K.H., 1987*).

La protección con agentes queladores de metales libres, no es tampoco eficaz en todos los casos, siendo importante la relación o proporción queladores:metales, por ejemplo la clásica quelación con EDTA, la cual durante algún tiempo se consideraba como inhibidora de las reacciones dependientes de hierro, puede dar lugar a la formación de un complejo de hierro que promueve la peroxidación lipídica si se usa una apropiada proporción metal:quelador (*Minotti, G. y Aust, S.D., 1992*). Las hemoproteínas también son capaces de iniciar la descomposición de hidroperóxidos lipídicos hacia radicales libres, así la hemoglobina, metanoglobina, citocromo P-450 y otros citocromos son capaces de iniciarla, mientras que la transferrina y la lactoferrina no lo son y la ferritina sólo cuando está saturada con hierro (*Gutteridge, J.M.C. et. al., 1981*).

La ruptura de los hidroperóxidos lipídicos es importante por dos razones:

- a) Por la generación de radicales que propagan la peroxidación lipídica.
- b) Por generar fragmentos o productos no radicales como son aldehídos, muchos de los cuales presentan actividad biológica.

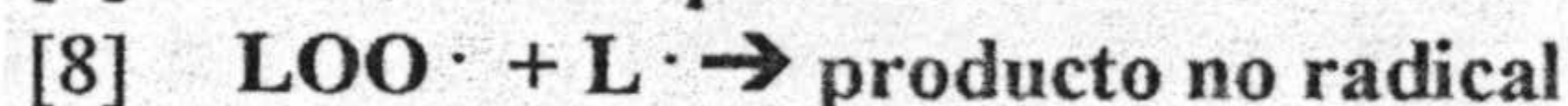
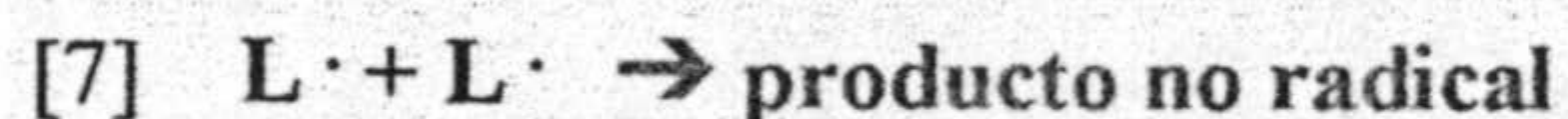
La identidad del producto depende de varios factores, entre los que se encuentran el propio ácido graso del cual parte, de la posición del grupo hidroperóxido dentro del pufo y en que lado del grupo hidroperóxido se produce la escisión o rotura (*Cheeseman, K.H., 1993*).

### **9.3.- Reacciones de terminación**

Las reacciones de terminación se dan mediante interacciones radical-radical, las cuales ocurren si las condiciones son favorables. Estas interacciones tienen el efecto de



terminar las cadenas de peroxidación gracias a la formación de productos no radicales [7-8]



Obviamente las reacciones radical-radical, requieren la presencia, en relativamente alta concentración, de los reactantes.

También la interacción de dos radicales peroxilo podría producir oxígeno singlete, la cual es una especie reactiva (*Cheeseman, K.H., 1993*).

#### 9.4.- Daño consecuente de la lipoperoxidación

La lipoperoxidación es un fuerte proceso destructivo en seres vivos. Puede atacar directamente a las células por ataque a estructuras de la membrana o indirectamente por liberación de productos reactivos (*Cheeseman, K.H., 1993*).

##### 9.4.1.- Daño directo a membranas

Un factor crítico en las membranas biológicas es su fluidez, la cual está determinada en gran parte por la incorporación de grasas a los fosfolípidos de la bicapa. Por lo que no es de sorprender que la lipoperoxidación afecte a las propiedades biofísicas de la membrana, ya que la diana preferente son las moléculas que las determinan.

La lipoperoxidación produce descenso de fluidez de membrana, cambios en las propiedades de las fases de las membranas y disminución de su resistencia eléctrica. Por otra parte, el entrecruzamiento catalítico causa restricción de la movilidad de las proteínas de membrana (*Richter, C., 1987*).

Todos estos ataques pueden dar lugar a que la membrana altere su función principal, es decir, actuar como barrera. La peroxidación lipídica es en sí, algo más que la simple producción de puntuales poros en la membrana, da lugar a una pérdida de la homeostasis iónica, lo cual es un importante tipo de descompartimentación, destruyendo el orden que imparte la membrana al metabolismo celular. Por ejemplo, el calcio se encuentra en concentración submicromolar en citosol y milimolar fuera, alteraciones en la homeostasis del este metal, llevada a cabo por la membrana, incrementan el calcio citosólico, lo cual conlleva activación de un gran número de enzimas y el calcio pasa de ser un poderoso controlador metabólico bajo condiciones normales a un inductor de letales procesos cuando se pierde el control (*Orrenius, S. et. al., 1989*).

Puede resultar en la inactivación de bombas responsables del mantenimiento homeostático iónico. Disminución de la actividad de enzimas asociados con membranas



incluidas mitocondrias y aparato de golgi, por ejemplo, glucosa-6-fosfato y citocromo p-450 (Poli, G. et. al., 1981).

Hay enzimas más resistentes como es el caso de la NADPH:citocromo P-450-reductasa quizás por ser periférica. Otras veces hay estimulación de enzimas como puede ser el caso de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, convirtiéndose en un mecanismo de defensa ya que esta enzima tiene preferencia por los fosfolípidos de membrana oxidados como sustratos, y los ácidos grasos peroxidados son rápidamente liberados de los fosfolípidos con la consecuente formación de lisofosfolípidos, los cuales son rápidamente reciclados. Un incremento en la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, resulta en una acumulación de fosfolípidos en la membrana y si su reciclamiento no tiene lugar rápidamente, la presencia de estos lisofosfolípidos puede alterar la estructura de la membrana y dar como resultado final lisis celular (Ursini, F. et. al., 1991).

#### 9.4.2.- Efectos indirectos de la lipoperoxidación

Estos efectos se deben principalmente a los productos carbonilos de la lipoperoxidación, debido a que son biológicamente activos y pueden difundir fuera del sitio de producción (tabla 4). No todos son liberados, algunos de estos aldehidos pueden quedar unidos al fosfolípido y volver a atacar (Cheeseman, K.H., 1993).

El número de productos es muy variado por la gran variedad de fosfolípidos, formas isoméricas y productos que se pueden obtener.

Los productos típicos encontrados en extractos de muestras biológicas oxidadas,

Tabla 4.- Algunos de los productos secundarios de la peroxidación lipídica.

n-Alcanales	2-Alquenes	4-Hidroxi-alquenes	Otros
Propanal	Acroleína	4-Hidroxi-nonenal	Malondialdehído
Butanal	Pentenal	4-Hidroxi-heptenal	2,4-Heptadienal
Pentanal	Hexenal	4-Hidroxi-2,5-hexenal	2,4-Decadienal
Hexanal	Octenal	4,5-Dihidroxi-decenal	5-Hidroxi-octenal
Nonanal	Nonenal		Butanona

incluyen n-alcanales de 3 a 12 átomos de carbono, 2-alquenes de 4 a 9 átomos de carbono de longitud, 2,4-dicadienales, 4-hidroxi-alquenes y otros compuestos carbonilo de varios tipos incluido MDA. Otros se deben a reacciones secundarias, lo cual complica su estudio (Cheeseman, K.H., 1993).

Los 4-hidroxi-alquenes, son los más interesantes desde un punto de vista bioquímico, los insaturados 2-alquenes son más reactivos que los n-alcanales pero menos



representativos. Los 4-hidroxicualquenos y en particular el HNE (4-hidroxicinonal) porque se produce en relativa gran cantidad y es muy reactivo.

El HNE es producto de la oxidación de ácido araquidónico (*Esterbauer, H. et al., 1990*). Los hidroxicualquenos son altamente electrofílicos y pueden reaccionar con biomoléculas electrofílicas, así el HNE puede reaccionar con proteínas que presenten grupos tiol a pH fisiológico relativamente rápido, la interacción HNE-GSH tiene un doble significado:

- a) Como una vía de detoxificación de HNE.
- b) Deplección de GSH, lo que podría incrementar el estrés en la célula, al disminuir el sustrato de la GPX.

A menor proporción HNE puede reaccionar con grupos aminos, por lo que un amplio rango de enzimas han mostrado ser inhibidas por HNE, la mayoría con grupos tioles necesarios para su actividad (*Rossi, M.A. et al., 1990*).

El ataque por este compuesto al grupo amino de residuos lisina de la apoproteína de LDL oxidadas hace que no sea reconocida por su receptor normal, y sí por el receptor de los macrófagos, desarrollándose una de las primeras etapas en el proceso de la aterosclerosis.

Los hidroxicualquenos han demostrado ser mutagénicos, capaces de reaccionar con deoxiguanosina en solución. Pueden inhibir las enzimas reparadoras de DNA. Se le ha observado una actividad quimiotáctica, pudiendo amplificar la reacción inflamatoria (*Cheeseman, K.H., 1993*).

Otro producto secundario es el malondialdehído (MDA), formado durante las últimas etapas de la ruptura de endoperóxidos, durante la reestructuración intramolecular de la estructura de los ácidos grasos, reagrupación necesaria para la estabilización de los radicales libres formados en la cadena alifática del ácido graso (*Valenzuela, A., 1991*).

Este producto puede ser metabolizado a nivel celular, por ejemplo por la aldéhido deshidrogenasa hepática y/o excretado. Está involucrado en el daño a la célula y en la formación de los pigmentos de lipofucsina durante el envejecimiento, donde se encuentra condensado con los grupos aminos libres de proteínas formando derivados fluorescentes debido a estructuras tipo base de Schiff (*Valenzuela, A., 1991*).

Hay evidencias de la reacción del MDA con algunos aminoácidos y con el DNA y el RNA, presentando propiedades mutagénicas y actuando como carcinógeno químico.



### 9.5.- Lipoperoxidación en patologías

“Un aumento en la concentración de los productos finales de la peroxidación lipídica es la más clara evidencia del involucramiento de los radicales libres en enfermedades humanas” (Halliwell, B. y Chirico, S., 1993).

“La peroxidación lipídica ha sido implicada en los efectos tóxicos de múltiples productos químicos, así como en múltiples daños a tejidos y en procesos de diversas enfermedades” (Sevanian, A. y Hochstein, P., 1985).

Estas dos frases nos dan una idea de la importancia que tiene el estudio de este proceso y de sus múltiples implicaciones en patologías. Sin embargo, se plantea, al igual que sucedía con el estrés oxidativo, la duda acerca de si la peroxidación lipídica es una causa o un efecto (Halliwell, B. y Chirico, S., 1993).

Hay estudios que indican que el daño del estrés oxidativo es raramente mediado por la aceleración de la peroxidación lipídica de las membranas celulares, es decir la secuencia de reacciones no es frecuentemente, estrés oxidativo → peroxidación lipídica → daño celular, sino más bien la secuencia, estrés oxidativo → daño celular → incremento secundario de la peroxidación lipídica en células dañadas (Sevanian, A. y Hochstein, P., 1985; Halliwell, B. y Chirico, S., 1993). Así para algunos autores es más bien un elemento tardío que una causa de la muerte celular (Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., 1984).

Sin embargo, la peroxidación lipídica representa una contribución muy significativa al desarrollo de la aterosclerosis, o hacia las secuelas del traumatismo o daño isquémico en cerebro o en la médula espinal (Esterbauer, H. et al., 1989; Hall, E.D. y Braughler, J.M., 1989).

Otros autores optan por un papel pasivo y activo de la lipoperoxidación en la toxicidad inducida por radicales libres (Sevanian, A. y Hochstein, P., 1985).

Se ha observado su papel en la hepatotoxicidad de un gran rango de compuestos tóxicos y carcinogénicos como el tetraclorhidrato de carbono, bromotriclorometano, 1,2-dibromoetano, cloroformo, paracetamol, adriamicina, óxidos de nitrógeno, ozono, etanol, etc.. Así como su implicación en la patogénesis de numerosas enfermedades y condiciones clínicas, como diabetes, síndrome del estrés respiratorio del adulto, condiciones inflamatorias crónicas, cáncer, aterosclerosis, envejecimiento, etc. (Cheeseman, K.H., 1993; Winrow, V.R. et al., 1993; Guyton, K.Z. y Kenslar, T.W., 1993).



## 10.- DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los organismos aerobicos son protegidos contra el daño oxidativo introducido por especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres, mediante un completo sistema de defensa.

Este sistema esta compuesto por multiples antioxidantes con diferentes funciones, algunos de ellos son enzimas, otros son compuestos pequeños, pudiendo ser hidrofílicos o lipofílicos. Entre sus funciones se encuentran la supresión de generación de radicales libres, atrapamientos de estos y reparación del daño producido.

Dentro de este sistema existen interrelaciones

entre sus componentes, ocurriendo a veces el hecho de que si uno de ellos es eliminado o disminuida su actividad o concentración puede dañar a otros mediante sus substratos, así por ejemplo, el  $O_2^-$  (sustrato de la superóxido dismutasa) inhibe a la catalasa, siendo el  $H_2O_2$  (sustrato de la catalasa) una posible vía de inactivación de la Cu-Zn superóxido dismutasa (McCord, J., 1989).

En la figura 20 se esquematiza este sistema de defensa. Es tan importante conocer el sistema de defensa del organismo frente al daño oxidativo, como los mecanismos de actuación de los radicales libres.

A continuación veremos algunos de estos antioxidantes.

### 10.1.- Catalasa

Fue una de las primeras enzimas antioxidantes descritas, hallándose en prácticamente todas las células de animales y plantas (Deisseroth, A. y Douce, A.L., 1970). Es una enzima intracelular ferriporfirínica, localizada principalmente en peroxisomas (80%) y citosol (20%) (Nieto, N., 1993).



Figura 20.- Esquema representativo de las líneas de defensa frente al estrés oxidativo.

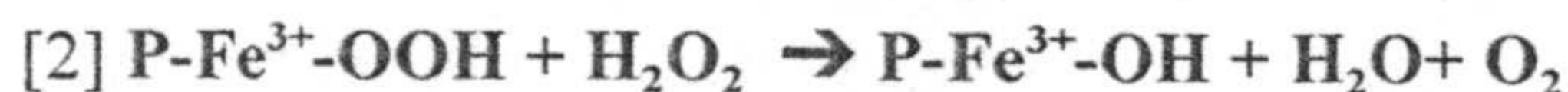
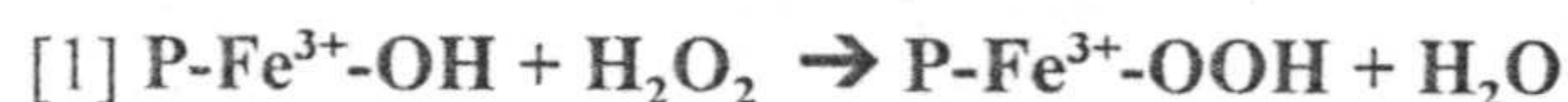


Se halla constituida por 4 subunidades, cada una con un grupo hemo enlazado en su centro activo.

Su función es doble, ya que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [1] (actividad catalítica) y la oxidación de donadores de hidrógeno, como pueden ser metanol, etanol, fenoles, etc., con la consumición de 1 mol de peróxidos [2] (actividad peroxídica) (*Aebi, H., 1984*). Dentro de los peróxidos consumidos se encuentra el  $H_2O_2$  y los hidroperóxidos alquilo, siendo en este caso la reactividad de la catalasa inversa a la longitud de la cadena.



El que predomine la reacción [1] o la reacción [2], va a depender de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de  $H_2O_2$  en el sistema (*Aebi, H., 1984*). Se ha observado que la descomposición de  $H_2O_2$  es muy rápida, mientras que las reacciones peroxidativas son relativamente lentas (*Aebi, H., 1984*). En ambas reacciones, lo primero en formarse es un complejo primario entre el  $H_2O_2$  o el hidroperóxido y el hierro del grupo prostético [1], dando lugar a la formación del complejo activo I, complejo que reacciona con otra molécula de hidroperóxido para dar finalmente agua y oxígeno [2] (*Deisseroth, A y Dounce, A.L., 1970*).



La catalasa presenta una afinidad por el  $H_2O_2$  baja, es decir necesita altas concentraciones del mismo para poder trabajar rápido (*Roberfroid, M. y Buc-Calderón, P., 1995*), aunque se ha observado una rápida inactivación de la actividad de la catalasa a concentraciones de  $H_2O_2$  superiores a 0.1M, por formación de los complejos inactivos II y III (*Aebi, H., 1984*); igualmente se ha observado inactivación de la catalasa por anión superóxido (*McCord, J., 1989*).

La concentración de este enzima es distinta en los diferentes órganos o compartimentos, así, en plasma su concentración es bastante baja (*Ramón, J.R., 1993*), encontrándose prácticamente ausente en cerebro, aunque su actividad puede ser inducida por el factor de crecimiento nervioso (*Evans, P.H., 1993*), siendo muy activa en hígado y eritrocitos (*Nieto, N., 1993*).

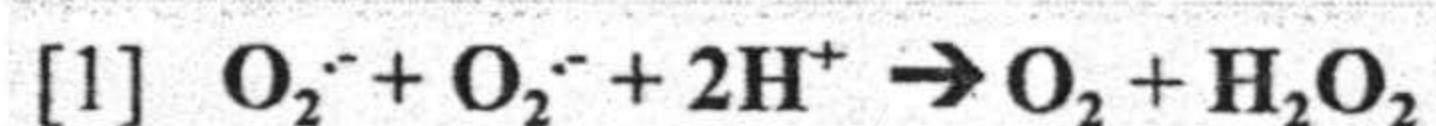


Se ha observado que puede ser el antioxidante celular más importante cuando se escapa de la células necrosadas, autolimitando la extensión del daño por radicales libres. Experimentalmente se ha utilizado con éxito en la isquemia-reperfusión del corazón aislado de rata, para minimizar las arritmias severas y la destrucción miocárdica producida por especies reactivas del oxígeno (Ramón, J.R., 1993).

También se ha demostrado su capacidad para atrapar ácido hipocloroso e inhibir metaloproteínas (Baud, L. y Ardaillou, R., 1993).

### 10.2.- Superóxido dismutasa

Familia de metaloenzimas, conocida por acelerar la dismutación espontánea de  $O_2^-$  hacia  $H_2O_2$  y  $O_2$  [1].



Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos aeróbicos, jugando un importante papel en el control de los niveles de  $O_2^-$  en los compartimentos celulares (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

Se aislaron por primera vez en 1939, por Man y Keilin a partir de eritrocitos bovinos, aunque en este primer aislamiento no se le asoció ninguna actividad enzimática, siendo denominada hemocupreína por su contenido en cobre. Posteriormente McCord y Fridovich, en 1969, mostraron su capacidad enzimática para inhibir la oxidación de ferrocitocromo C por eliminación de  $O_2^-$ , siendo renombrada como superóxido dismutasa (SOD) (McCord, J. y Fridovich, I., 1969).

Hoy en día, se pueden localizar en mamíferos tres grandes familias separadas en base a los metales que contiene y/o su localización en la célula. Dos familias son intracelulares, las superóxido dismutasas cobre, cinc-dependientes (Cu, Zn-SOD) y las manganeso dependientes (Mn-SOD) y una extracelular, las superóxido dismutasas extracelulares (Ec-SOD) (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

Las Cu,Zn-SOD, presentan un peso molecular de 32.000 daltons, estando constituidas por dos subunidades idénticas, con un átomo de cobre y otro de cinc cada una (Fridovich, I., 1975). De estos dos metales, el Cu es el que presenta una actividad catalítica, localizándose en el sitio activo del enzima, mientras que el Zn desempeña una función básicamente estructural (Dreosti, I.E. y Record, I.R., 1979). Esta familia se localiza principalmente en el citosol de la célula. Su gen se localiza en el cromosoma 21 humano (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

Las Mn-SOD, están constituidas por cuatro subunidades idénticas, con un átomo



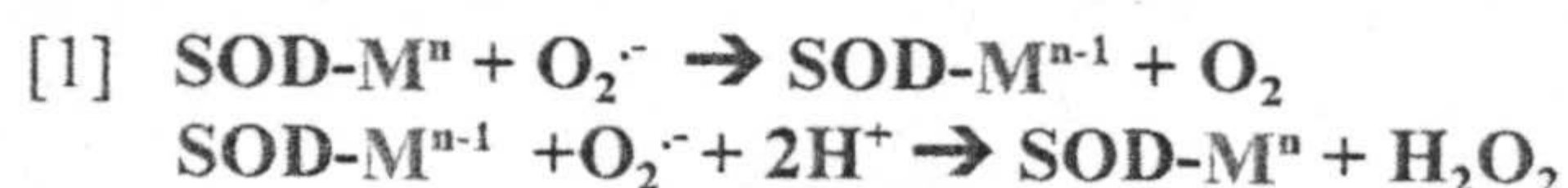
de Mn por unidad. Su peso molecular es de 80.000 daltons y su localización primordialmente mitocondrial (Fridovich, I., 1975). Su gen se localiza en el cromosoma 6 humano (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

La última familia, las Ec-SOD, fué descubierta en 1982 por Stefan Marklund en tejido pulmonar, tratándose de un tetrámero de 135.000 daltons y con un átomo de cobre por subunidad. Su gen se localiza en el cromosoma 4 humano. Esta SOD presenta menos actividad que las intracelulares (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

En bacterias, se han observado otras superóxido dismutasas, encontrándose una manganeso dependiente constituida por dos subunidades y una hierro dependiente localizada en el espacio periplasmático (Fridovich, I., 1975).

Las superóxido dismutasas están ampliamente distribuidas por todos los tejidos, salvo la Mn-SOD que no se localiza en eritrocitos. En humanos, las Cu, Zn-SOD, presentan mayor actividad en hígado y sustancia blanca del cerebro, y las Mn-SOD en hígado, corazón y páncreas. Las Ec-SOD son más activa en el espacio extracelular del útero, glándulas tiroideas y páncreas (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994).

El mecanismo general de actuación de las SOD es el mostrado en la ecuación [1].



La superóxido dismutasa ha sido utilizada en la limitación del daño oxidativo, mediante inyección directa en sitios de inflamación, demostrando un efecto antiinflamatorio, aunque es crítica una dosis correcta (Winrow, V.R. et al., 1993). También se ha observado su papel protector de la mucosa intestinal en procesos de isquemia-reperfusión (Shengyun, F. y Chistensen, J., 1995), en radioterapia (Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E., 1994), así como en otras patologías y órganos.

Es interesante la posible participación de las Cu, Zn-SOD en la relación especies reactivas del oxígeno-síndrome de Down-desarrollo de demencia de Alzheimer. Se ha observado que el síndrome de Down da lugar a una sobreproducción de la SOD, al encontrarse en el cromosoma 21, sobreproducción que no se encuentra acompañada de un incremento de glutatión peroxidasa ni catalasa, lo que conlleva un aumento en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , con los consecuentes posibles efectos tóxicos. A este proceso se le añade el hecho de que la actividad de la Cu, Zn-SOD se localiza preferentemente en el hipotálamo, región vulnerable al daño oxidativo en la enfermedad de Alzheimer (Evans, P.H., 1993).



### 10.3.- Glutation peroxidasa

Este término engloba a un conjunto de enzimas que catalizan la reacción de hidroperóxidos con glutatión (GSH), dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de reducción de hidroperóxidos [1].



El radical (R) puede ser cualquier grupo orgánico alifático o aromático o simplemente hidrógeno, siendo en este caso el substrato el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Mannervik, B., 1985*).

En organismos vivos se encuentran dos grandes grupos, las glutatión peroxidasa-selenio dependientes y la selenio independientes (*Mannervik, B., 1985; Nieto, N., 1993*).

Las selenio dependientes son tetraméricas, conteniendo selenio en forma de enlaces covalentes selenio-cisteina en su centro activo (*Mannervik, B., 1985*). Son activas frente a hidroperóxidos orgánicos y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , localizándose primordialmente en citosol (70%), y en menor cantidad en mitocondrias (30%), en la matriz mitocondrial y en lugares de contacto entre la membrana externa e interna mitocondrial (*Nieto, N., 1993; Benzi, G. y Moretti, A., 1995*).

El segundo grupo no requiere selenio para su actividad catalítica, presentando en general una menor afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Realmente esta actividad peroxidasa es llevada a cabo por las glutatión transferasas, las cuales se ha observado que aumenta su actividad de peroxidasa, disminuyendo su actividad transferasa, en situaciones de estrés oxidativo; este aumento y cambio de actividad ha sido observado en microsomas de hígado de rata entre otros órganos y especies (*Warholm, M. et. al., 1985; Aniya, Y. y Naito, A., 1993; Erifi, M. et. al., 1993*).

Las selenio independientes se localizan en citosol, mitocondrias y fracciones celulares que contengan membranas. Son varias isoenzimas, al menos 8 distintas, formadas por dos subunidades, presentando distinta reactividad y/o afinidad por uno u otro substrato, según su localización, así por ejemplo la transferasa microsomal presenta actividad peroxidasa frente al cumeno hidroperóxido, mientras que la citosólica no (*Mannervik, B., 1985; Aniya, Y. y Naito, A., 1993*).

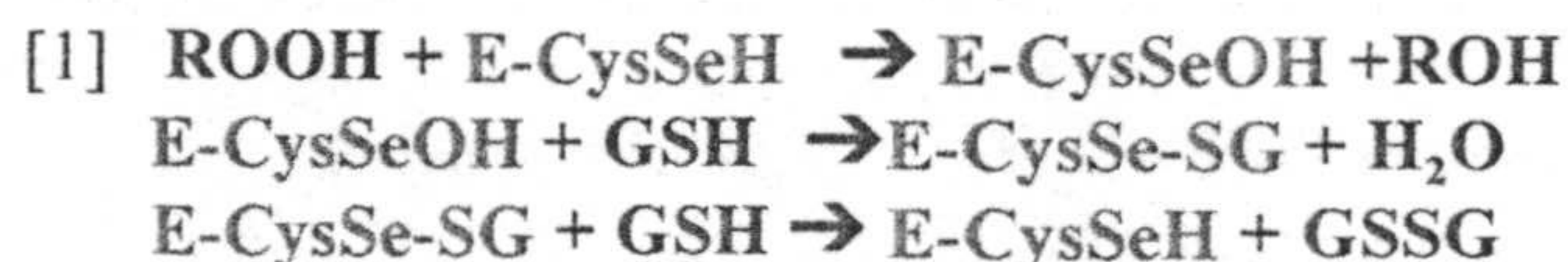
En la mayoría de los animales las selenio dependientes son las responsables de la mayor fracción de actividad peroxidasa, aunque se ha observado que la importancia relativa de las selenio dependientes y selenio independientes, en lo que respecta a actividad peroxidasa, varía no solo entre especies, sino también entre tejidos de una misma especie, así, por ejemplo, se observa una amplia contribución de la actividad peroxidasa de las selenio independientes en testículos de rata, en comparación con otros órganos, así como



una casi ausencia de selenio dependientes en cobayas (*Guthenberg, C., 1985*).

En mamíferos se ha descubierto un segundo tipo de glutathion peroxidasas selenio dependientes que, a diferencia de las anteriores está constituida por una sola unidad, son formas isoenzimáticas de las glutathion peroxidasas selenio dependientes, que actúan sobre hidroperóxidos de fosfolípidos sin necesidad de la actuación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Son enzimas solubles, localizados en citosol pero activos sobre membranas (*Maiorino, M. et. al., 1990*). Son menos activas sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las glutathion selenio dependientes, presentando igual reactividad frente a hidroperóxidos de ácido linoleico y siendo las únicas activas sobre hidroperóxidos de fosfolípidos (*Maiorino, M. et. al., 1990*).

El mecanismo de acción de las selenio dependientes sigue el esquema de la reacción [1].



#### 10.4.- Glutathion reductasa

Se trata de una flavoproteína encargada de catalizar la reducción NADPH dependiente del glutathion disulfato oxidado, hacia glutathion reducido (GSH) [1].



Está constituida por dos subunidades idénticas, presentando un peso molecular de 100.000 daltons y como grupo prostético FAD (*Carlberg, I. y Mannervik, B., 1995*).

Su importancia radica en la capacidad para mantener los niveles de glutathion reducido, el cual juega un importante papel en varios procesos de oxidación-reducción, entre los cuales se encuentra el servir de sustrato donador de hidrógenos en la actividad de la glutathion peroxidasa.

#### 10.5.- Vitamina E

Su estructura química es la de una molécula de tocol, constituida por un núcleo hidroxicromona al que se une una cadena de fitilo. Existen al menos ocho formas isoméricas, las cuales se dividen en dos grupos, cuatro con una cadena saturada de fitilo ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -tocoferol) y cuatro con una cadena de fitilo con dobles enlaces en la posición 3', 7' y 11' ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -tocotrienol) (*figura 21*). Las diferencias entre las formas isoméricas de cada grupo se encuentran en la posición de los grupos metilo en el anillo.



De estas formas isoméricas el  $\alpha$ -tocoferol predomina en muchas especies, siendo la forma más activa biológicamente y el mejor antioxidante liposoluble en células de mamíferos y sangre (Burton, G.W. et al., 1982).

Se ha demostrado experimental y clínicamente, tanto "in vitro" como "in vivo", la función de la vitamina E como antioxidante lipofílico, mediante la eliminación de radicales libres

(Tapel, A., 1968; Chow, C.K., 1991; Liebler, D.C., 1993), siendo conocida su actividad para eliminar oxígeno singlete, así como otros radicales del oxígeno (Sies, H. et al., 1993).

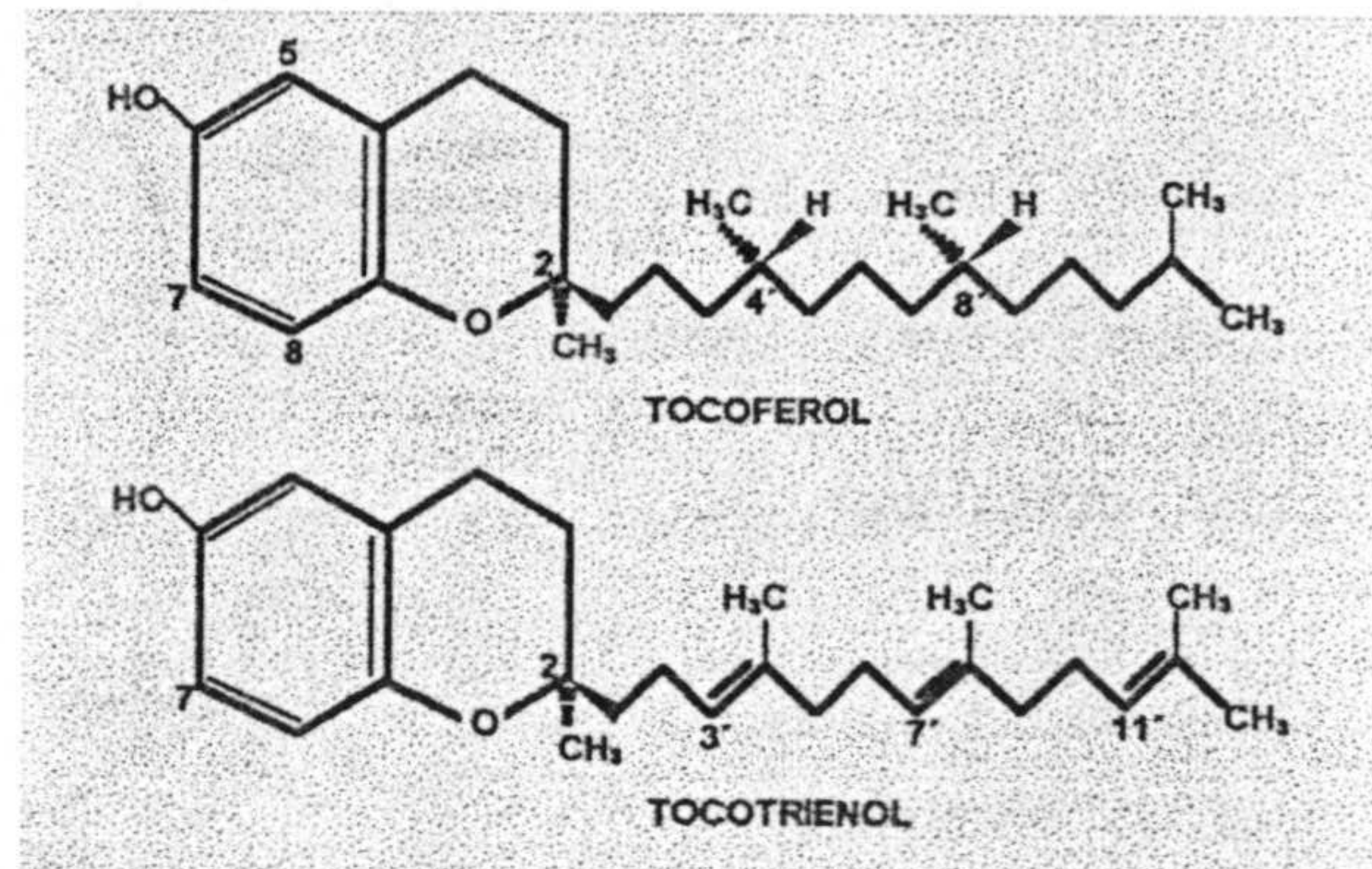
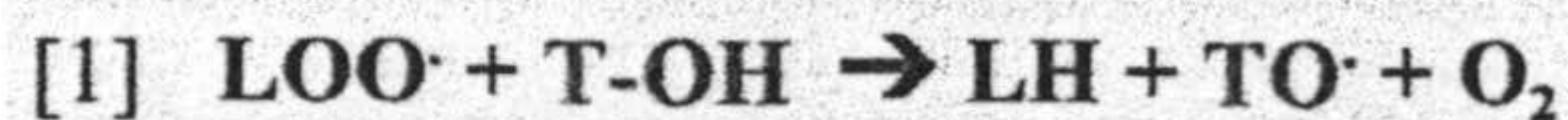


Figura 21.- Esquema de un tocoferol y un tocotrienol

El sitio activo se encuentra en el grupo 6-hidroxilo del anillo cromanol, el cual se sitúa, a nivel de membrana, cerca de la superficie polar, mientras que la cadena fitilo, se encuentra interaccionando con los ácidos grasos de los fosfolípidos en la región no polar, siendo esta la responsable de la cinética de transporte y retención en membranas (Graham, W.B. y Maret, G.T., 1990), no estando completamente fijo en estas (figura 22).

El mecanismo de inhibición de la oxidación, especialmente de lípidos, por  $\alpha$ -tocoferol, está ampliamente estudiado "in vitro" y bastante bien comprendido (Liebler, D.C., 1993). Al parecer es a nivel del radical lipídico peroxilo ( $\text{LOO}^\cdot$ ), en lo que respecta a la cadena de propagación de la peroxidación lipídica, donde se observa su actuación, eliminándolo e impidiendo que continúe la cadena [1] y por lo tanto la formación de nuevos radicales.



Se conoce que el  $\alpha$ -tocoferol, atrapa al radical peroxilo 10 veces más rápido de lo que este reacciona con otro lípido, es decir, sobre el 90% de los radicales peroxilo son atrapados por  $\alpha$ -tocoferol antes de que ataquen a otro lípidos (Machlin, L.J., 1991), igual eficiencia se ha observado "in vivo" para atrapar radicales alcoxilos e hidroxilos.

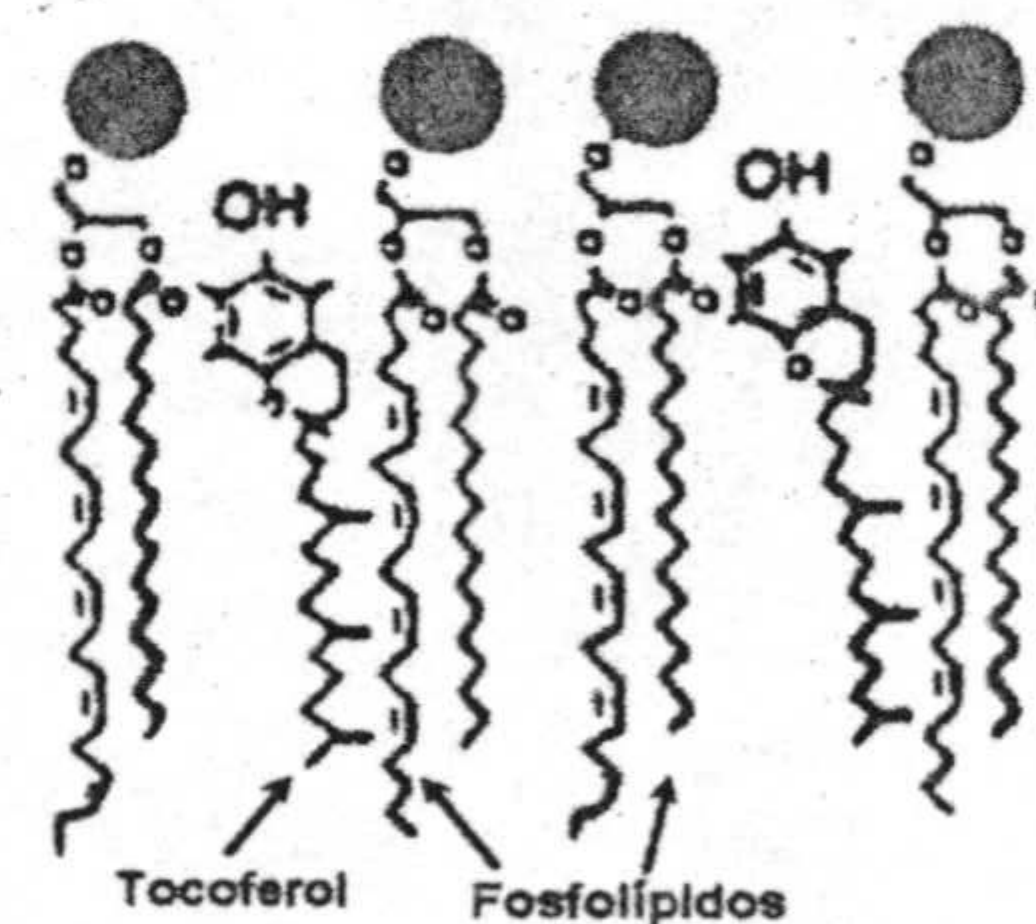


Figura 22.- Inserción de  $\alpha$ -tocoferol en membrana



El radical  $\alpha$ -tocoferoxilo formado en la reacción, puede seguir varias direcciones: reaccionar con otro radical peroxilo y dar un aducto, reaccionar con otro radical de vitamina E y dar un dímero, ser reducido por un reductor como la vitamina C, ubiquinol o glutatión; otra vía es la sustracción de un átomo de hidrógeno de lípidos o hidroperóxidos, dando un radical lipídico o radical peroxilo respectivamente, pudiéndose volver a poner en funcionamiento la cadena de propagación. En la *figura 23* se representan estas vías. La potencia de la vitamina E como antioxidante va a depender de estas reacciones competitivas (Packer, L., 1991).

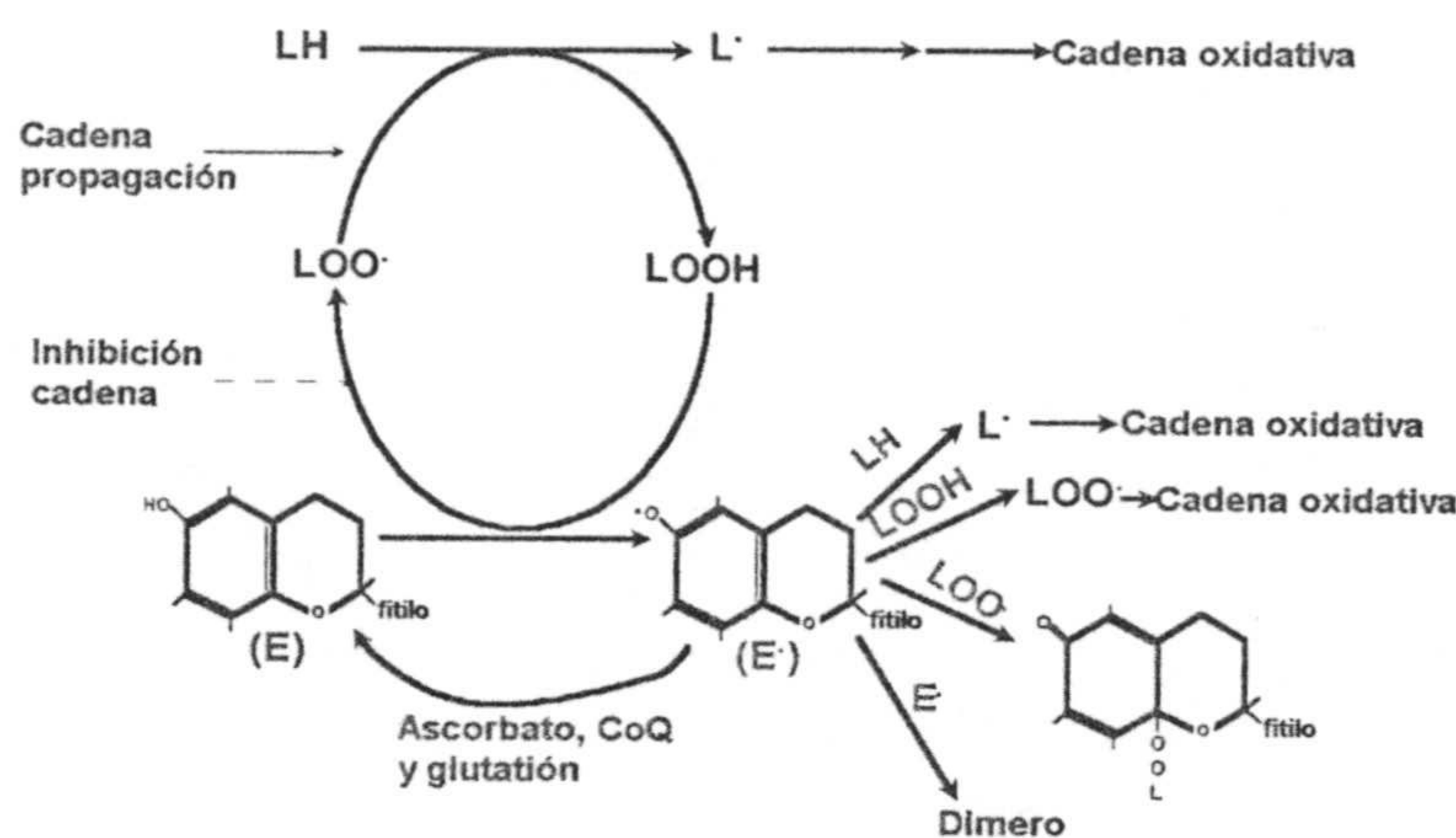


Figura 23.- Posibles vías de destrucción del radical tocoferoxilo

Como ya ha sido mencionado, son numerosos los estudios que demuestran que el  $\alpha$ -tocoferol actúa como un potente antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos. Entre estos se encuentran los realizados en células rojas sanguíneas, las cuales son excelentes modelos de estudio del daño oxidativo, por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y su continua exposición a altas concentraciones de oxígeno. En estas células la adición o incremento en la producción de radicales libres causa hemólisis, observándose la supresión de dicha hemólisis por supresión de la oxidación mediante adición de vitamina E, mostrándose que juega un papel importante en la ruptura de la cadena de las membranas gracias a su condición lipofílica (Niki, E., 1995).

Otros estudios utilizando LDL, han demostrado que la vitamina E es el más abundante y más activo antioxidante en LDL (Jessup, W. et. al., 1990), mostrándose igualmente que una suplementación oral con alfa-tocoferol incrementa el contenido en vitamina E en LDL y su resistencia a la oxidación (Dieber-Rotheneder, M. et. al., 1991).

También existen estudios que muestran una cierta capacidad prooxidante de la vitamina E, actuando como un componente en la cadena de propagación, ya que su incorporación en membrana cerca de la superficie facilitaría el atrapamiento de radicales de la fase acuosa, pudiendo seguir el radical tocoferoxilo resultante la vía de ataque a otros lípidos e iniciando la cadena de oxidación, aunque parece ser que esta actividad prooxidante



"in vivo" no es tan importante, debido a los agentes reductores como ascorbato, ubiquinol y glutatión, que regeneran el  $\alpha$ -tocoferol (*Nagaoka, S. et. al., 1990; Bowry, V.W., et. al., 1995*), siendo el ascorbato consumido primero cuando el radical tocoferilo se encuentra en la fase acuosa, mientras que el ubiquinol es consumido primero cuando los radicales son formados en la membrana.

Son muy numerosos los estudios que muestran su relación y actuación en el tratamiento de patologías diversas, así, se ha observado que deficiencias severas o crónicas pueden dar lugar a un progresivo síndrome neurológico, involucrando a la vitamina E en un óptimo desarrollo y mantenimiento de la función e integración del sistema nervioso y músculo esquelético. Otros estudios evidencian la suplementación con vitamina E para reducir el riesgo de enfermedad del corazón, igualmente, se ha observado su acción en cáncer, envejecimiento, polución, etc. (*Landvik, S.V. et. al., 1995*).

En base a todos estos estudios, se observa que la vitamina E presenta otras propiedades beneficiosas, como la de actuar como un estabilizador de membrana, un regulador de la fluidez de membrana, un inhibidor de la actividad 5-lipooxigenasa y un modulador de la actividad de la proteína quinasa C y, a través de esta, el  $\alpha$ -tocoferol podría modular la proliferación celular, etc.. Estos efectos podrían ser consecuencia de su actividad antioxidante, aunque otros antioxidantes con funciones similares no los presentan, por lo que no sólo debe existir esa acción antioxidante (*Parker, L., 1991*).

#### 10.6.- Coenzima Q

Se trata de una benzoquinona que presenta en la posición 6 una cadena lateral constituida por un número variable de unidades isoprenoides. Su función principal es de actuar como transportador móvil en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, transfiriendo electrones desde los complejos tipo DH al complejo III.

Su actividad antioxidante fue observada en estudios pioneros por Mellors y Tappel (*Mellors, A. y Tappel A.L. 1966*), los cuales mostraron una eficiente inhibición de la hiperoxidación por ubiquinol-6.

A partir de este estudio, se realizaron muchos otros en los que se demostró, la interacción directa del coenzima Q con radicales libres, disminuyendo así la oxidación de lípidos en liposomas, membranas (mitocondrias, microsomas, etc.), células y lipoproteínas (*Ernster, L. et. al. 1992*).

En los estudios iniciales se sugería que tanto la forma oxidada del coenzima Q (ubiquinona) como la reducida (ubiquinol,  $\text{CoQH}_2$ ), ejercían los mismos efectos antioxidantes, aunque en experimentos posteriores se mostró que era requerida una muy alta concentración de ubiquinonas para observar una actividad antioxidante significativa



(Landi, L. et. al. 1990), encontrándose que en diferentes fracciones membranosas la forma reducida o ubiquinol demostraba una mayor habilidad que la forma oxidada para inhibir la lipoperoxidación inducida por  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbato (Kagan, V.E. et.al. 1990).

Igualmente, se ha mostrado "in vitro", que ubiquinoles con cadenas laterales isoprenoides cortas ( $\text{Q}_1$ - $\text{Q}_4$ ) ejercen un efecto inhibitor de la lipoperoxidación más potente que sus homólogos de cadena larga ( $\text{Q}_5$ - $\text{Q}_{10}$ ) (Kagan, V.E. et.al. 1990).

La reactividad de los ubiquinoles con radicales peroxilo no es muy alta, encontrándose para el ubiquinol-9 una constante de interacción de  $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (siendo esta constante un orden de magnitud más bajo que la presentada para la vitamina E ( $33,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Valerian, E.K. et al. 1990).

Se imagina que el mecanismo antioxidativo más utilizado o significativo es el de la reciclación de vitamina E a través del radical  $\alpha$ -tocoferoxilo, dato reforzado por el conocimiento de que la constante de interacción ubiquinol-radical tocoferoxilo es de  $3,74 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (a  $25^\circ\text{C}$  en benceno), mucho más alta que la constante de reacción con radical peroxilo, por lo que se observa una preferencia por reducir  $\alpha$ -tocoferoxilo más que por interactuar con radicales peroxilo (Mukai, K. et.al. 1993).

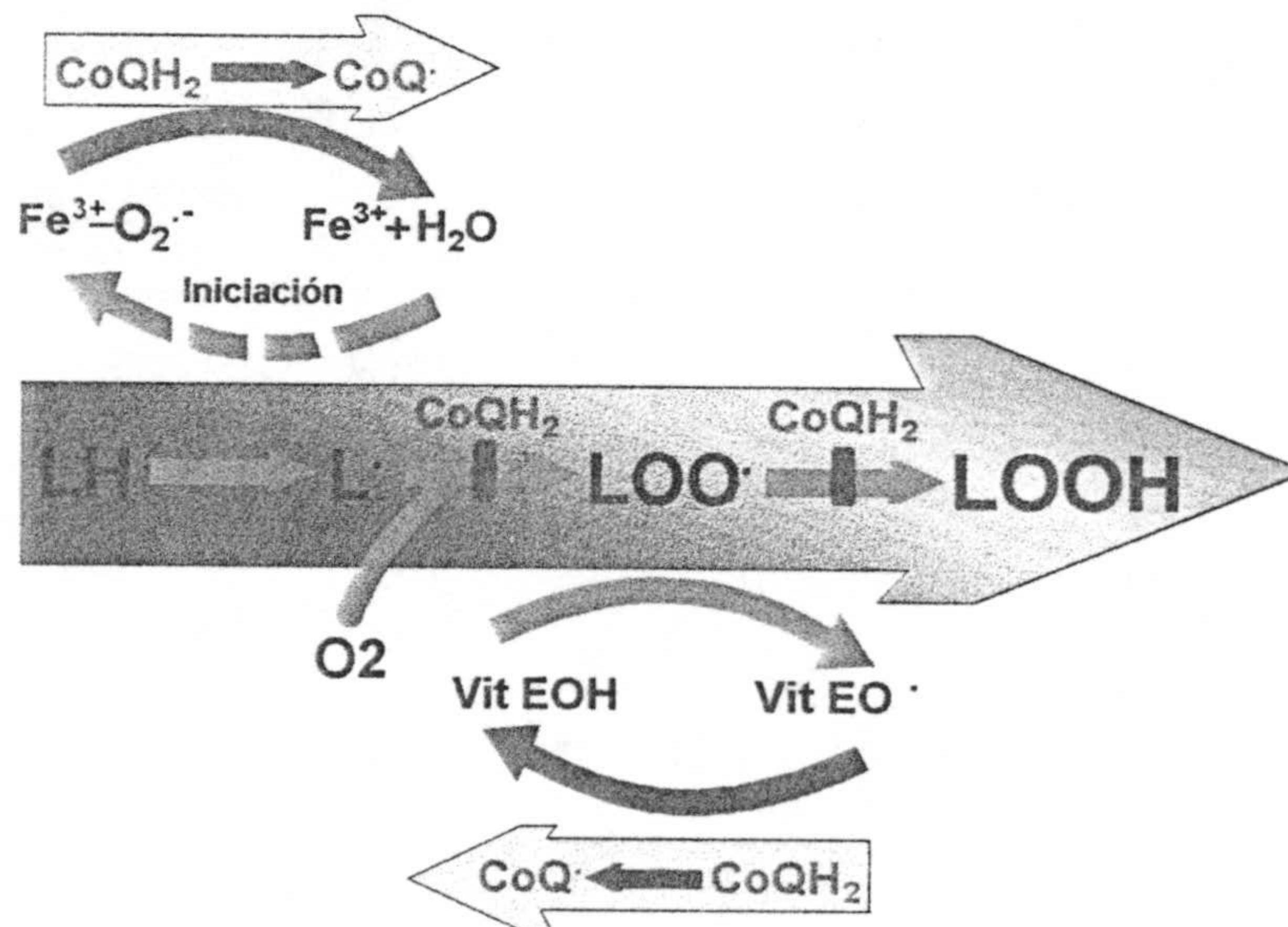
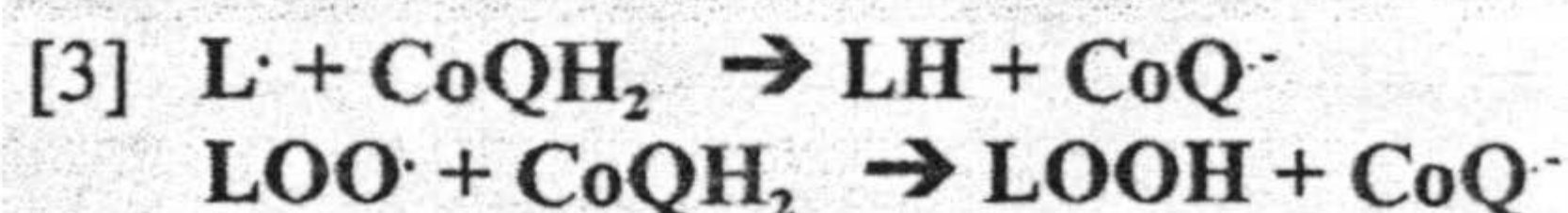
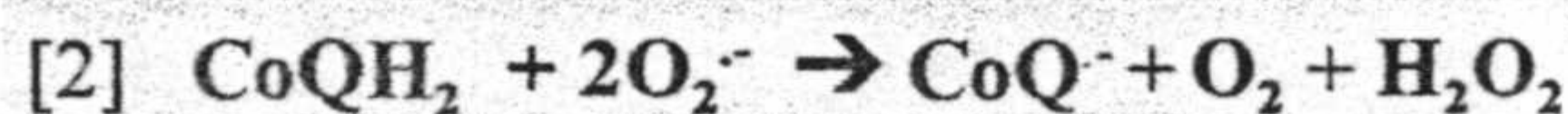
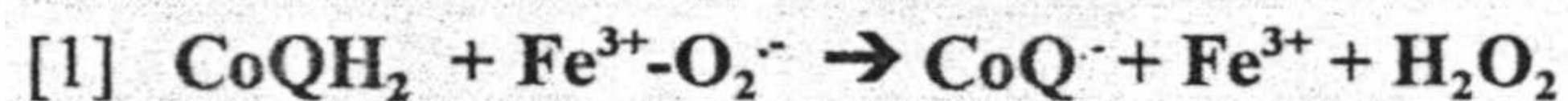


Figura 24.- Esquema de distintos mecanismos antioxidantes llevados a cabo por el coenzima Q.



De los estudios realizados por numerosos grupos de investigación, se extraen varios mecanismos de actuación antioxidativa. Así, uno de los mecanismos es la reducción directa de especies perferrilo ( $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^-$ ) por  $\text{CoQH}_2$  [1], con la consecuente prevención del ataque de estas especies, considerándose este mecanismo como inhibidor de la síntesis de radicales alquilo y peroxilo. Otro mecanismo es la interacción directa con anión superóxido [2] y con radicales alquilo y peroxilo, mediante donación de átomos de hidrógeno a estos radicales [3] (figura 24) (Litarru, G.P., 1994; Kagan, V.E. et al., 1995).



Unos de los mecanismos más significativos, como se ha comentado anteriormente, es la regeneración de  $\alpha$ -tocoferol [4].



Otro mecanismo antioxidante, que lo involucra en el daño por isquemia-reperusión, consiste en la actuación del  $\text{CoQH}_2$  sobre la formación de ferril mioglobina (forma radical), producto formado en la interacción de mioglobina con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , poderoso agente oxidante capaz de atacar importantes componentes celulares, así, en estudios "in vitro" se muestra que la adición de ubiquinol reduce estos compuestos y por lo tanto su daño, regenerándose además la forma oxidada de  $\text{CoQ}$ . Este mecanismo presentaría una doble ventaja: disminución de un radical y regeneración de ubiquinona (Litarru, G.P. et al. 1995).

La posible inducción de DT-diaforasa, un enzima que convierte a las quinona en hidroquinonas, más que en semiquinonas, previniendo así su posterior autoxidación, podría convertirse en otro mecanismo antioxidante (Lind, C. et al. 1982).

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación, involucran al  $\text{CoQ}$  en la modificación de la extensión de la peroxidación lipídica inducida por estrés endógeno o exógeno y/o inducida por manipulación de la grasa dietaria, demostrando que la inducción de oxidación por un estrés, ya sea exógeno (adriamicina) o endógeno (ejercicio físico) aumenta el contenido de  $\text{CoQ}$  en membrana, siendo además mayor el efecto cuanto más insaturada es la grasa de la dieta (Mataix, J. et al., 1997).



### 10.7.- Carotenoides

El término carotenoide se utiliza generalmente para designar a moléculas de 40 átomos de carbono y un extenso sistema de dobles enlaces conjugados (Handelman, G.J., 1995). Son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo el carotenoide prototipo el  $\beta$ -caroteno, sobre todo por ser el que mayor actividad vitamina A posee (Simpson, K.L. y Chichester, C.O., 1981). Alguno de estos carotenoides, se muestran en la figura 25.

Se ha observado en numerosos estudios su actividad antioxidante, mostrándose su capacidad para reaccionar con oxígeno singlete, radical peroxilo, radical hidroxilo, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas (Handelman, G.J., 1995).

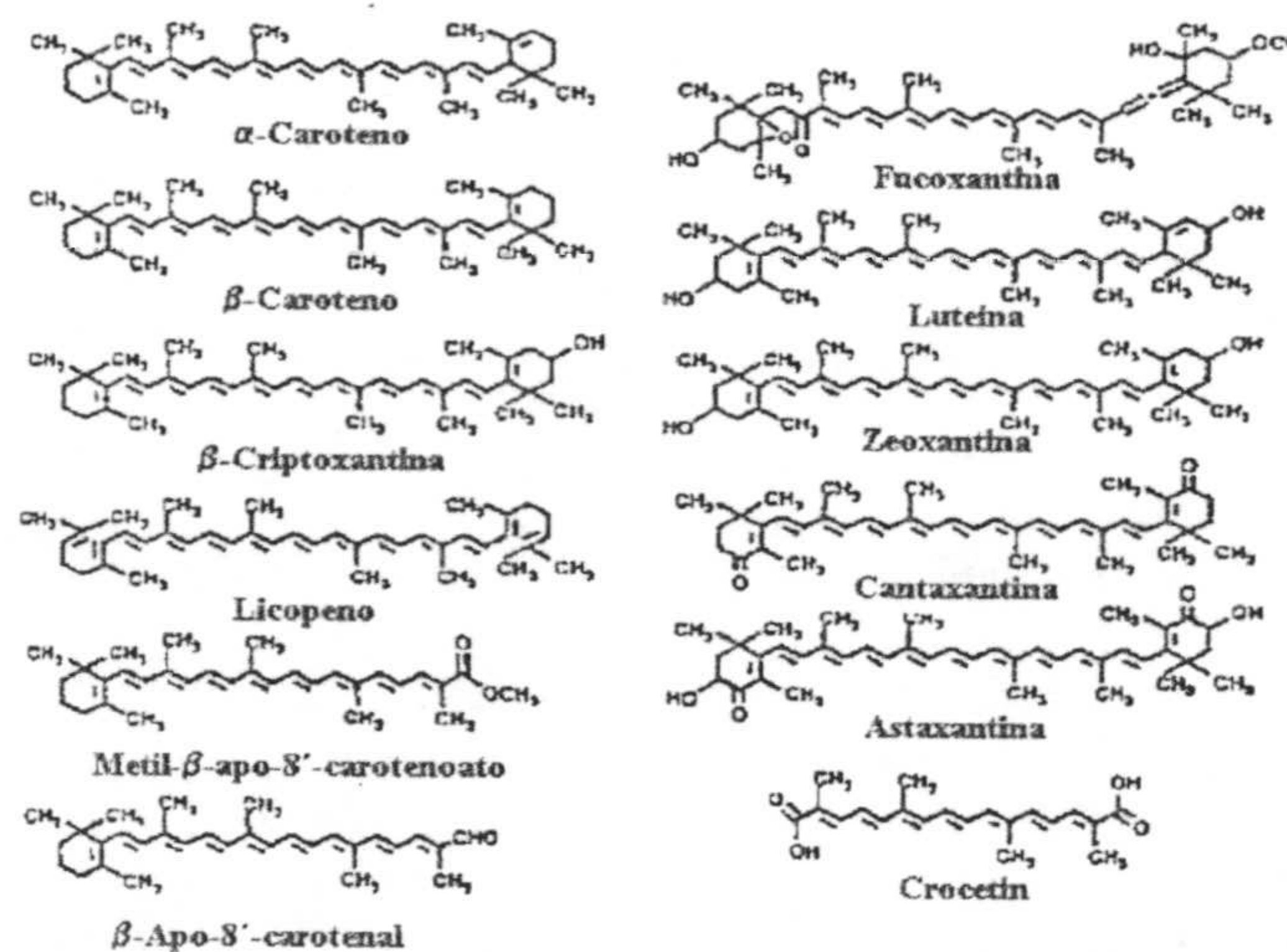


Figura 25.- Estructura de algunos de los carotenoides más típicos.

De estos estudios se extrae que la capacidad antioxidante de los carotenoides, depende fundamentalmente de la concentración de  $O_2$  existente, la estructura química de los mismos y el efecto acompañante de otros antioxidantes (Krinsky, N.I., 1993).

Los carotenos presenta una mayor actividad a bajas presiones de oxígeno, perdiendo efectividad conforme aumenta dicha presión (Krinsky, N.I., 1993; Handelman, G.J., 1995). Burton e Ingold incluso observaron una cierta actividad prooxidante de los carotenos, a una presión de 1 atmósfera y con una proporción carotenoide:lípido de 1:300 (Burton, G.W. y Ingold, K.U., 1984), aunque esta actividad prooxidante a altas presiones no está del todo confirmada.

En lo referente a la relación estructura-actividad antioxidante, se ha observado que no todos los carotenoides muestran la misma capacidad antioxidativa. Así, en estudios "in vitro", se observa que los carotenoides con 8 o más dobles enlaces son 1000 veces más efectivos, a la hora de reaccionar con oxígeno singlete, que los que presentan 5 o menos (Handelman, G.J., 1995). Otros autores han observado que carotenoides con dobles enlaces

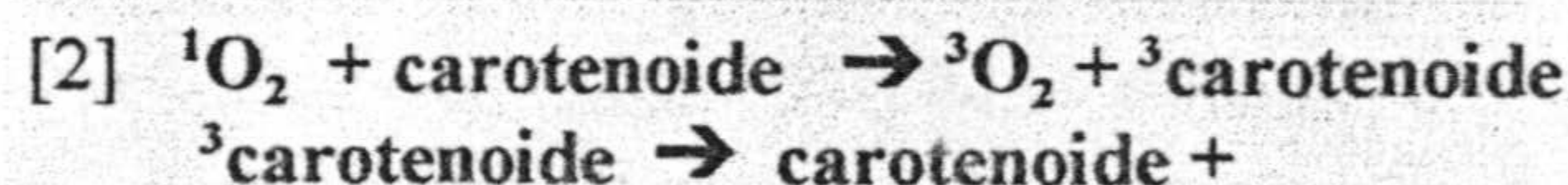
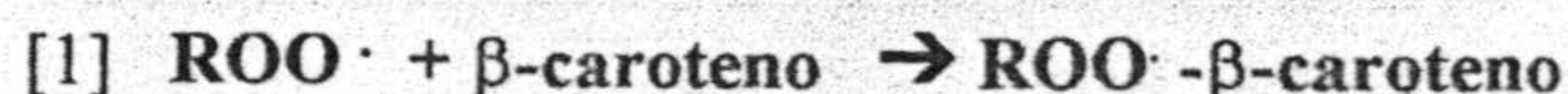


conjugados adicionales, como licopeno, incrementan su constante de interacción; también la presencia de carbonilo terminal, epóxidos u otros grupos oxigénicos la incrementan (Hirayana, D. et. al., 1994).

Con respecto al oxígeno singlete, se ha mostrado in vitro que una molécula de  $\beta$ -caroteno es capaz de interaccionar con al menos 100.000 moléculas de oxígeno singlete, antes de su total destrucción (Handelman, G.J., 1995).

En otros estudios se ha observado que la acción sinérgica de  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno aumenta la actividad antioxidante de este último, seguramente mediante la protección por parte del  $\alpha$ -tocoferol de la autooxidación de  $\beta$ -caroteno e inhibición de los posibles efectos oxidantes del radical peroxilo de  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -car-oo $\cdot$ ), formado durante la acción antioxidante del mismo (Krinsky, N.I., 1993).

El mecanismo de acción no es conocido en todos los casos, aunque se ha observado que con el radical peroxilo forma un intermediario radical transitorio [1] y en el caso del oxígeno singlete mediante la transferencia de energía de excitación al  $\beta$ -caroteno, con posterior eliminación de dicha energía como calor [2] (Handelman, G.J., 1995).



La mayoría de estos estudios han sido realizados "in vitro", aunque los estudios realizados "in vivo" refuerzan los datos observados, destacando dos aspectos importantes en la actividad antioxidante de los carotenoides, uno de ellos es la eficiencia en una disminución directa de la peroxidación lipídica y el otro es la habilidad de esta molécula para modular los niveles endógenos de otros antioxidantes (Krinsky, N.I., 1993).

### 10.8.- Acido ascórbico

El ácido ascórbico presenta la capacidad de poder sufrir rápidamente dos procesos oxidativos monovalentes consecutivamente, con la formación del radical semidihidroascrobato (Asc $\cdot$ ) como intermediario, radical relativamente no reactivo. (figura 26)

Estas características hacen a este compuesto un antioxidante hidrosoluble donador excelente (Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., 1995).

El ascorbato según algunos autores es el antioxidante plásmatico más eficaz, ya



que aunque su contribución a la capacidad antioxidante es de 0-24%, menor que la encontrada para urato (35-65%) o para las proteínas plasmáticas (10-50%) (Etsuo, N., 1991), es el primero en ser consumido y por lo tanto en atacar (Frei, B., 1991).

Este componente es capaz de interactuar directamente con  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ , oxígeno singlete, radicales centrados en el nitrógeno y en el sulfuro y radicales lipídicos (reacciones [1-4]) (Stadman, R.E., 1991; Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., 1995), Siendo, por ejemplo, más eficaz en la prevención de la oxidación por  $NO_2$  que la vitamina E (Sauberlich, H.E., 1994).

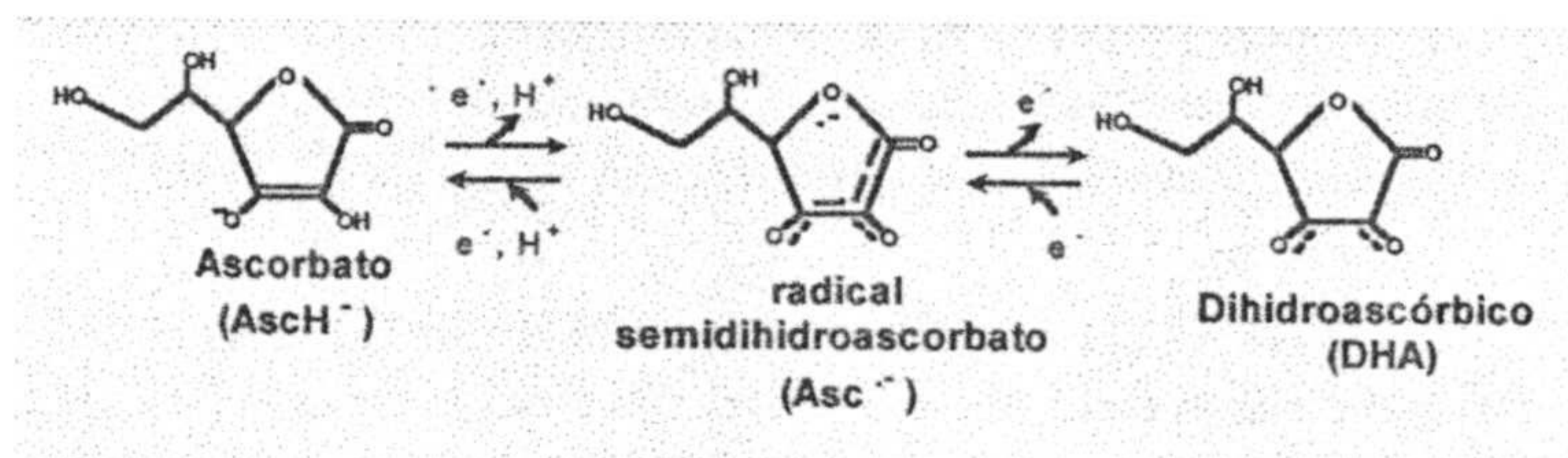
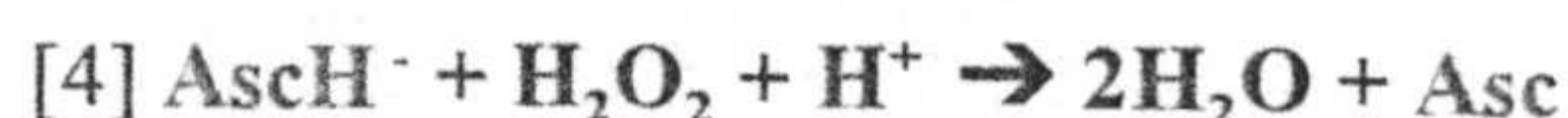
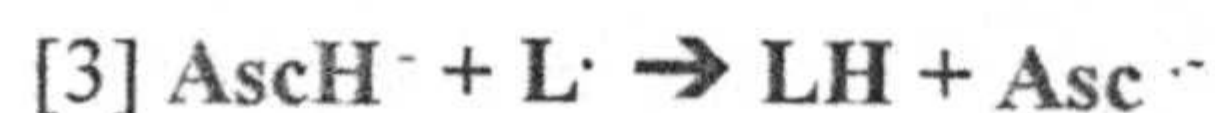
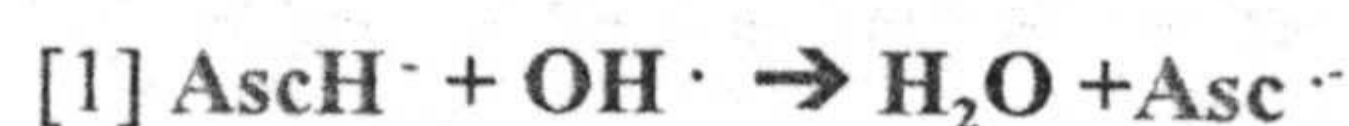


Figura 26.- Procesos oxidativos monovalentes sufridos por el ácido ascórbico.



Otro mecanismo antioxidante importante llevado a cabo por la vitamina C, es la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol por medio de la interacción con el radical tocoferoxilo (Niki, E., 1991).

A pesar de que la vitamina c es hidrosoluble y el tocoferol liposoluble, la interacción entre ambas es posible gracias a la disposición del grupo fenol activo del tocoferol en las membranas biológicas, el cual se localiza en la interfase agua-membrana. Así, el  $\alpha$ -tocoferol protege a las membranas del daño oxidativo y la vitamina C, además de regenerar el pool de tocoferol de membrana, protege a las membranas de las posibles reacciones prooxidantes del radical tocoferoxilo (Niki, E., 1991; Sauberlich, H.E., 1994).

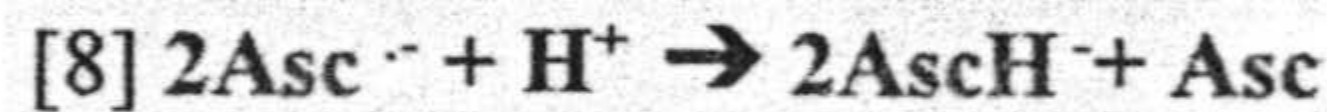
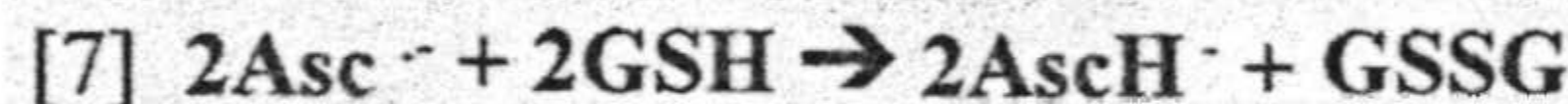
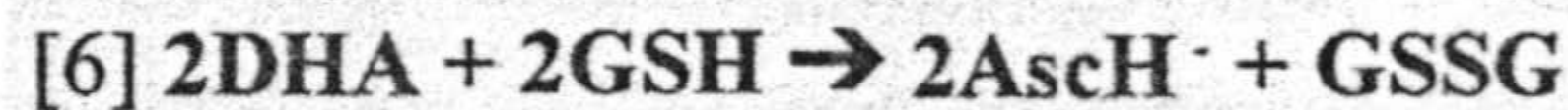
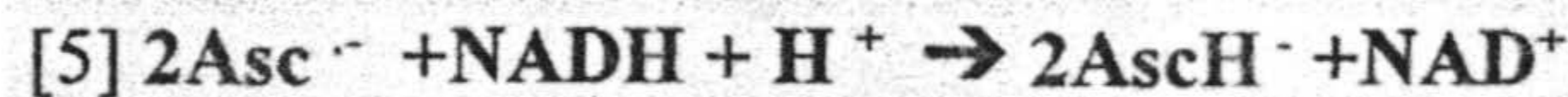
Son muy numerosos los estudios en los que se observa el efecto preventivo, en mayor o menor grado, de la ingesta de vitamina C sobre numerosas patologías, tales como cataratas, diabetes mellitus, cáncer, enfermedades respiratorias, lipoperoxidación, enfermedades coronarias, etc. (Frei, B., 1991; Sauberlich, H.E., 1994; Brown, L.A. y Jones, D.P., 1995). Por ejemplo, se ha observado que una alta ingesta dietaria de vitamina C



presenta un efecto protector frente al desarrollo de síntomas crónicos respiratorios, asociándose a una reducción en la peroxidación lipídica (*Schwartz, J. y Weiss, S.T., 1990*).

En otros estudios se ha observado una concentración de ascorbato en neutrófilos activos 10 veces más de la encontrada en neutrófilos inactivos, lo cual podría constituir un mecanismo antioxidante de control, ante la liberación de especies reactivas del oxígeno al exterior (*Washko, P. y Levine, M., 1992*).

La regeneración de ascorbato puede ser vía enzimática, mediante la monodihidroascorbato reductasa [5] y la dehidroascorbato reductasa [6] (*Buettner, G.A. y Jurkiewicz, B.A., 1995*). Otras vías son mediante interacciones con otras moléculas como glutatión [7] o por interacción de dos radicales semidihidroascorbato [8] (*Stadtman, E.R., 1991*).



Una cierta actividad prooxidante ha sido observada para la vitamina C, radicando en su capacidad para reducir metales catalíticos de transición como  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^+$ , con la toxicidad que ello implica, aunque el predominio de una actividad prooxidante o antioxidante, va a depender de las concentraciones relativas de ascorbato y metales de transición libres, mostrándose la prooxidante en condiciones de bajas concentraciones de ascorbato y relativamente altas de metales libres (*Buettner, G.R. y Jurkiewicz, A.B., 1995*). Esta actividad prooxidante se ve disminuida por interacciones con otros antioxidantes, por ejemplo se ha observado que el urato protege de la oxidación por ácido ascórbico mediante el atrapamiento de metales catalíticos (*Sevanian, A. et. al., 1991*).

Otro mecanismo de posible actividad prooxidante por parte del ácido ascórbico, radica en su propia autooxidación con producción de anión superóxido, lo cual también requiere la presencia de metales de transición, observándose que el cobre es 80 veces más eficiente que el hierro en esta catálisis (*Buettner, G.R., 1988*).

### 10.9.- Ácido úrico

El ácido úrico es producido vía actuación xantina deshidrogenasa y/o oxidasa. A un pH fisiológico este compuesto es ionizado mayoritariamente hacia urato (*Simic, M.G. y Jovanovic, S.V., 1989*).



La reacción del urato con radicales libres varía en base al radical en cuestión. Con el radical  $\text{OH}\cdot$  interacciona directamente, pero con una reactividad muy baja y similar a la de gran cantidad de moléculas encontradas en organismos vivos, siendo realmente su relación con este radical indirecta, por atrapamiento de metales catalíticos de transición (Simic, M.G. y Jovanovic, S.V., 1989). Una reactividad similar es encontrada para el ácido hipocloroso (Grootveld, M. et al., 1987).

Sin embargo, es un poderoso atrapador de oxígeno singlete (Kanofsky, J.R., 1990) y de ozono, habiéndose observado que cuando el plasma es expuesto al ozono, el ascorbato y el urato son rápidamente oxidados (Peden, D.B. et al., 1993). Igualmente, en el tracto respiratorio superior en humanos hay mayores niveles de urato que de ascorbato y glutatión peroxidasa, sugiriéndose que el ozono inhalado reacciona preferentemente con urato en estas zonas (Peden, D.B. et al., 1993). Similar reacción se muestra para el  $\text{NO}_2\cdot$  y el peroxinitrilo.

Se ha mostrado, en diversos estudios, su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, fundamentalmente por atrapamiento de metales de transición y en menor grado por su reacción con radicales peroxilo (Halliwell, B., 1995).

#### 10.10.- Otros antioxidantes

En el organismo existen otras muchas moléculas que actúan como antioxidantes, entre ellas se encuentra el **glutatión**, tripéptido formado por glutamina, cisteína y glicina. Se encuentra en prácticamente todas las células, presentando un importante papel como antioxidante intracelular y en el líquido de recubrimiento epitelial (Ramón, J.R., 1993).

El sistema glutatión reducido-oxidado utiliza hidroperóxidos para oxidar el glutatión reducido según la reacción de la figura 27. Existiendo evidencias crecientes de que es necesario un fino balance entre GSH/GSSG para un adecuado mantenimiento de la salud (Ramón, J.R., 1993).

El glutatión proporciona el poder reductor necesario para la conversión de dehidroascorbato a ascorbato (Meister, A., 1994) y de radical tocoferoxilo a tocoferol.

Parece jugar un papel crítico en la protección de células frente al daño oxidativo del DNA inducido por mitogénesis, así, en ratas con depleción de glutatión intracelular, se encontraron 5 veces más niveles de 8-hidroxi-2-desoguanosina en DNA y 2 veces en la

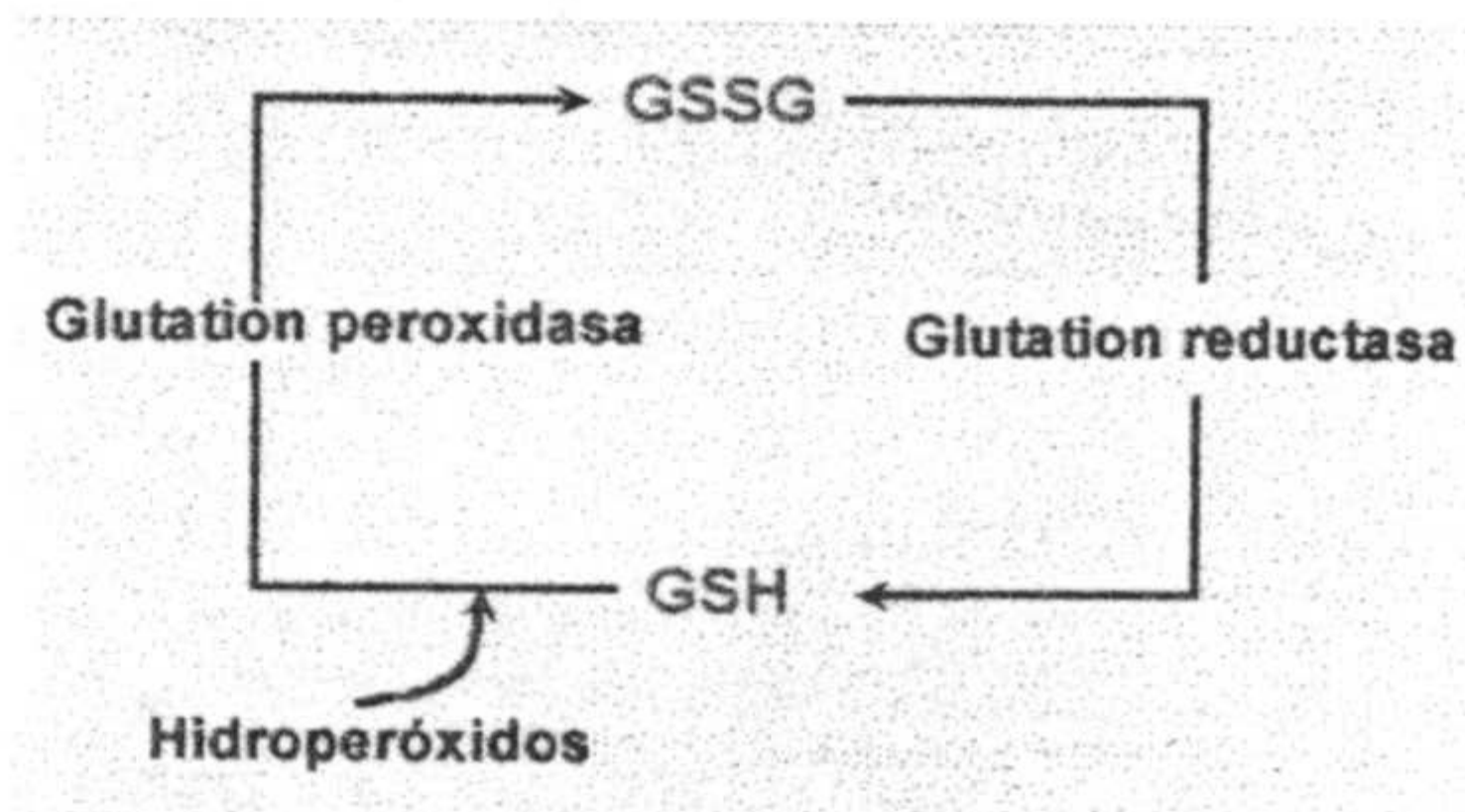


Figura 27.- Sistema Glutatión.



excreción urinaria, que en ratas controles (*Ames, B.N. y Shigenaga, M.K., 1993*).

Además de su papel de sustrato en el ciclo redox del glutatión, este reacciona directamente con el  $O_2 \cdot^-$  y  $OH \cdot$  Y radicales libres orgánicos (*Romero Alvira, D. et. al., 1992*).

Se ha observado una fuerte línea evolutiva entre GSH y el metabolismo eucariótico, que podría reflejar la función del GSH en la protección contra la citotoxicidad del oxígeno (*Meister, A., 1994*).

Al igual que el glutatión otros aminoácidos presentan una actividad antioxidante, como la **cisteína** y **cisteamina**, que pueden provocar la reducción de diversos compuestos orgánicos por medio de la donación de electrones desde los grupos sulfidrilo, la **taurina**, que puede reaccionar con el ácido hipocloroso (*Romero Alvira, D. et. al., 1992*).

Existen otras moléculas como la **bilirrubina**, que reacciona con radicales peroxilo y las **glucosa**, la cual presenta una acción eliminadora de radical hidroxilo (*Romero Alvira, D. et. al., 1992; Ramón, J.R., 1993*).

Otro mecanismo de protección contra la oxidación es la quelación o atrapamiento de los metales de transición, así las proteínas que transportan hierro como **transferrina**, con dos átomos de hierro unidos, la **ferritina**, que puede transportar hasta 4500 átomos de hierro, son antioxidantes. La **ceruloplasmina**, es una molécula atrapadora de cobre, observándose que en la enfermedad de Wilson, un desorden metabólico caracterizado por unas bajas concentraciones de ceruloplasmina en sangre, tiene lugar un fuerte ataque de radicales libres estimulados por cobre y el tratamiento con penicilamina, un agente quelador de cobre, la disminuye. La ceruloplasmina también juega un papel en la oxidación de hierro hacia la forma ferrica, que como hemos visto es menos reactiva. (*Cheeseman, K.H., 1993; Litarru, G.P., 1994*).

#### 10.11.- Mecanismos de reparación

Los mecanismos reparativos son los encargados de la eliminación de biomoléculas dañadas, antes de que su acumulación y/o presencia den lugar a alteraciones en el metabolismo celular o incluso la muerte celular. Así, el daño oxidativo a ácidos nucleicos es reparado por enzimas específicas (*Cheeseman, K.H. y Slater, T.F., 1993*), como las DNA glicosilas, las cuales pueden ser de dos tipos, unas capaces de hidrolizar enlaces N-glicosílicos entre una dañada o inapropiada base y el azúcar desoxirribosa y otras que además de presentar la función anteriormente mencionada, presentan actividad  $\beta$ -liasa, eliminando los sitios azúcares-fósforo resultantes por  $\beta$ -eliminación. También encontramos endonucleasas de varios tipos (*Ramotar, D. y Demple, B., 1993*).



Proteínas oxidadas son eliminadas por sistemas proteolíticos y los lípidos de membrana oxidados por peroxidasas, lipasas y aciltransferasas, por ejemplo la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que se encarga de liberar los ácidos grasos oxidados de los fosfolípidos de membrana, para que puedan actuar sobre ellos los sistemas antioxidantes correspondientes (Cheeseman, K.H. y Salter, T.F., 1993), habiéndose observado que su actividad aumenta en la membrana interna mitocondrial y otras membranas en respuesta a condiciones asociadas a un incremento de especies reactivas del oxígeno (Malis, C.D. et. al., 1990; Hatch, G.M., et. al., 1993).

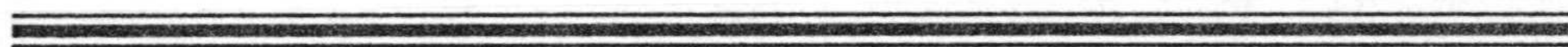
#### 10.12.- Mecanismos de adaptación

Los radicales libres formados en el entorno de la célula y las especies reactivas del oxígeno, pueden actuar como señales capaces de inducir la síntesis y el transporte de los apropiados antioxidantes al sitio de acción. Por ejemplo, el ejercicio físico es un estímulo capaz de inducir las síntesis de catalasa, otras peroxidasas y coenzima Q (Litarru, G.P., 1994).

Otro ejemplo se encuentra en la activación por especies reactivas del oxígeno de genes reguladores transcripcionales, como es el caso del NF-kB, involucrado en la respuesta inflamatoria en fase aguda (Sies, H., 1993).



*CAPITULO III*



MATERIAL Y MÉTODOS







## 1.- PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

Los reactivos y solventes utilizados en las determinaciones analíticas fueron suministrados por los laboratorios Merck (Darmstadt, Alemania), Fluka (St. Louis, MO, USA), Sigma (St. Louis, MO, USA), Panreac (Barcelona, España) y Boehringer (Manheim, Alemania). Los solventes de calidad HPLC, procedieron de los laboratorios Merck.

Los patrones para la determinación de vitaminas, colesterol, proteína y ácidos grasos fueron suministrados por Sigma y Fluka. Los homólogos de CoQ<sub>6</sub>, CoQ<sub>8</sub>, CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> fueron cortesía de Eisai Co, Tokio, Japón.

## 2.- ANIMALES

El estudio ha sido llevado a cabo con un total de 32 conejos machos, con un peso de partida de 2.000 a 2.500 g, los cuales fueron divididos en cuatro grupos de 8 conejos.

Los animales fueron alojados durante las 10 semanas de duración del experimento en jaulas individuales con libre acceso al agua y a la comida (*figura 1*), la cual fue suministrada "ad libitum".

Las jaulas se encontraban en una habitación termorregulada a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ , con un 60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 horas de luz (8.00 horas-20.00 horas) y 12 horas de oscuridad (20.00 horas-8.00 horas).

**Tabla 1.-** Composición general de las dietas.

COMPONENTES	%
Caseína	19.0
Almidón	23.0
Azúcar	29.6
Celulosa	14.0
Grasa	6.0
C. Mineral	7.0
C. Vitamínico	1.0
Metionina	0.3
Colina	0.1

## 3.- DIETAS

Durante las 10 semanas de duración del estudio, los animales fueron alimentados con una dieta semisintética que cubría todos los requerimientos energéticos y nutricionales del conejo. En las *tablas 1, 2 y 3* se muestra la composición de esta dieta y de los correctores vitamínicos y minerales utilizados.



**Figura 1.-** Jaulas en las que se alojaron a los conejos.



**Tabla 2.-** Composición del corrector mineral utilizado

COMPONENTES	mg/kg
Fosfato de calcio dibásico	35000.0
Cloruro Sódico	5180.0
Citrato potásico	15400.0
Sulfato potásico	3640.0
Óxido de magnesio	1680.0
Carbonato de manganeso	245.0
Citrato Férrico	420.0
Carbonato de cinc	112.0
Carbonato de cobre	21.0
Iodato potásico	0.7
Selenito sódico	0.7
Sulfato crómico	38.5
Sacarosa	8262.1

**Tabla 3.-** Composición del corrector vitamínico utilizado

COMPONENTES	mg/kg
Tiamina	6.00
Riboflavina	6.00
Piridoxina	7.00
Ác. Nicotínico	150.00
Pantotenato cálcico	16.00
Ác. Fólico	2.00
Biotina	0.20
Cianocobalamina	0.01
Vit. A+D	10.00
Vit. E	94.00
Vit. K	5.25
Vit. C	250.0
Sacarosa	9453.54

La variación existente entre los cuatro grupos experimentales viene dada por la grasa, la cual en todos los casos representa un 6% de la energía total. En la *tabla 4* se muestra la composición en ácidos grasos de las distintas fuentes grasas utilizadas y algunos de los componentes de la fracción insaponificable de los mismos.

Las dietas se preparaban semanalmente y eran almacenadas a 4°C para evitar enranciamientos.

**Tabla 4.-** Principales componentes de los aceites utilizados

	Composición de los aceites utilizados en las dietas			
	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
	%	%	%	%
Palmítico	9.00	9.08	11.20	4.26
Palmitoleico	0.56	0.67	0.99	0.10
Esteárico	3.71	3.73	2.03	3.92
Oleico	81.75	81.43	77.27	80.19
Linoleico	3.65	3.51	6.70	10.68
Gadoleico	0.30	0.32	0.37	0.34
Linolénico	0.52	0.54	0.51	-
	ppm.ác.caf.	ppm.ác.caf.	ppm.ác.caf.	ppm.ác.caf.
Polifenoles	738.00	69.67	180.50	12.00
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Tocoferol	314.30	214.20	275.50	921.60



#### 4.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales de estudio fueron divididos al azar en los siguientes grupos experimentales:

**Aceite de oliva virgen variedad Picual (VP):** Este grupo consumía como única fuente grasa alimentaria una variedad de aceite de oliva virgen, la variedad Picual, muy rica en polifenoles y contenido medio de tocoferoles.

**Aceite de oliva virgen "lavado" variedad Picual (VPL):** La fuente grasa en este grupo es la misma variedad de aceite de oliva virgen que en el anterior, pero sometida a un proceso de lavado que conlleva la pérdida de polifenoles y una disminución en el contenido de tocoferoles..

**Aceite de oliva virgen variedad Arbequina (VA):** Se emplea en este grupo otra

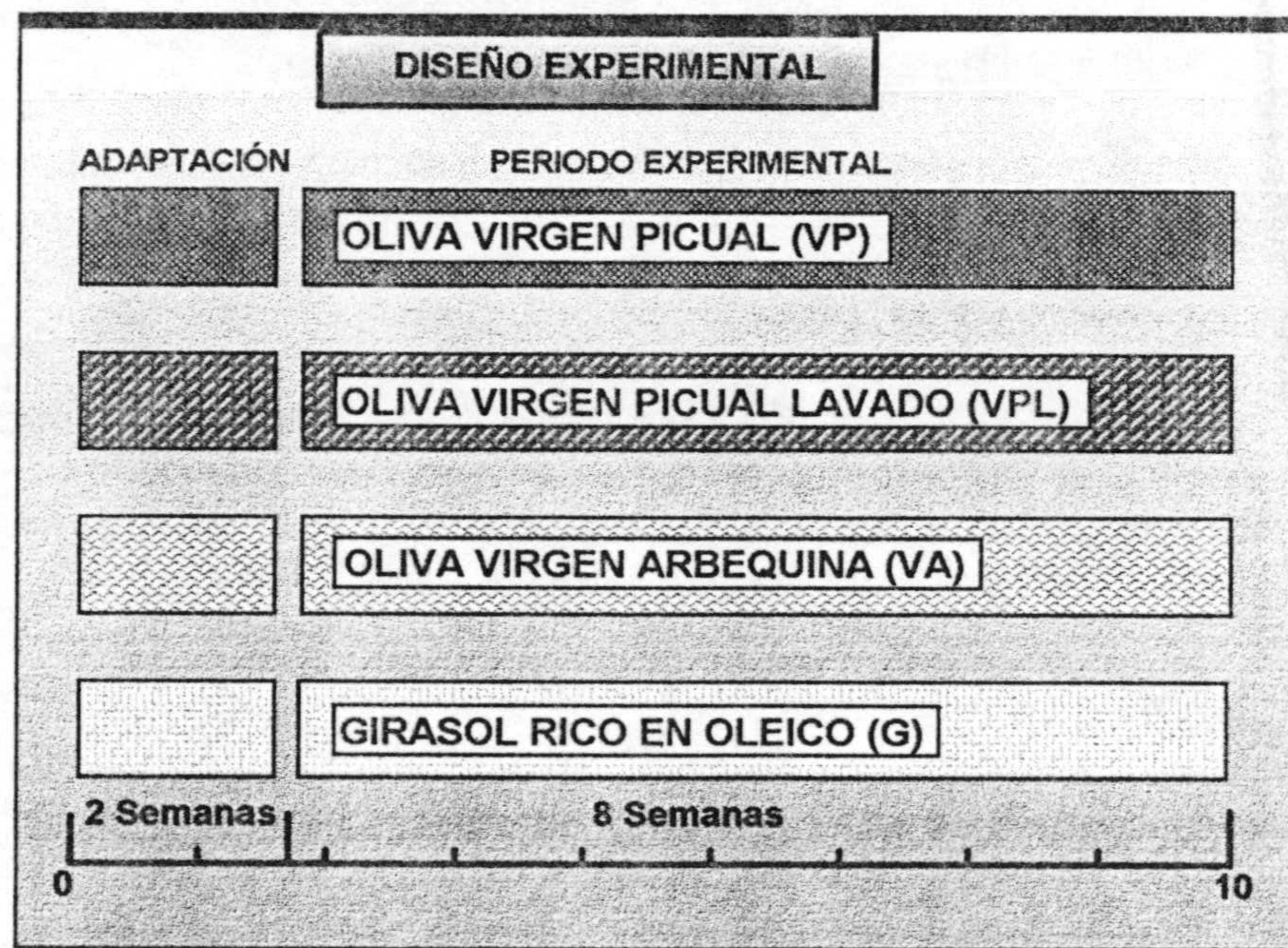


Figura 2.- Diseño experimental.

variedad de aceite de oliva virgen, la variedad Arbequina, con un contenido bajo en polifenoles y medio en tocoferoles.



**Aceite de girasol rico en oleico (G):** En este último grupo se empleó una variedad de aceite de girasol con un alto contenido en ácido oleico.

Las dos primeras semanas del estudio fueron de adaptación para de los distintos grupos de animales a su correspondiente dieta experimental, con la finalidad de conseguir una homogeneidad de los pesos y una ingesta similar en los cuatro grupos de estudio.

Tras las dos semanas de adaptación, los cuatro grupos fueron mantenidos con su correspondiente dieta durante un periodo de 8 semanas (*figura 2*).

## **5.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS**

A las 8 semanas los animales fueron sacrificados mediante desangrado por canulación de la arteria carótida, previa anestesia con pentotal sódico administrada en vena marginal de la oreja.

Los órganos utilizados en el estudio fueron hígado y corazón, los cuales una vez extraídos son lavados en suero fisiológico, secados y pesados.

El hígado fue procesado el mismo día de la extracción, mientras que el corazón se envolvió en papel de aluminio y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesado.

## **6.- OBTENCIÓN DE PLASMA**

La sangre, inmediatamente tras su extracción, se centrifugó a  $1700 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga refrigerada de mesa Beckman modelo GS-6R (Beckman (Fullerton, CA, USA), el plasma extraído se repartió en viales eppendorf, congelándose a  $-80^{\circ}\text{C}$ , previo gaseado con nitrógeno, para su posterior análisis.

Diez ml de plasma fresco se utilizaron para el aislamiento de lipoproteínas plasmáticas.

## **7.- AISLAMIENTO Y DIÁLISIS DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

El aislamiento de las lipoproteínas se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad con un rotor vertical VTI 50, siguiendo el método descrito por *Chung et al.*(1980).

Reactivos:

- Solución de NaCl 0.15 M pH 7.4
- KBr



Se utilizaron 10 ml de plasma fresco. La densidad del plasma se determinó por pesada en una balanza de precisión, ajustándose la misma a 1.30 g/ml con KBr. La cantidad de KBr a añadir se calculó a partir de la siguiente fórmula.

$$M_{\text{KBr}} = \frac{V_0(D-D_0)}{1-(D \times 0.312)}$$

$V_0$ .- Volumen de plasma

$D_0$ .- Densidad del plasma

$D$ .- Densidad final de la solución plasmática

0.312.- Constante para el KBr

$M_{\text{KBr}}$ .- g de KBr

Posteriormente se le adicionaron 24 ml de NaCl 0.15 M, centrifugándose en ultracentrífuga con un rotor vertical VTI 50 a 242000 x g durante 2.5 h a 4° C, y recogiendo las tres fracciones (LDL, HDL y VLDL) con pipetas pasteur.

Para la diálisis se utilizaron membranas de 6 mm de diámetro interno, sumergiéndolas en 4 litros de una solución 0.15 M de NaCl a pH 7.6 durante toda la noche.

Las lipoproteínas aisladas y dializadas se repartieron en alícuotas que se congelaron a -80° C previamente gaseadas con nitrógeno.

## 8.- PROCESAMIENTO DE LOS ÓRGANOS Y OBTENCIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES CELULARES

El método utilizado para la obtención de mitocondrias es el de *Fleischer y col.* (1979).

Los órganos de estudio son resuspendidos en tampón de sacarosa en una relación 1.5/6 (p/v), pasados por una cuchilla automática (POLYTRON, modelo PT 10-35) para un mejor fraccionamiento de los mismos. Finalmente se homogenizan en un homogenizador automático, consistente en un póter con pistón de teflón, tras lo cual son centrifugados a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga J2-21, con un rotor JA-20.

El sobrenadante obtenido es filtrado para una mejor eliminación de la grasa y restos de tejido, y centrifugado a 8000 rpm durante 20 minutos, tras lo cual el pélet es retirado, mantenido en hielo picado y envuelto en papel de aluminio. El sobrenadante, obtenido en esta última centrifugación, es pasado a otro tubo y centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos; en esta centrifugación es el sobrenadante el que se mantiene en hielo picado y en



oscuridad, mientras que el pélet se une al pélet anterior, resuspendiéndose en 25 ml de tampón de sacarosa y centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos. El pélet obtenido en esta centrifugación representa la fracción mitocondrial, la cual es resuspendida en tampón de sacarosa, repartido en viales eppendorf y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio.

El sobrenadante separado es ahora cetrifugado en una ultracentrífuga (marca Beckman, modelo L8-M) a 105000 x g durante 45 minutos para obtener la fracción microsomal (pélet) y la citosólica (sobrenadante). Ambas fracciones son congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En el caso de hígado el tampón utilizado en la homogeneización y en la primera centrífuga es un tampón de sacarosa con albúmina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA).

## **9.- PARÁMETROS DETERMINADOS EN PLASMA Y LIPOPROTEÍNAS**

### **9.1.- Determinación de proteínas en LDL y HDL**

El método de *Bradford (1976)* fue el seguido para determinar la concentración proteica en LDL Y HDL, y está basado en la formación de un complejo de adsorción coloreado entre el azul Coomassie y los grupos aminos protonados residuales de las proteínas. El máximo de absorbancia de este complejo se encuentra a 595 nm.

El reactivo de Bradford, se preparó mediante la disolución de 100 mg de azul Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. Tras agitación durante 24 horas, protegido con papel de aluminio por ser fotosensible, se añadieron 100 ml de ácido ortofosfórico al 85% y agua bidestilada hasta completar un litro. Se agitó de nuevo y se filtró.

Para el cálculo de la concentración proteica se realizó una curva patrón a partir de la proteína albúmina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA) con las siguientes concentraciones por tubo: 1, 3, 5, 7, 10 y 15  $\mu\text{g}$ .

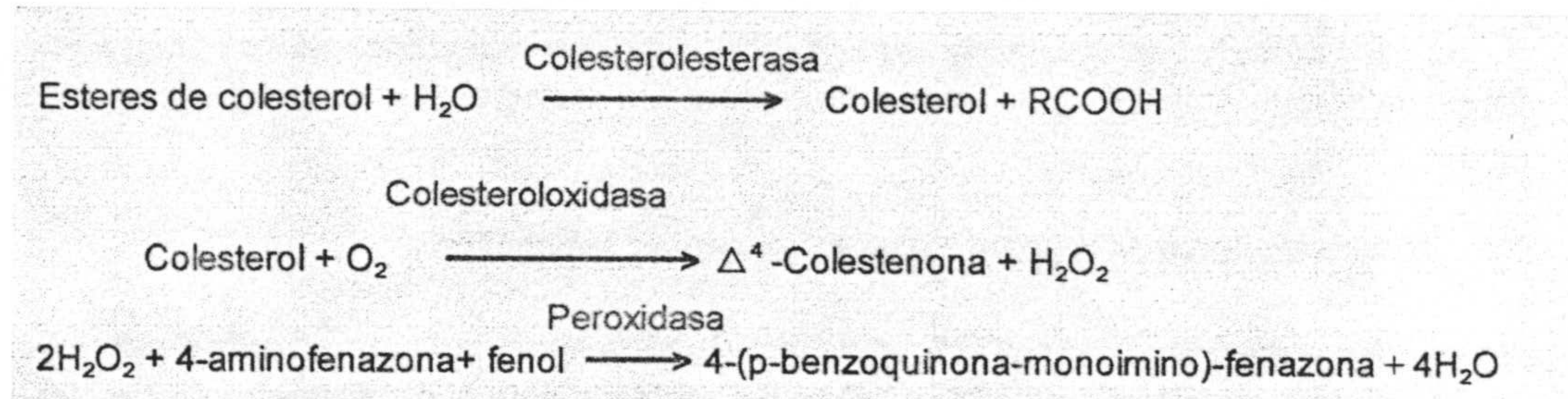
En un tubo de ensayo conteniendo 90  $\mu\text{l}$  de NaCl 0.15 M, se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de LDL y HDL y 1 ml de reactivo de Bradford, agitándose por inversión. Pasados 5 minutos se procedió a su lectura por espectrofotometría a 595 nm.

### **9.2.- Determinación de colesterol total en plasma, LDL y HDL**

Se empleó un kit comercial de la casa Boehringer, basado en reacciones enzimáticas-colorimétricas, según el método descrito por *Siedel et al. (1983)*, *Kattermann et al. (1984)* y *Trinder (1969)*.

Las reacciones que se suceden son las que se muestran en la *figura 3*.



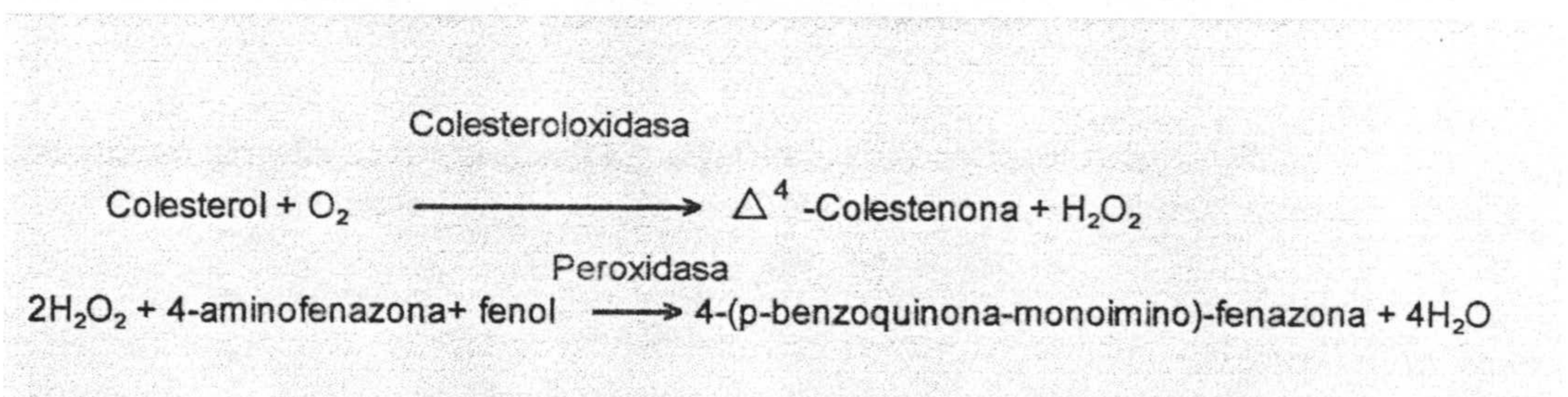


**Figura 3.-** Reacciones que tienen lugar en la determinación de colesterol total mediante kit

Se tomaron 120  $\mu\text{l}$  de LDL, 200  $\mu\text{l}$  de HDL y 40  $\mu\text{l}$  de plasma, se incubaron con el kit a 37° C durante 10 minutos y se determinó la absorbancia a 500 nm por espectrofotometría. Los valores de concentración fueron determinados por extrapolación en una recta patrón preparada a partir de una solución estándar de colesterol.

### 9.3.- Determinación de colesterol libre en plasma, LDL y HDL

Al igual que con el colesterol total, para determinar el libre se utilizó un kit comercial enzimático-colorimétrico descrito por *Stähler et al (1977)* y *Trinder (1969)*, basado en las reacciones que se muestran en la *figura 4*.



**Figura 4.-** Reacciones que tienen lugar en la determinación de colesterol libre mediante kit

Se emplearon 200  $\mu\text{l}$  de LDL y HDL y 40  $\mu\text{l}$  de plasma para su determinación. La absorbancia fue medida a 500 nm y la concentración mediante curva patrón con soluciones estándar.

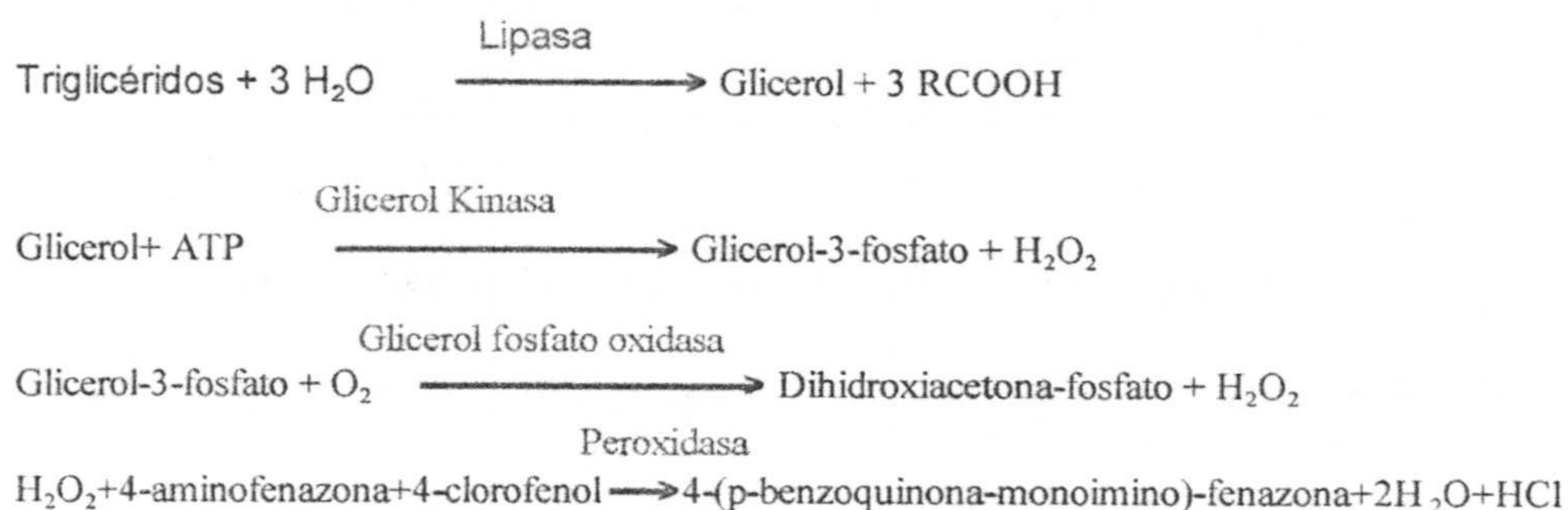


#### 9.4.- Determinación de colesterol esterificado en plasma, LDL y HDL

El cálculo de colesterol esterificado se obtuvo mediante diferencia entre el colesterol total y libre, calculados mediante kit comerciales como se ha descrito anteriormente.

#### 9.5.- Determinación de triglicéridos en plasma, LDL y HDL

Se empleó un kit comercial enzimático-colorimétrico de la casa Boehringer, basado en el método de *Bermeyer (1974)* y consistente en una hidrólisis enzimática de los triglicéridos y posterior determinación del glicerol formado (reacción colorimétrica). Las reacciones que tiene lugar se muestran en la *figura 5*.



**Figura 5.-** Reacciones que tienen lugar en la determinación de triglicéridos mediante kit

Se adicionaron al reactivo 200  $\mu\text{l}$  de LDL y HDL y 40  $\mu\text{l}$  de plasma, incubándose a 25° C durante 10 minutos, tras los cuales se midió su absorbancia a 500 nm.

Para el cálculo de concentraciones se utilizó una curva patrón realizada a partir de soluciones estándar.

#### 9.6.- Determinación de coenzima Q en plasma

La determinación de coenzima  $\text{Q}_9$  y  $\text{Q}_{10}$  se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, siguiendo el método de *Litarru, et al (1991)*.

Para la extracción previa, se parte de 0.5 ml de plasma, los cuales son mezclados con 0.5 ml de laurilsulfato sódico al 2%, 2 ml de solución de etanol:isopropanol (95:5) y 5 ml de hexano; la mezcla es agitada vigorosamente y centrifugada a 1000-1500 rpm durante 10 minutos. La fase de hexano es retirada, adicionándose al tubo primitivo otros



5 ml de hexano y repitiéndose la centrifugación y extracción posterior.

Ambas fases de hexano son desecadas bajo corriente de nitrógeno y resuspendidas en 100  $\mu$ l de la fase móvil utilizada, pinchándose 20  $\mu$ l de esta resuspensión en el HPLC y consiguiéndose así la separación cromatográfica del coenzima Q.

El instrumento utilizado fue un Beckman Gold System, equipado con un detector Diode Array 168 y una columna Spherisorb S5 ODS I de 18 x 0.46 cm, con precolumna de igual relleno que la columna principal.

La fase móvil empleada ha sido etanol:agua (97:3), siendo la velocidad de flujo de 1 ml/minuto y la duración del método de 10 minutos.

Las concentraciones fueron determinadas mediante una curva patrón realizada a partir de estándares puros, pinchados a concentraciones cada vez mayores.

#### **9.7.- Determinación de retinol y $\alpha$ -tocoferol en plasma, LDL y HDL**

El método seguido para la determinación de estas vitaminas liposolubles con carácter antioxidante es el de *Thurnham et al. (1988)*, mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

Para la extracción o separación previa de estas vitaminas, se partió de una alícuota de 300  $\mu$ l de plasma y 500  $\mu$ l de LDL y de HDL. A estas alícuotas se le adicionaron 0.25 ml de estándar interno, 0.25 ml de etanol y 5 ml de heptano. La mezcla es agitada fuertemente durante un minuto, con la finalidad de conseguir una adecuada mezcla.

A continuación se centrifuga a 300 rpm durante 10 minutos. La fase superior (fase lipídica) es extraída con pipetas pasteur y llevada a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Durante el proceso y con el fin de evitar pérdidas de estas vitaminas, los tubos son protegidos de la luz con papel de aluminio.

Una vez obtenido el extracto seco, es inmediatamente resuspendido en 700  $\mu$ l de la fase móvil utilizada. De esta solución son pinchados 200  $\mu$ l en HPLC, determinándose simultáneamente retinol y  $\alpha$ -tocoferol.

El instrumento utilizado fue una Beckman Gold System, equipado con un Diode Array 168 y un inyector automático Waters 717 Plus.

La columna fue una Lichrocart Superspher 100, de 250 x 4 mm, el flujo de 1.5 ml/min y el tiempo del método de 10 minutos.



La fase móvil empleada era una mezcla metanol:acetonitrilo:cloroformo (45:45:10).

El retinol fue detectado a una longitud de onda de 325 nm y el tocoferol a 295 nm.

La cuantificación de las concentraciones de estas vitaminas se realizó mediante curvas patrón con estándares puros, pinchados en concentraciones cada vez mayores y cuya concentración fue determinada por espectrofotometría, utilizando sus correspondientes coeficientes de extinción molar.

### 9.8.- Perfil lipídico en plasma, LDL y HDL

La extracción de los ácidos grasos de las muestras se ha realizado siguiendo el método de *Lepage y Roy (1986)*, método que nos permite realizar al mismo tiempo una metilación y transesterificación de los ácidos grasos de la muestra.

A 200 µl de plasma, 100 µl de LDL y 150 µl de HDL, se le adicionan 2 ml de la

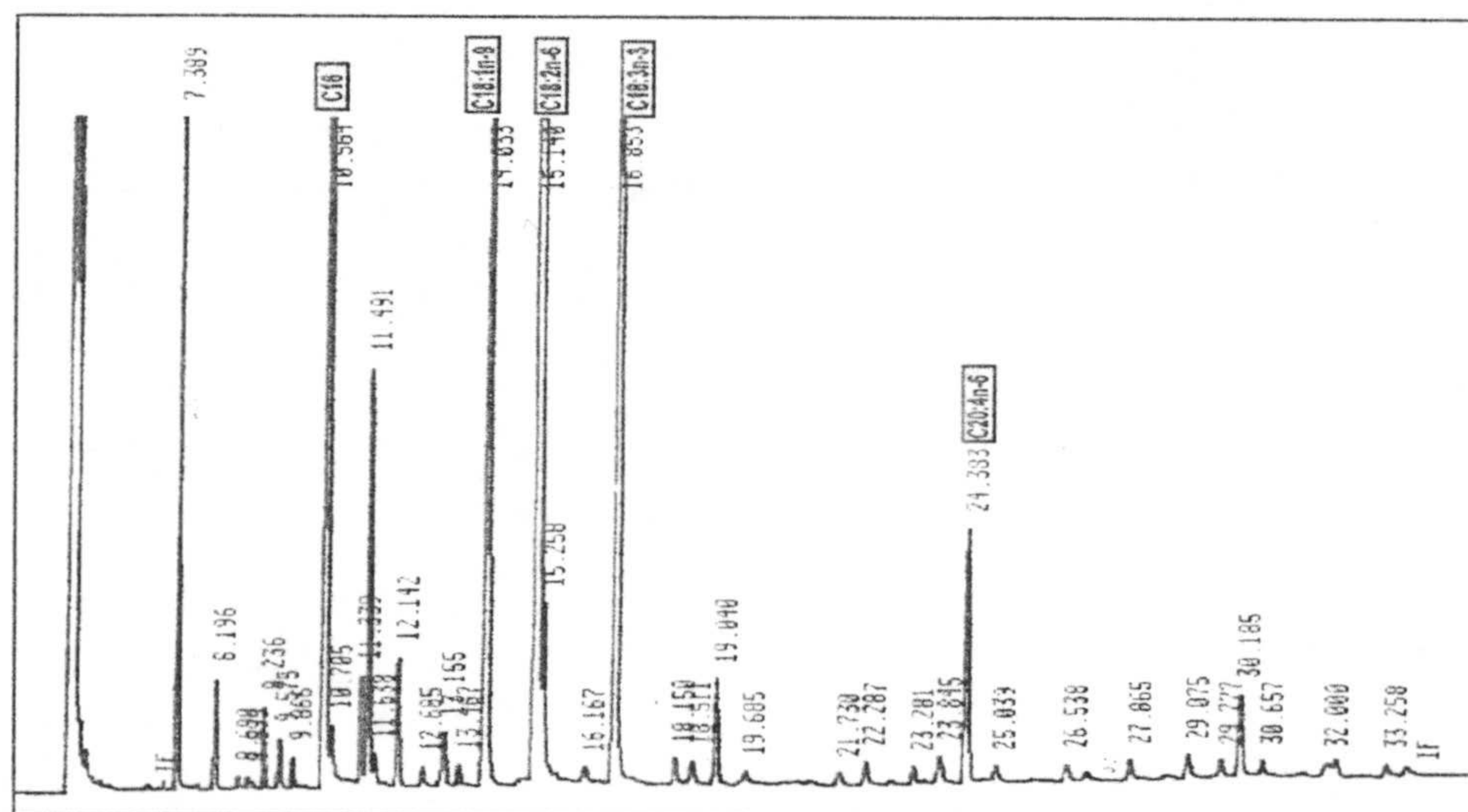


Figura 6.- Perfil lipídico plasmático.

mezcla metanol:benceno (4:1) y se agita vigorosamente. A continuación 200 µl de cloruro de acetilo, se agita e incuba los tubos cerrados herméticamente en un baño a 100° C durante una hora.

Tras el enfriamiento de los tubos a temperatura ambiente se le adicionan 2 ml de carbonato potásico al 6%. Se agitan y centrifugan a 1700 x g durante 10 minutos. De las tres fases que se obtienen, extraemos la fase superior bencénica (es en la que se encuentran



los esteres metílicos de los ácidos grasos). Se seca esta fase bajo corriente de nitrógeno, y el extracto seco resultante es resuspendido en 50  $\mu$ l de n-hexano, pinchando 1  $\mu$ l en el cromatógrafo de gases, para obtener la separación de los distintos ácidos grasos presentes en la muestra (figura 6).

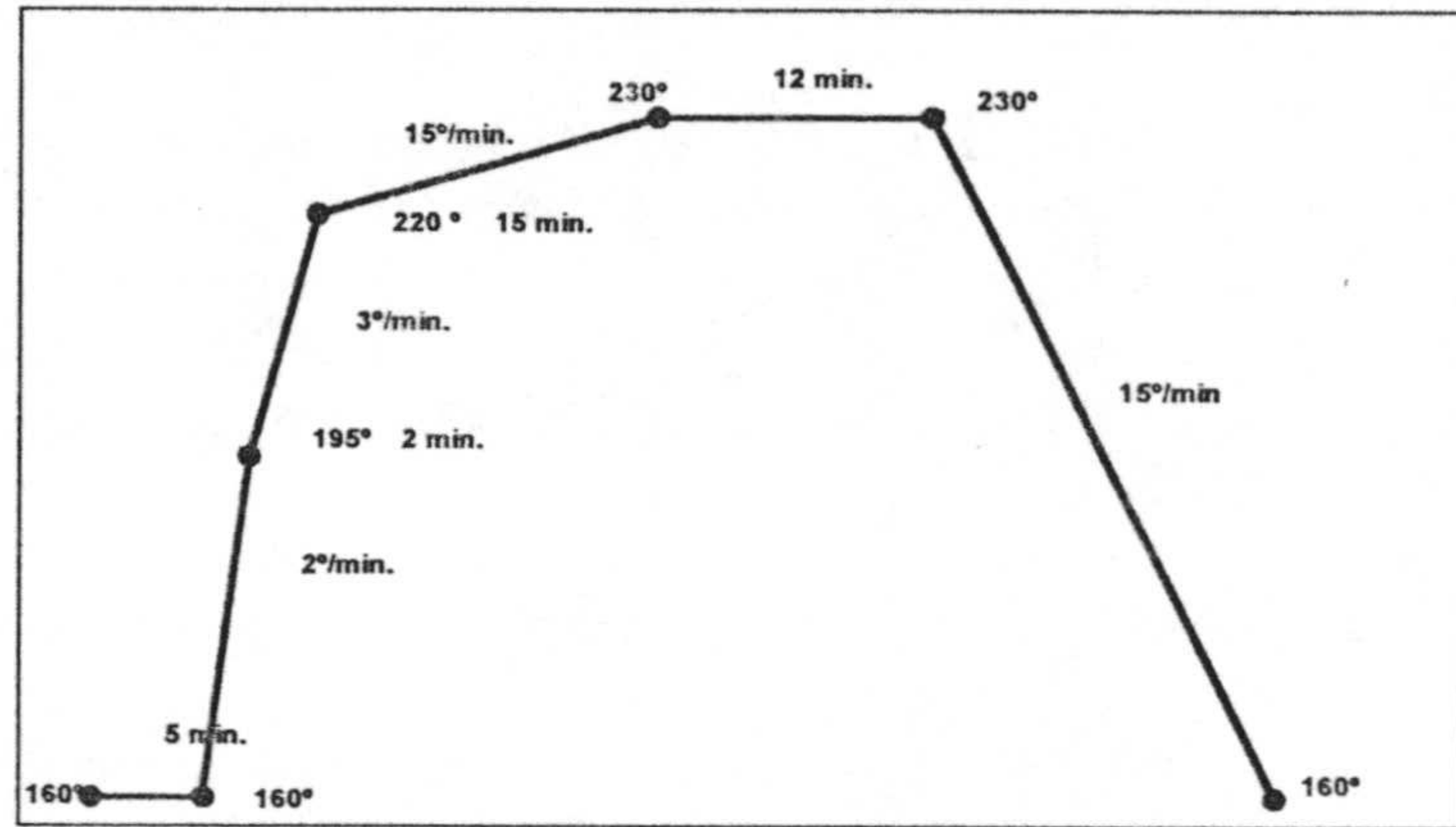


Figura 7.- Rampa de temperatura empleada para la separación de los distintos ácidos grasos

La duración del método en el cromatógrafo es de unos 50 minutos, presentando la rampa de temperatura mostrada en la figura 7.

El cromatógrafo de gases es un Hewlett Packard modelo 5890A, equipado con detector de ionización de llama, columna capilar fused silica SP-2330 de 60 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y 0.2  $\mu$ m de espesor de fase estacionaria, inyector automático Hewlett Packard 7673A y un integrador Hewlett Packard 3393A.

Se ha realizado la determinación cualitativa de los lípidos plasmáticos, por lo que los resultados han sido expresados como porcentaje del total de ácidos grasos detectados.

#### 9.9.- Determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma

Se ha empleado el método de Orrenius, S. et al. (1977), el cual se basa en la medición espectrofotométrica de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), es un método que aunque antiguo y no muy preciso o exacto, al ser de alta sensibilidad pero poca especificidad, se sigue hoy en día utilizando como un indicador aproximativo de los niveles de malondialdehído (MDA) presentes en las muestras y por lo tanto de los niveles de peroxidación lipídica de las muestras.

Se ha partido de 100  $\mu$ l de muestra, a los cuales se le ha adicionado 0.75 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y 0.75 ml de acético al 20 % (con el fin de precipitar las proteínas, durante la centrifugación). Se agitan e incuban a 100° C durante 15 minutos, tras lo cual son centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos.

La reacción MDA-TBA da lugar a una pigmentación rojiza que se lee



espectrofotométricamente a 532 nm.

## **10.- DETERMINACIONES EN MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS DE HÍGADO Y CORAZÓN**

### **10.1.- Determinación cuantitativa de la proteína total**

La cuantificación del contenido proteico de las distintas fracciones celulares (mitocondrias, microsomas y citosol), ha sido realizado utilizando el método de Lowry et al. (1951),

Se parte de 5 µl de muestra, a la cual se adiciona 5 ml de reactivo de Biuret, se agita y se espera 15 minutos, tras los cuales se le adicionan 0.5 ml de reactivo de Folin, se agita y espera 20 minutos, manteniendo los tubos en oscuridad. La reacción es leída a una absorbancia de 640 nm.

Para el cálculo de concentración existente se ha utilizado una curva patrón preparada con albúmina sérica.

### **10.2.- Determinación de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico**

Se ha utilizado el mismo método empleado en plasma (Orrenius, S. et, al., 1977). Partiendo igualmente de 100 µl de muestra.

### **10.3.- Cuantificación del nivel de hidroperóxidos existente en membranas**

La cuantificación de hidroperóxidos en mitocondrias y microsomas ha sido llevada a cabo utilizando el método de *Jiang et al. (1992)* con ligeras modificaciones. La técnica está basada en la rápida formación de hidroperóxidos mediado por la oxidación de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  en medio ácido. El  $Fe^{3+}$  forma un cromóforo con el xilenol orange que absorbe a 560 nm.

Se emplea el reactivo de Fox, el cual está compuesto por ácido sulfúrico 250 mM, BHT, xilenol orange, amoniosulfato amónico ferroso y metanol. El reactivo se protege de la luz, almacenándose en una botella oscura.

Se llevan a cabo dos determinaciones:

a.- Una primera determinación basal (T0), permite conocer el nivel de hidroperóxidos existente en las muestras. Para ello se adiciona a la muestra 0.9 ml de Fox/ml de volumen final, se espera 60 minutos (manteniendo la muestra en oscuridad) y



se lee en espectrofotómetro a 560 nm.

b.- Una segunda determinación (T1) en la cual se induce la peroxidación mediante la adición de AAPH (2,2'azobis amidinopropano), compuesto hidrosoluble que genera radicales libres a una velocidad constante, y para ello se incuba la muestra y el AAPH a 37° C durante 30 minutos, se adiciona el Fox y tras 60 minutos se lee a 560 nm.

La concentración de hidroperóxidos, tanto basales como inducidos, se calcula mediante la aplicación de la ecuación de Lambert Beer, con un coeficiente de extinción molar de  $4,7 * 10^4 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ .

#### 10.4.- Perfil lipídico de membranas mitocondriales y microsomales

El método seguido ha sido el mismo que el empleado en plasma, es decir una extracción de los ácidos grasos mediante la técnica de *Lepage y Roy (1986)* y posterior separación cromatográfica en un cromatógrafo de gases.

Tanto los reactivos como las condiciones del método cromatográfico son idénticos, variando únicamente la cantidad de muestra de partida, que para mitocondrias y microsomas es de 100 µl.

#### 10.5.- Extracción lipídica para colesterol y fósforo de membrana mitocondriales y microsomales

Para extraer la fracción lipídica de las muestras se ha utilizado el método descrito por *Folch et al. (1957)*.

Se parte de un volumen equivalente a 2 mg de proteínas de las muestras, al cual se le ha adicionado 5 ml de ácido perclórico 0.3 N, agitando y centrifugando a 2500 x g durante 25 minutos a 4° C. Se elimina el sobrenadante y se adiciona 1 ml de la mezcla cloroformo:metanol:CIH (200:100:1), agitando varias veces durante 30 segundos con suavidad. A continuación se añade 3 ml de CIH 0.1N, centrifugando a 2500 x g durante 15 minutos.

De las tres fases obtenidas ( superior metanólica, intermedia proteica e inferior clorofórmica) es la inferior la que interesa, por lo que es retirada dicha fase y guardada a 0°C.

Para una extracción lo más completa posible se le adiciona a las dos fases restantes 0.75 ml de cloroformo volviendo a centrifugar, y extrayendo de nuevo la fase inferior que es guardada junto a la anterior.



Esta fase clorofórmica es llevada a sequedad bajo corriente de nitrógeno y posteriormente resuspendida en 400  $\mu$ l de cloroformo conteniendo BHT al 0.05% de donde se pasa finalmente a viales de vidrio cerrados herméticamente y se almacena a  $-80^{\circ}$  C.

#### **10.6.- Determinación de fósforo de fosfolípidos en membrana mitocondrial y microsomal**

Para esta determinación se ha partido del método de Fiske y Subbarow modificado por Bartlett (Bartlett, G.R., 1959), realizándose ligeras modificaciones. La modificación principal con respecto a la técnica original consiste en realizar la digestión mediante la utilización de autoclave y no mediante baños de arena a  $180^{\circ}$  durante 60 minutos.

Se parte de 50  $\mu$ l del extracto lipídico anterior, llevándolo a sequedad bajo nitrógeno para eliminar cualquier resto de disolvente orgánico del extracto e impedir que reaccione con la mezcla oxidante, lo que ocasionaría turbidez y falsos resultados.

Se adiciona 2 ml de agua bidestilada y 280  $\mu$ l de la mezcla oxidante (mezcla compuesta por  $K_2S_2O_8$ ,  $H_3BO_3$  y NaOH). Los tubos cerrados herméticamente se introducen en un autoclave a una temperatura de  $120^{\circ}$  C durante 30 minutos, tras los cuales se dejan enfriar hasta temperatura ambiente.

Una vez enfriados, se les adicionan 60  $\mu$ l de la solución reductora (ácido L-ascórbico, EDTA- $Na_2$  y ácido fórmico), se agitan, añadiéndose a los dos minutos 60  $\mu$ l de la solución reactiva (Tartrato de potasio-antimonio, heptamolibdato amónico y ácido sulfúrico). Se vuelve a agitar y a los 15 minutos se lee espectrofotométricamente a 882 nm.

Para los cálculos de concentraciones se parte de una curva patrón con una concentración final de 10  $\mu$ g/ml de fósforo molecular partiendo de  $KH_2PO_4$ . Los patrones son procesados de igual manera que la muestra y tan sólo se sustituye la mezcla oxidante por una mezcla de referencia ( $KHSO_4$ ,  $HBO_3$  y NaOH).

#### **10.7.- Determinación de colesterol en membrana mitocondrial y microsomal**

Se realizó por un método enzimático de acuerdo a la técnica de *Röschlau et al.* (1974). La base de esta técnica es una reacción colorimétrica, en la que el colesterol en presencia de ácido sulfúrico concentrado y anhídrido acético sufre una deshidratación, condensación e isomerización, dando como resultado final la aparición de compuestos coloreados con un máximo de absorción a 625 nm.

Para la determinación se partió de una alícuota de la extracción lipídica anterior, 100  $\mu$ l, a la cual se adiciona 3 ml del reactivo, compuesto de 100 ml de anhídrido acético, previamente enfriado, al que se le adicionan lentamente 10 ml de ácido sulfúrico



concentrado, todo en frío y comprobando que al final la reacción no de color. La muestra con el reactivo es agitada y puesta en un baño a 25° C durante 15 minutos, al termino de los cuales se lee en el espectrofotómetro a 625 nm, llevándose a cabo las determinaciones por duplicado.

La concentración de colesterol existente en las membranas se calcula a partir de una recta patrón , preparada a partir de una solución patrón de colesterol de 1 mg/ml de cloroformo.

#### 10.8.- Determinación de fluidez de membrana mitocondrial por polarización de fluorescencia

El principio en el cual se basa la polarización de fluorescencia es el de que si una molécula fluorescente es excitada por la luz polarizada, tiene la posibilidad de reorientarse durante el periodo de duración de dicha excitación, siendo la orientación de la luz de fluorescencia emitida dependiente del grado de reajuste molecular.

El conocimiento del grado de polarización de fluorescencia de una molécula nos da información del grado de orden y de movilidad molecular del sistema en el que está insertada. El instrumento que nos permite evaluar este parámetro es un fluorímetro dotado de polarizador.

El instrumento utilizado es un Perkin Elmer LS 50, presentando dos componentes básicos, el componente excitador del polarizador y el de emisión.

La polarización es calculada según la ecuación siguiente:

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VHg}}{I_{VV} + I_{VHg}}$$

Donde P es la polarización,  $I_{VV}$  es la intensidad de la luz polarizada verticalmente paralela al plano de excitación,  $I_{VHg}$  es la intensidad de emisión de luz polarizada horizontalmente perpendicular al plano y g es un valor conocido ( $I_{VHg}/I_{VV}$ ) y que nos da el error del aparato.

A mayor P menor es la fluidez, es decir, una polarización alta indica un menor grado de incorporación de la sonda a la membrana y por lo tanto una menor fluidez de esta.

Hay que tener en cuenta dos aspectos:

a.- La polarización no varía con el tiempo, pero si se ve influencia por la



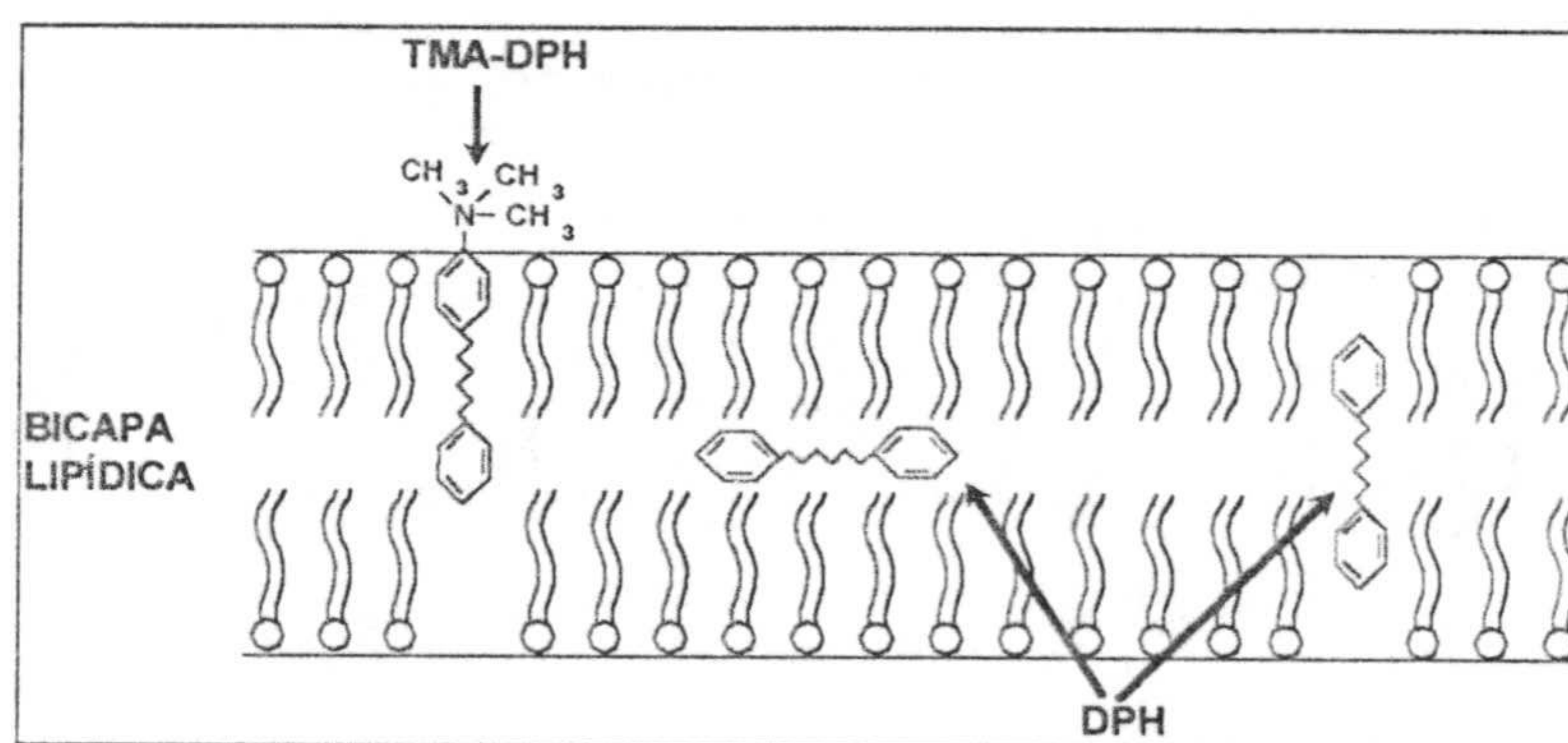
temperatura (la lectura se realiza a 37° C).

b.- Las membranas biológicas presentan una fluorescencia intrínseca debida básicamente, a la presencia de aminoácidos del tipo de tiroxina, fenilalanina y fundamentalmente triptófano. Para calcular esa fluorescencia propia se hace lo que se denomina "scattering inicial", que nos permite conocer la intensidad de fluorescencia presentada por la muestra antes de adicionar las sondas.

En este estudio se han utilizado dos sondas distintas:

- DPH.- Todo trans 1,6 difenil-1,3,5 hexatrieno
- TMA-DPH.- 1-(4-(trimetil amino fenil)-6)fenil 1,3,5 hexatrieno

Estas sondas se localizan o insertan en lugares distintos de la membrana en base a su carácter más o menos lipofílico (*figura 8*).



*Figura 8.*- Esquema de la incorporación de las sondas utilizadas en la membrana.

Para nuestras determinaciones se ha partido de 200 µg de proteína, a los que se añade tampón de sacarosa (del empleado para la resuspensión de mitocondrias en su aislamiento inicial) hasta llegar a un volumen de 2 ml. Se agita y se lleva a una cubeta de cuarzo especial para fluorescencia (ninguna de sus paredes es opaca, por lo que la lectura se realiza por todas ellas), y se lee la intensidad inicial ("scattering inicial").

A continuación se sacan las cubetas y se añaden 2 µl de la sonda (DPH o TMA-DPH), las cuales se encuentran a una concentración de 1 mM en tetrahidrofurano; se agita y se lee la intensidad con sonda.



Tras la lectura las cubetas son sacadas del fluorímetro, que siempre se mantiene a 37<sup>a</sup> C y se incuban en oscuridad durante 20 minutos a 25° C, con el fin de que la sonda se incorpore a la membrana. Al cabo del tiempo se lee el valor de P por triplicado.

#### **10.9.- Extracción y determinación de ubiquinonas y vitamina E por HPLC en mitocondrias y microsomas**

El método utilizado para la extracción de ubiquinonas (CoQ<sub>10</sub> y CoQ<sub>9</sub>) es el descrito por *Kroger (1978)*, mediante una mezcla de etanol:éter de petróleo (60:40). Una vez realizada la extracción son analizadas por HPLC según la técnica descrita por *Battino et al. (1990)*, paralelamente se ha conseguido extraer y cuantificar la vitamina E.

Se ha partido de 2 mg de proteína, esta proteína es llevada a 0.5 ml con agua bidestilada, se adicionan 2.5 ml de la mezcla etanol:éter de petróleo (60:40), la mezcla es agitada vigorosamente y centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C en una centrifuga de brazos oscilantes, para conseguir una perfecta separación y definición de las fases.

Se extrae la fase etérea superior y se guarda en frío; al tubo primitivo se le vuelve a adicionar 1 ml de éter de petróleo, volviéndose a agitar y centrifugar. La fase etérea extraída en esta segunda centrifugación es mezclada con la anterior y llevadas a sequedad bajo nitrógeno.

El extracto seco es resuspendido en 100 µl de la fase móvil a utilizar.

La separación cromatográfica es realizada mediante HPLC, usando para ello una columna Spherisorb S5 ODS I de 18 x 0.46 cm. El instrumento es el mismo utilizado en la cuantificación de ubiquinonas en plasma.

La fase móvil consiste en una mezcla etanol para HPLC: agua bidestilada (97:3), siendo la velocidad de flujo utilizada de 1 ml/min, y realizándose todas las determinaciones a 25°C.

La cuantificación de ubiquinonas y vitamina E ha sido llevada a cabo mediante extrapolación en curvas patrón preparadas con estándares puros.

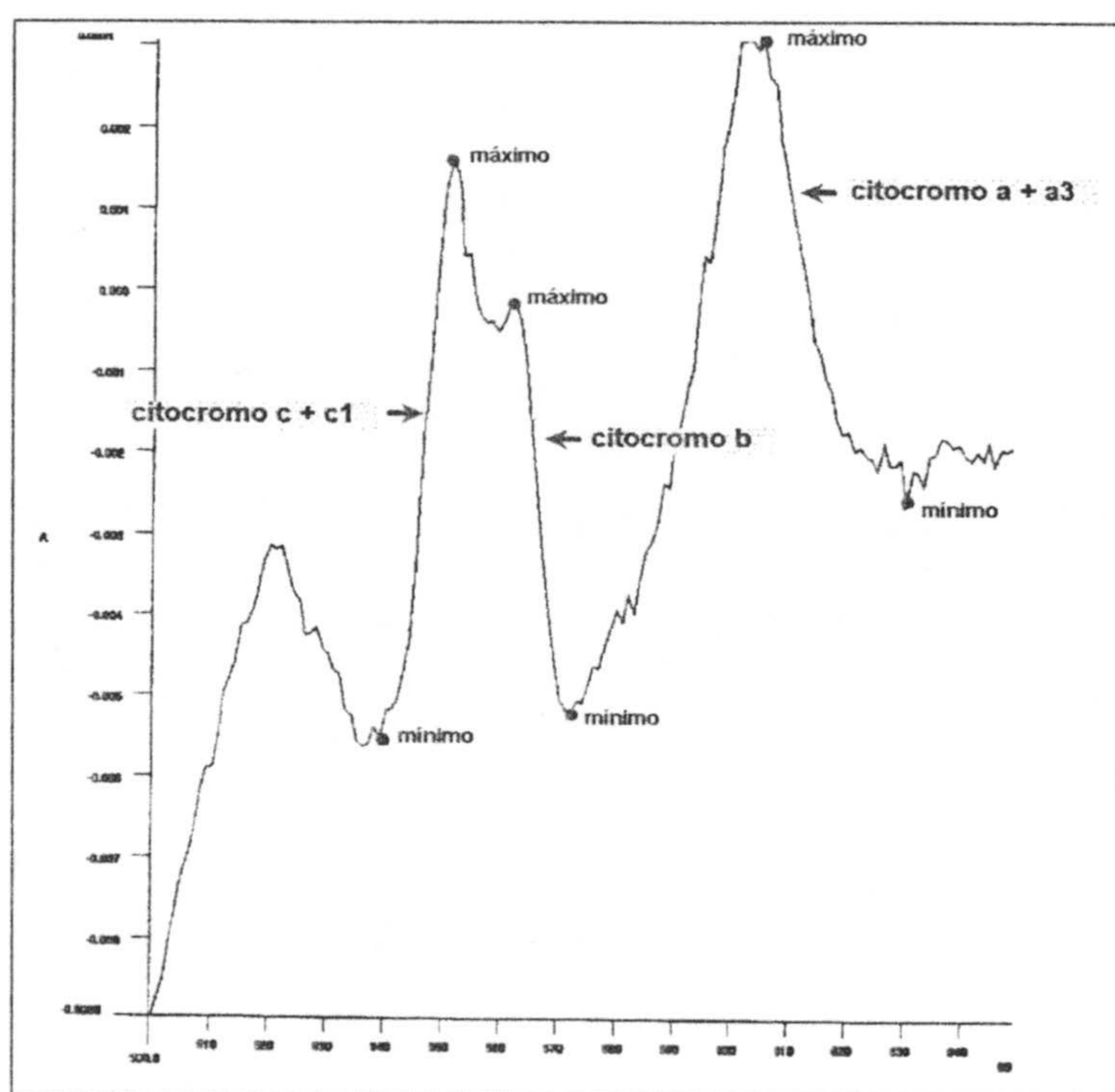
#### **10.10.- Cuantificación de los citocromos c + c<sub>1</sub>, b y a + a<sub>3</sub> en membranas mitocondriales mediante espectrofotometría diferencial**

El fundamento de esta técnica es la posibilidad de medir espectrofotométricamente el estado oxidado y reducido de los citocromos y posteriormente por diferencia entre estos dos estados se averigua la cantidad de citocromos que hay en una muestra de membrana



mitocondrial, aplicando para el cálculo de concentración la ecuación de Lambert Beer.

Se parte de un volumen de muestra que contiene 2 mg de proteína, a los que se añade 200  $\mu$ l de deoxicolato sódico al 10% (p/v) (se trata de un detergente que desintegra totalmente la membrana, con la finalidad de exponer los componentes de la cadena respiratoria a la acción de los reactivos), y se agita con cuidado intentando evitar la formación de espuma.



**Figura 9** .- Diferencia entre el escáner oxidado y el reducido de los citocromos estudiados.

tener cuidado con la cantidad de ditionito, ya que este desnaturaliza las proteínas y forma un gel en la cubeta. Se vuelve a realizar un escáner de la muestra reducida.

Se realiza la diferencia entre ambos escáner (reducido menos oxidado) y este resultado nos sirve para calcular por diferencia entre los máximos y los mínimos correspondientes las concentraciones de los distintos citocromos (figura 9).

Se añade tampón fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7 mM a pH 7.4) hasta completar un volumen final de 1.7 ml. Por último se adicionan 10  $\mu$ l de ferrocianuro potásico 20 mM que oxida totalmente los citocromos existentes en la muestra.

Se hace un barrido del contenido de la cubeta entre 650 y 550 nm.

Tras realizar el escáner de la muestra oxidada, se le añade a la cubeta ditionito sódico para reducir completamente los citocromos. Hay que



Los puntos que hay que leer para cada grupo de citocromos son:

- Absorbancia de los citocromos c + c<sub>1</sub>: A<sub>550</sub>-A<sub>540</sub> ( coeficiente de extinción molar 20 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ).
- Absorbancia del citocromo b: A<sub>561</sub>-A<sub>575</sub> (coeficiente de extinción molar 25 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ).
- Absorbancia del citocromo a + a<sub>3</sub>: A<sub>605</sub>-A<sub>630</sub> (coeficiente de extinción molar 24 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ).

#### 10.11.- Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa en membrana mitocondrial

Mediante un método espectrofotométrico, se ha determinado la actividad del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, es decir la actividad de la citocromo oxidasa.

La temperatura de trabajo es de 25° C y se ha empleado un tampón compuesto por Tris 10 mM, ClK 50mM y EDTA 1 mM, pH 7.4, al que se adiciona 0.3 mg/ml de antimicina A (antibiótico que bloquea la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo III).

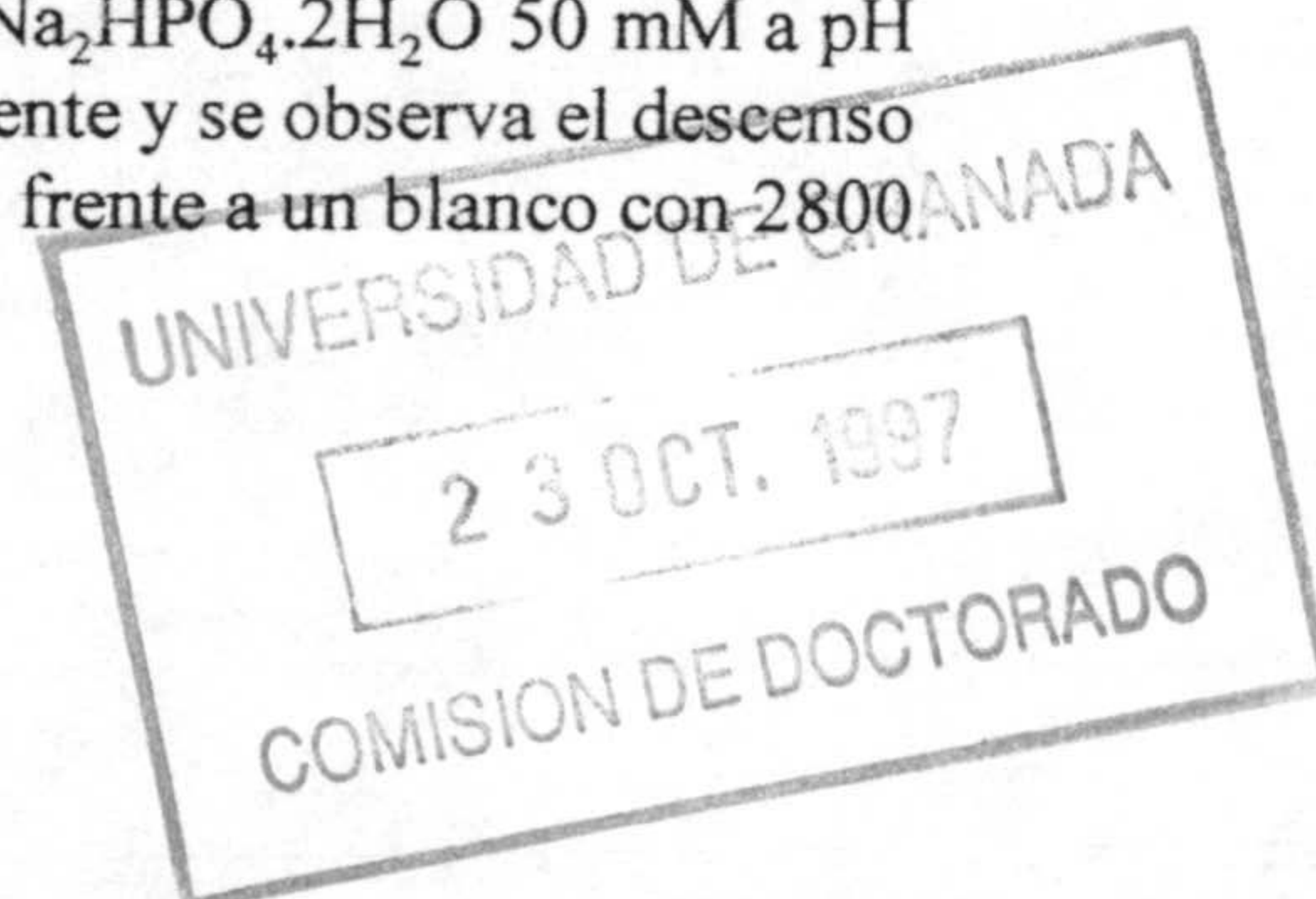
La actividad de este complejo se ha evaluado utilizando como sustrato un citocromo c reducido con ditionito sódico y purificado en una columna Sephadex G-25 (*Degli Esposti, M. Y Lena, G., 1982*), y monitorizando la disminución de absorbancia del citocromo c reducido por oxidación a 550 nm.

### 11.- DETERMINACIONES EN CITOSOL DE HÍGADO Y CORAZÓN

#### 11.1.- Determinación de la actividad de la catalasa

La técnica utilizada sigue el método descrito por *Hugo Aebi (1974)*. Este método se basa en un seguimiento de la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para dar H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> mediante espectrofotometría a 240 nm como consecuencia de la actividad catalítica de la catalasa.

Para esta determinación en una cubeta de cuarzo de 3 ml se adicionan 200 µl de una dilución del citosol en agua bidestilada (50:950), a los que se añaden 1800 µl de tampón fosfato 50 mM (compuesto por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 50 mM a pH 7.0). Se adicionan 1000 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM, se agita rápidamente y se observa el descenso de absorbancia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm durante un minuto a 20°C, frente a un blanco con 2800 µl de tampón fosfato y 200 µl de la dilución de citosol.





Para el cálculo de las unidades se recomienda el uso de una constante de reacción de 1<sup>er</sup> orden (K) ya que este es el tipo de reacción seguida por la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con concentraciones relativamente bajas de sustrato. Esto se debe a que no se puede medir la actividad enzimática a través de la saturación, debido a la formación de complejos inactivos a las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de saturación.

### **11.2.- Determinación de la actividad de la superoxido dismutasa (SOD)**

Se ha utilizado la técnica de *Fridovich et al.* ligeramente modificada. El método está basado en la inhibición que ejerce la SOD sobre la reducción del citocromo c medida espectrofotométricamente a 550 nm.

El citocromo c se reduce en presencia de anión superoxido, por lo cual se crea "in vitro" un sistema productor de anión superoxido, el sistema xantina-xantina oxidasa, y se observa como la SOD compite con el citocromo c por este anión superoxido a través de un descenso en la producción de citocromo c reducido.

Las lecturas se realizaron a 25 °C, monitorizando la formación de citocromo c reducido durante un periodo de 2 minutos a 550 nm.

Lo primero es crear un patrón de reducción del citocromo c, para lo cual en una cubeta de 1 ml se mezclan 100 µl de solución de citocromo c 0.1 M en tampón sin azida, 100 µl de xantina 0.0005 M en tampón sin azida y 650 µl de tampón carbonato/bicarbonato (compuesto por Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02 M y NaHCO<sub>3</sub> 0.02M ajustado a pH 10. A continuación se le añade EDTA 0.001M y azida sódica 0.1 mM (con el fin de inhibir peroxidasas, sin que se afecte la SOD)), y posteriormente se adiciona una cantidad de xantina-oxidasa suficiente para obtener una reducción de citocromo c de 0.025 a 0.05 unidades de absorbancia por minuto.

Una vez determinada la cantidad de xantina-oxidasa necesaria, se procedió a la determinación de la actividad SOD de las muestras, para lo cual en una cubeta de 1 ml se adicionan 100 µl de solución de citocromo c, 100 µl de solución de xantina, 650 µl de tampón carbonato/bicarbonato y 10 µl de citosol. La reacción se dispara con la adición de la cantidad de xantina-oxidasa determinada anteriormente. Se monitoriza el descenso en la absorbancia de citocromo c reducido a 550 nm durante 2 minutos.

Los resultados se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Una unidad de actividad corresponde a una inhibición del 50% de la reducción del citocromo c.

### **11.3.- Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX)**

Se ha seguido la técnica descrita por *Flohe et al (1984)*. El método se fundamenta



en la formación instantánea de glutatión oxidado durante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa que continuamente es reducido por un exceso de glutatión reductasa activa y NADPH presentes en la cubeta. La consecuente oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> es monitorizada fotométricamente a 340 nm y a 37° C.

La reacción que interesa es la parte enzimática (interviene la glutatión peroxidasa) dependiente de hidroperóxidos, por lo que hay que eliminar la independiente de hidroperóxidos y la reacción no enzimática (no interviene la glutatión peroxidasa).

Para la citada determinación se mezclan 700 µl de tampón fosfato potásico 0.1 M a pH 7.0 (al tampón se le adicionó EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM), 100 µl de glutatión reductasa (2.4 U/ml en tampón sin azida), 100 µl de NADPH 10 mM en una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 0.1%, 100 µl de glutatión reducido 10 mM en tampón sin azida y 5 µl de una dilución 90:10 (agua:citosol) de citosol de hígado o 20 µl de citosol de corazón.

Se incuba a 37° C durante 3 minutos, tras los cuales se trasladan a una cubeta de 1 ml y se adicionan 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12 mM, que dispara la reacción, monitorizando el descenso de NADPH a 340 nm durante 5 minutos en presencia de un blanco con igual contenido salvo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El descenso no enzimático se elimina haciendo otra lectura en la que la muestra es reemplazada por tampón y la lectura se realiza frente a un blanco sin muestra ni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, monitorizándose igual que en el caso anterior. El valor obtenido en esta determinación se resta al obtenido en la determinación anterior obteniéndose así el descenso enzimático dependiente de peróxido que es el que interesa. El resultado se expresa en unidades de actividad/ mg de proteína.

#### 11.4.- Determinación de la actividad de la glutatión reductasa (GR)

Se utilizó el método descrito por *Carlberg et al. (1985)*. El principio de este método es similar al anterior, pero en esta actividad se ha partido de un exceso de glutatión oxidado que es reducido por la glutatión reductasa presente en la muestra con la consecuente oxidación de NADPH, la cual es monitorizada a 340 nm.

Esta reacción es fundamental para mantener los niveles de glutatión reducido en el organismo, el cual es un importante agente reductor.

Para la determinación se utilizaron 50 µl de citosol, adicionando 2875 µl de tampón fosfato potásico 0.2 M a pH 7.0 (se le adicionó al tampón EDTA 2mM y azida sódica 1mM) y 50 µl de NADPH 2 mM en TRIS/CIH 10 mM y pH 7.0. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 minutos.



Tras la incubación se pasaron a una cubeta y se le adicionó 100  $\mu$ l de glutatión oxidado 20 mM en tampón sin azida, el cual disparó la reacción monitorizando la oxidación de NADPH a 340 nm durante 3 minutos a 37° C.

La actividad específica de la glutatión reductasa se expresa como unidades de actividad/mg de proteína. Una unidad de actividad se define como la proporción de enzima que cataliza la reducción de un  $\mu$ M de NADPH por minuto.

## **12.- EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO REALIZADO**

Las determinaciones , en general, han sido realizadas por duplicado, dando como valor la media de las dos determinaciones. A su vez se ha realizado un tratamiento estadístico básico en cada uno de los grupos y parámetros, por los que los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media para cada grupo y parámetro estudiado.

Para averiguar la existencia o no de diferencias significativas entre grupos se le ha aplicado un análisis de la varianza (ONEWAY), conjuntamente con un test *post hoc*, el test de Duncan, con un grado de significación del 95%.

Todo el tratamiento estadístico se ha realizado con el paquete informático SPSS/PC para windows, versión 6.1, en español.



*CAPITULO IV*

---

RESULTADOS





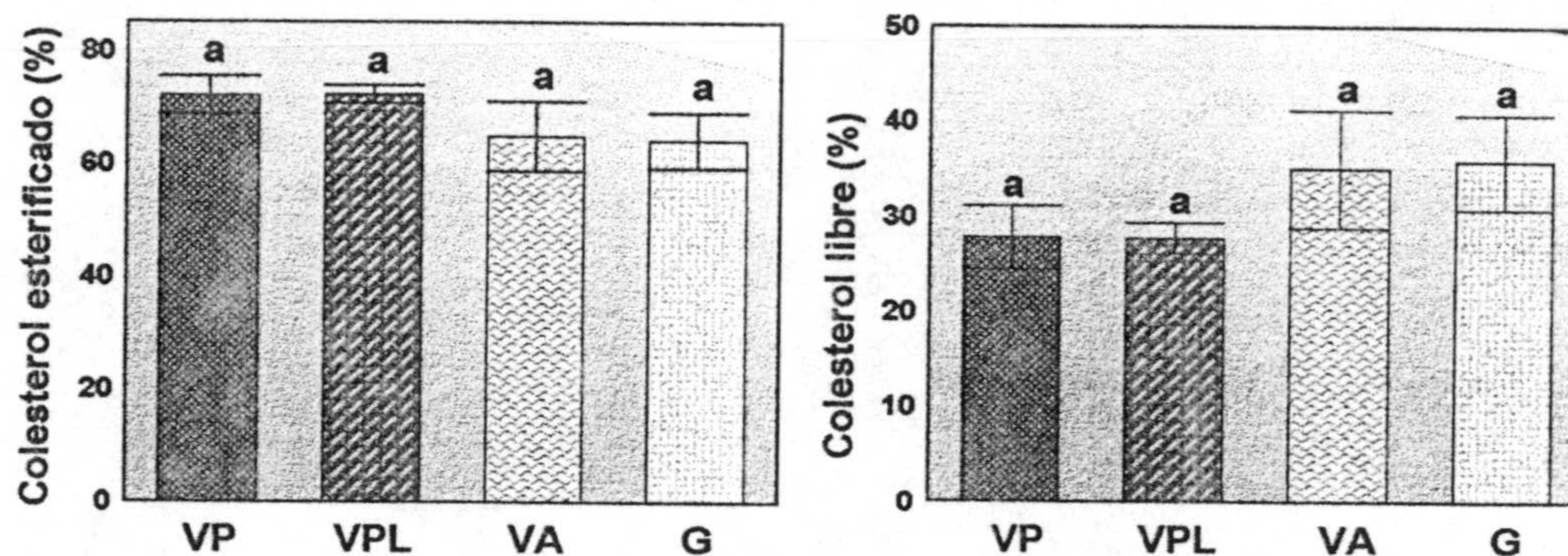


## 1.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN PLASMA

### 1.1.- Colesterol plasmático

Como se muestra en la *tabla 1*, los valores de colesterol total plasmático más altos son los obtenidos en los animales de los grupos oliva virgen variedad Picual (VP) y oliva virgen variedad Picual lavado (VPL), siendo estos valores significativamente superiores a los obtenidos en el grupo girasol rico en oleico (G), presentando este un valor inferior al 50% del obtenido en los grupos VP y VPL.

Los animales del grupo G también son los que presenta el valor más inferior para los niveles de colesterol libre y esterificado, aunque en este caso es el grupo VPL y el grupo oliva virgen variedad Arbequina (VA) los que presentan los valores superiores (*tabla 1*), mostrando ambos grupos diferencias estadísticamente significativas con el grupo G.



*Figura 1.*- Niveles de colesterol plasmático libre y esterificado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuando los valores de colesterol plasmático libre y esterificado, son expresados como porcentaje del total de colesterol plasmático existente (*figura 1*), no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos estudiados.

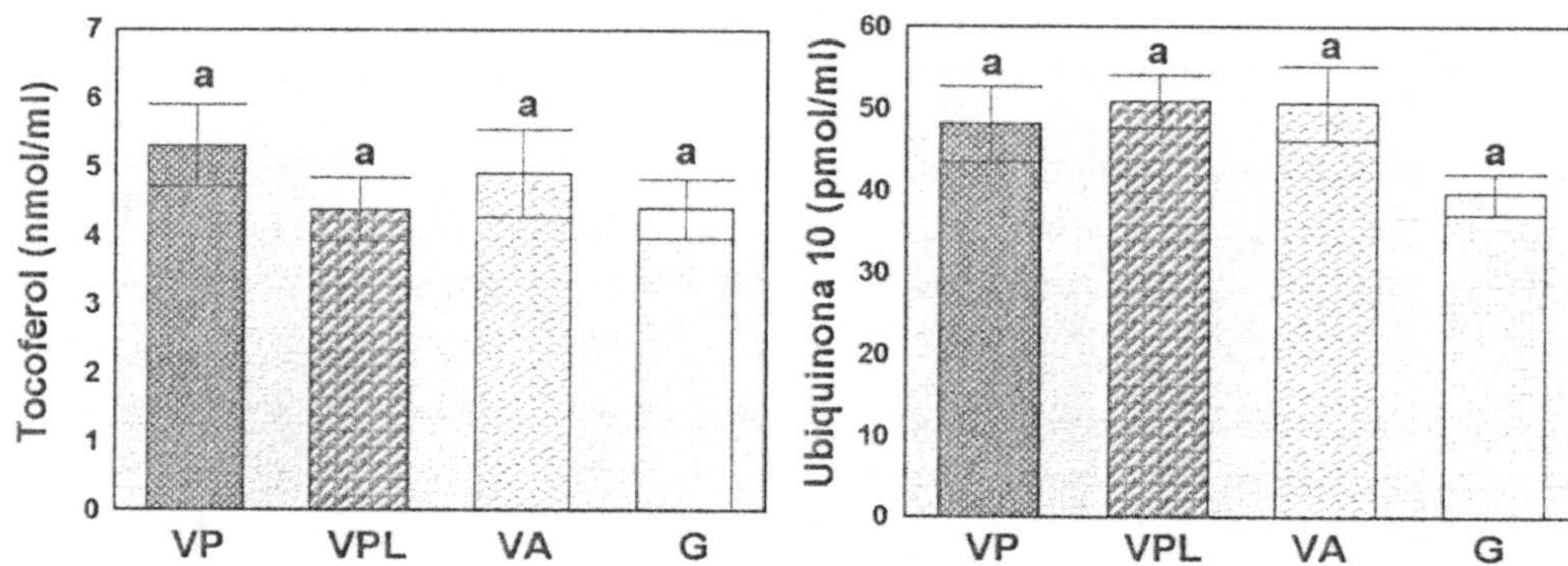
### 1.2.- Valores de triglicéridos plasmáticos

Los valores obtenidos para este parámetro son mostrados en la *tabla 1*, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Se observa que el máximo valor es el alcanzado por los animales del grupo VP y el mínimo por el grupo VPL.



### 1.3.- Contenido plasmático de $\alpha$ -tocoferol, ubiquinona 10 y retinol

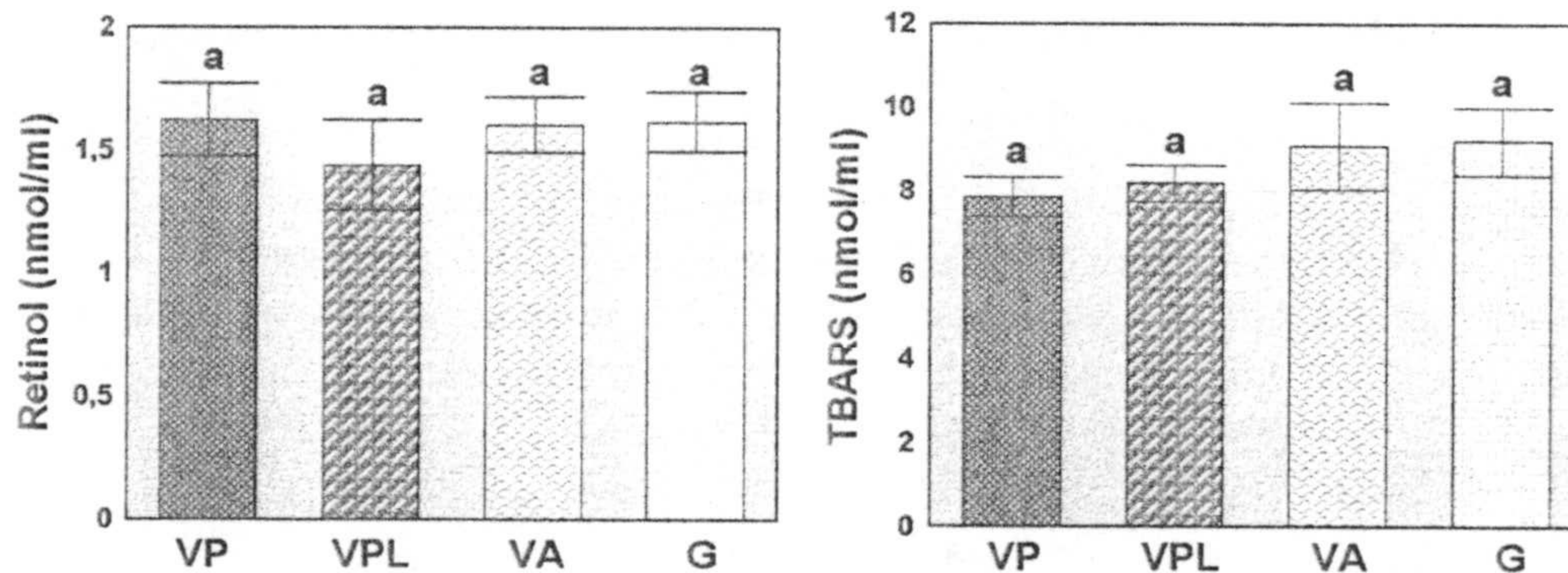
En la *tabla 1* y *figuras 2 y 3* se encuentran los valores obtenidos para estos tres parámetros, observándose en todos los casos valores muy similares entre ellos no existiendo por lo tanto diferencias estadísticamente significativas. En el caso de la ubiquinona 10 es donde se observa una mayor diferencia de valores entre el grupo G y los tres restantes.



**Figura 2.-** Niveles de tocoferol y ubiquinona 10 plasmáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 1.4.- Nivel de TBARS plasmáticos

En la *figura 3* y *tabla 1* están presentados los valores obtenidos para TBARS (sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico), no se observan diferencias



**Figura 3.-** Niveles de retinol y TBARS plasmáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



*Tabla 1.-* Media  $\pm$  E.E.M. de los parámetros analizados en plasma. La aparición de letras no coincidentes en la misma fila indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

		PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>Colesterol total</i>	mg/100 ml	132,50 $\pm$ 18,32 a	138,07 $\pm$ 14,36 a	109,34 $\pm$ 20,12ab	62,23 $\pm$ 8,16 b
<i>Colesterol libre</i>	mg/100 ml	29,64 $\pm$ 3,41 ab	35,28 $\pm$ 4,98 b	40,77 $\pm$ 6,63 b	20,67 $\pm$ 3,06 a
<i>Colesterol esterificado</i>	mg/100 ml	80,12 $\pm$ 13,30 a	92,01 $\pm$ 12,80 b	84,08 $\pm$ 22,83 b	35,95 $\pm$ 5,54 a
<i>Trigliceridos</i>	mg/100 ml	60,05 $\pm$ 9,37 a	47,15 $\pm$ 3,99 a	54,75 $\pm$ 5,05 a	56,03 $\pm$ 6,36 a
<i>Tocoferol</i>	nmol/ml	5,32 $\pm$ 0,60 a	4,39 $\pm$ 0,46 a	4,92 $\pm$ 0,64 a	4,41 $\pm$ 0,43 a
<i>Ubiquinona 10</i>	pmol/ml	48,30 $\pm$ 4,63 a	51,03 $\pm$ 3,22 a	50,83 $\pm$ 4,56 a	39,73 $\pm$ 2,55 a
<i>Retinol</i>	nmol/ml	1,62 $\pm$ 0,15 a	1,44 $\pm$ 0,18 a	1,61 $\pm$ 0,11 a	1,62 $\pm$ 0,12 a
<i>TBARS</i>	nmol/ml	7,88 $\pm$ 0,47 a	8,20 $\pm$ 0,44 a	9,10 $\pm$ 1,03 a	9,21 $\pm$ 0,81 a



estadísticamente significativas entre ninguno de los cuatro grupos de estudio, aunque si se observa valores ligeramente superiores en los animales de los grupos VA y G, sobre todo en este último, con respecto a los grupos VP y VPL.

### 1.5.- Perfil lipídico en plasma

En las *tablas 2 y 3*, se muestra el perfil lipídico obtenido en plasma así como los índices grasos más relevantes.

#### a.- Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados mayoritarios son el C16 y el C18, mientras que el resto de ácidos grasos saturados encontrados, C14, C22 y C24 están en mucha menor proporción que los anteriores, no superando apenas el 1% del total de ácidos grasos estudiados (*tabla 2*).

Los dos ácidos grasos saturados mayoritarios presentan una tendencia similar, observándose en ambos que el máximo valor se encuentra en el grupo G, existiendo diferencias estadísticamente significativas en el caso del C16 entre este grupo y los grupos VP y VPL y en el caso del C18 con los grupos VP y VA.

Los otros ácidos grasos saturados presentan comportamientos diferentes entre sí; así el C14 presenta su máximo, al igual que los anteriores, en el grupo G, encontrándose el mínimo valor en el grupo VPL.

El C22 muestra valores similares en todos los grupos al igual que sucede en el caso del C24, sin que existan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ellos.

El índice graso correspondiente al grupo de ácidos grasos saturados (AGS) (*tabla 3*), mantiene la tendencia presentada por los dos ácidos grasos más importantes, alcanzado el máximo valor en el grupo G, presentando este grupo diferencias estadísticamente significativas con los grupo VP y VPL.

#### b.- Ácidos grasos insaturados

##### b.1.- Ácidos grasos monoinsaturados

De este grupo, como se muestra en la *tabla 2*, se han analizado el C16:1n-9, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:1n-7, C22:1n-9 y C24:1n-9 (*tabla 2*), de los cuales el mayoritario es el C18:1n-9, superando el 45% del total de ácidos grasos analizados.

Tanto el C16:1n-9 como el C18:1n-9 obtienen su máximo valor en los grupos VP



y VPL, existiendo diferencias significativas en el caso del C16:1n-9 entre el grupo VP y los grupos VA y G y para el C18:1n-9 entre los grupos VP y VPL con los grupos VA y G.

El C16:1n-7, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, mientras que el C18:1n-7 muestra el valor más alto en el grupo VA con diferencias significativas con los tres grupos restantes; el C22:1n-9 lo presenta en el grupo G con diferencias significativas respecto a los tres restantes y por último el C24:1n-9 en el grupo VPL con diferencias significativas respecto a los grupos VA y G.

El índice correspondiente a los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) (*tabla 3*), presenta, como es lógico en base al resultado obtenido para el ácido graso mayoritario de este grupo, los valores máximos en los grupos VP y VPL, presentando ambos, diferencias significativas con el grupo G.

#### b.2.- Ácidos grasos poliinsaturados

Dentro de este grupo se han encontrado el C18:2n-6, C20:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C:18:4n-9, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, C22:5n-6, C22:5n-3 y C22:6n-3 (*tabla 2*).

El C18:2n-6 se encuentra entre el 10% y el 20% del total de ácidos grasos analizados, y tanto este ácido graso como el C20:2n-6 muestran su valor más alto en el grupo G, presentando diferencias estadísticamente significativas con los grupos VP y VPL en el caso del C18:2n-6 y con el grupo VPL en el caso de C20:2n-6.

El índice ácidos grasos diinsaturados (AGD) (*tabla 3*), refleja lo observado para el ácido graso mayoritario de este grupo de ácidos grasos, el grupo G presenta el máximo valor con diferencias significativas con los grupos VP y VPL. El grupo VA presenta diferencias significativas con el grupo VPL.

Igualmente el índice ácidos grasos diinsaturados - ácidos grasos monoinsaturados (AGD-AGM) vuelve a mostrar las diferencias mencionadas anteriormente (*tabla 3*).

En los restantes ácidos grasos poliinsaturados hay gran heterogeneidad respecto a las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Así en los ácidos grasos pertenecientes a la serie n-3, se observa para el C18:3n-3 valores máximos en los grupos VP y VA, presentando ambos diferencias significativas con los grupos VPL y G, mientras que para el C22:6n-3 el máximo valor se encuentra en el grupo G y el mínimo en el grupo VP; el C22:5n-3 no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo.

Los ácidos grasos C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:5n-6 y C22:4n-6, todos pertenecientes a la serie n-6, presentan su máximo valor en el grupo G, variando los grupos



con los que presenta diferencias significativas como se observa en la *tabla 2*.

Por último el c18:4n-9 no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo de estudio.

Respecto al resto de índices estudiados, se observa que el índice correspondiente a ácidos grasos insaturados (AGI) (*tabla 3*), presenta el valor más alto en los grupos VP y VPL con diferencias significativas con el grupo G.

El índice AGP (ácidos grasos poliinsaturados) muestra su máximo valor en el grupo G, con diferencias significativas con los grupos VP y VPL. Lo mismo sucede con los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 de más de 18 carbonos (AGP >18c(n-6)) y los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 (AGP (n-6)), aunque en este último también hay diferencias entre los grupos VPL y VA. En el índice ácidos grasos monoinsaturados-ácidos grasos poliinsaturados (AGM:AGP) (*tabla 3*) la relación se mantiene a la inversa siendo el grupo G el que menor valor presenta.

El índice correspondiente a los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (AGP (n-3)), presenta su máximo en el grupo VA, encontrándose diferencias significativas con los tres grupos restantes. Sin embargo el índice de ácidos grasos de la serie n-3 de más de 18 carbonos (AGP >18c(n-3)) no presenta diferencias significativas entre ninguno de los grupos de estudio.

Por último el índice indicativo del grado de insaturación (II), muestra un valor máximo en el grupo VP y mínimo en el grupo G existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

## **2.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN LIPOPROTEINAS**

### **2.1.- Niveles de colesterol en LDL y HDL**

Los niveles obtenidos para el colesterol en LDL se muestran en la *tabla 4* (expresados, como el resto de parámetros por mg de proteína). En esta tabla se observa que es el grupo VP el que presenta mayor valor de colesterol total, con diferencias estadísticamente significativas con los otros tres grupos restantes, a su vez en el grupo VA también existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo G. Esta situación también se observa en los datos obtenidos para colesterol libre y esterificado.

Sin embargo cuando se expresan estos dos parámetros como porcentajes del total de colesterol en LDL no se observan diferencias significativas entre los grupos de estudio, tal y como se muestra en la *figura 4*, observándose un mayor nivel de colesterol esterificado



Tabla 2.- Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos plasmáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,57 $\pm$ 0,04 ab	0,50 $\pm$ 0,02 a	0,64 $\pm$ 0,06 bc	0,73 $\pm$ 0,03 c
<i>C16</i>	19,48 $\pm$ 0,96 a	19,67 $\pm$ 0,36 a	21,23 $\pm$ 0,60 ab	22,01 $\pm$ 0,38 b
<i>C16:1n9</i>	0,87 $\pm$ 0,05 a	0,81 $\pm$ 0,11 ab	0,64 $\pm$ 0,04 b	0,67 $\pm$ 0,03 b
<i>C16:1n7</i>	2,29 $\pm$ 0,18 a	1,75 $\pm$ 0,15 a	2,47 $\pm$ 0,38 a	2,07 $\pm$ 0,30 a
<i>C18</i>	8,51 $\pm$ 0,38 a	9,26 $\pm$ 0,17 ab	8,76 $\pm$ 0,31 a	10,08 $\pm$ 0,47 b
<i>C18:1n9</i>	47,46 $\pm$ 1,79 a	48,12 $\pm$ 1,31 a	42,60 $\pm$ 1,53 b	39,15 $\pm$ 0,81 b
<i>C18:1n7</i>	1,47 $\pm$ 0,07 a	1,50 $\pm$ 0,05 a	1,87 $\pm$ 0,15 b	1,41 $\pm$ 0,06 a
<i>C18:2n6</i>	13,86 $\pm$ 0,73 ab	12,77 $\pm$ 0,81 a	15,72 $\pm$ 0,92 bc	17,64 $\pm$ 0,66 c
<i>C18:3n6</i>	0,29 $\pm$ 0,07 a	0,24 $\pm$ 0,04 a	0,18 $\pm$ 0,02 a	0,20 $\pm$ 0,02 a
<i>C18:3n3</i>	0,81 $\pm$ 0,05 a	0,57 $\pm$ 0,06 b	0,84 $\pm$ 0,03 a	0,58 $\pm$ 0,03 b
<i>C18:4n9</i>	0,26 $\pm$ 0,03 a	0,33 $\pm$ 0,02 a	0,31 $\pm$ 0,03 a	0,33 $\pm$ 0,01 a
<i>C20:2n6</i>	0,21 $\pm$ 0,02 ab	0,19 $\pm$ 0,01 a	0,21 $\pm$ 0,01 ab	0,22 $\pm$ 0,01 b
<i>C20:3n6</i>	0,24 $\pm$ 0,02 a	0,25 $\pm$ 0,04 a	0,28 $\pm$ 0,02 ab	0,34 $\pm$ 0,02 b
<i>C22</i>	0,34 $\pm$ 0,02 a	0,36 $\pm$ 0,03 a	0,34 $\pm$ 0,03 a	0,34 $\pm$ 0,03 a
<i>C20:4n6</i>	2,01 $\pm$ 0,15 a	2,06 $\pm$ 0,12 a	2,10 $\pm$ 0,08 a	2,47 $\pm$ 0,14 b
<i>C22:1n9</i>	0,23 $\pm$ 0,03 a	0,28 $\pm$ 0,01 ab	0,26 $\pm$ 0,04 a	0,36 $\pm$ 0,03 b
<i>C24</i>	0,26 $\pm$ 0,01 a	0,23 $\pm$ 0,01 a	0,23 $\pm$ 0,02 a	0,24 $\pm$ 0,01 a
<i>C22:4n6</i>	0,14 $\pm$ 0,02 a	0,17 $\pm$ 0,01 ab	0,18 $\pm$ 0,01 b	0,21 $\pm$ 0,01 c
<i>C24:1n9</i>	0,92 $\pm$ 0,06 ab	1,02 $\pm$ 0,08 a	0,87 $\pm$ 0,08 b	0,69 $\pm$ 0,07 b
<i>C22:5n6</i>	0,15 $\pm$ 0,01 a	0,15 $\pm$ 0,01 a	0,17 $\pm$ 0,01 a	0,23 $\pm$ 0,01 b
<i>C22:5n3</i>	0,23 $\pm$ 0,01 a	0,20 $\pm$ 0,01 a	0,22 $\pm$ 0,01 a	0,23 $\pm$ 0,01 a
<i>C22:6n3</i>	0,15 $\pm$ 0,02 a	0,22 $\pm$ 0,03 ab	0,18 $\pm$ 0,01 a	0,26 $\pm$ 0,01 b



*Tabla 3.-* Media  $\pm$  E.E.M. de los índices grasos más relevantes en plasma. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>AGS</i>	29,08 $\pm$ 1,12 a	29,99 $\pm$ 0,47 a	31,17 $\pm$ 0,80 ab	33,33 $\pm$ 0,55 b
<i>AGI</i>	70,92 $\pm$ 1,12 a	70,01 $\pm$ 0,47 a	68,83 $\pm$ 0,80 ab	66,67 $\pm$ 0,55 b
<i>AGM</i>	53,23 $\pm$ 1,85 a	53,40 $\pm$ 1,26 a	48,71 $\pm$ 1,54 ab	44,35 $\pm$ 1,17 b
<i>AGD</i>	13,97 $\pm$ 0,72 ab	12,86 $\pm$ 0,80 a	15,91 $\pm$ 0,92 bc	17,84 $\pm$ 0,66 c
<i>AGP</i>	17,69 $\pm$ 0,88 ab	16,61 $\pm$ 0,92 a	20,12 $\pm$ 0,98 bc	22,32 $\pm$ 0,83 c
<i>AGM:AGD</i>	3,93 $\pm$ 0,35 ab	4,37 $\pm$ 0,54 a	3,17 $\pm$ 0,26 bc	2,53 $\pm$ 0,17 c
<i>AGM:AGP</i>	3,85 $\pm$ 0,42 a	4,08 $\pm$ 0,58 a	2,95 $\pm$ 0,21 ab	2,35 $\pm$ 0,21 b
<i>AGP (n-6)</i>	16,62 $\pm$ 0,90 ab	15,53 $\pm$ 0,89 a	18,70 $\pm$ 1,00 bc	21,14 $\pm$ 0,79 c
<i>AGP (n-3)</i>	0,90 $\pm$ 0,09 a	0,79 $\pm$ 0,05 a	1,11 $\pm$ 0,07 b	0,90 $\pm$ 0,07 a
<i>AGP &gt; 18C (n-6)</i>	2,46 $\pm$ 0,18 a	2,55 $\pm$ 0,18 a	2,82 $\pm$ 0,09 a	3,30 $\pm$ 0,19 b
<i>AGP &gt; 18C (n-3)</i>	0,38 $\pm$ 0,03 a	0,29 $\pm$ 0,07 a	0,31 $\pm$ 0,07 a	0,32 $\pm$ 0,08 a
<i>II</i>	3,30 $\pm$ 0,15 a	3,12 $\pm$ 0,05 ab	3,12 $\pm$ 0,09 ab	2,93 $\pm$ 0,07 b



en los grupo VPL y G.

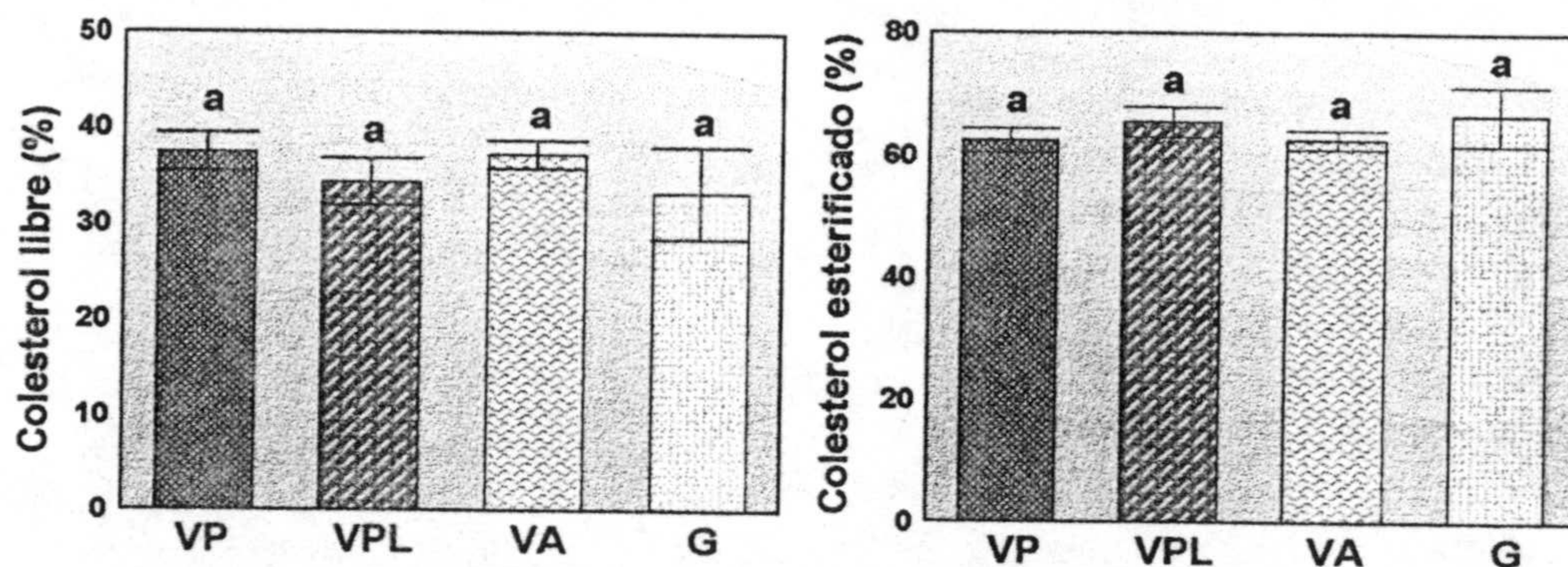


Figura 4.- Valores de colesterol libre y esterificado en LDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En el caso de las HDL es el grupo VPL junto al grupo VP los que presentan mayor concentración de colesterol total, libre y esterificado (tabla 5), siendo el grupo G, al igual que en las LDL, el que presenta un menor contenido en colesterol.

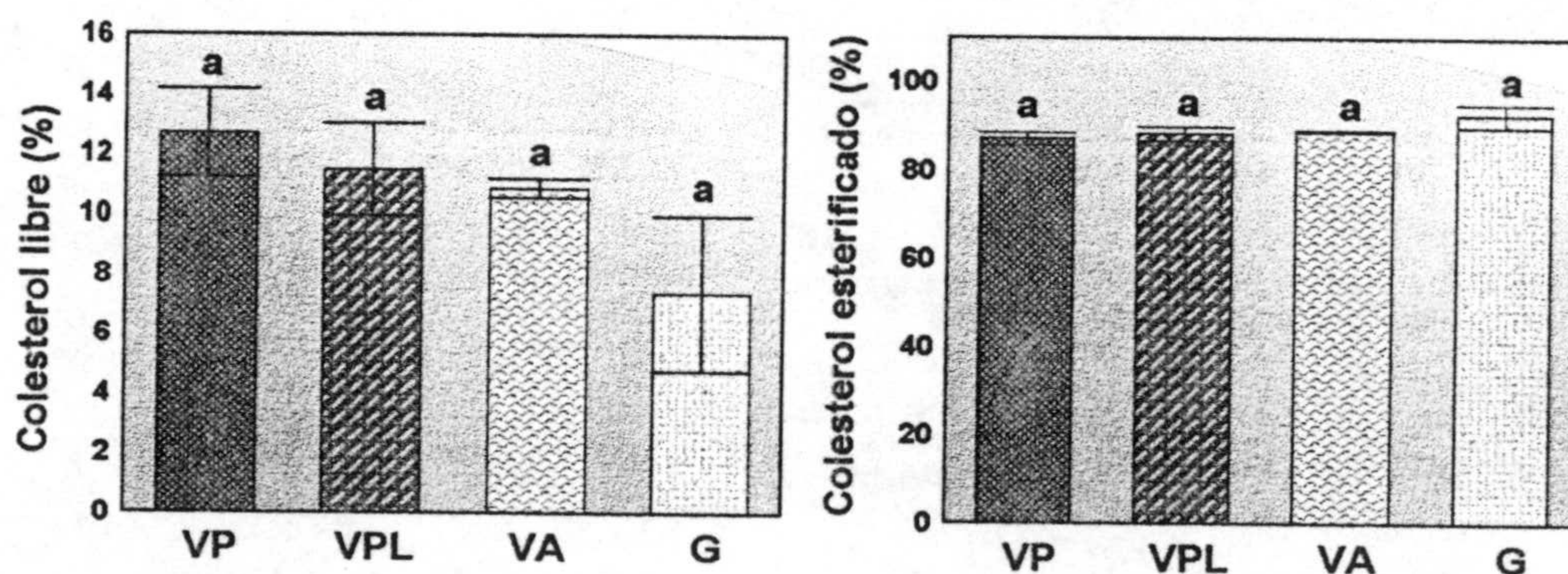


Figura 5.- Valores de colesterol libre y esterificado en HDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuando se expresa el colesterol esterificado y libre como porcentaje del colesterol total existente en HDL, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, tal y como se muestra en la figura 5. Sin embargo se observa un menor nivel de colesterol esterificado en los grupos de oliva y mayor para el libre, aunque como



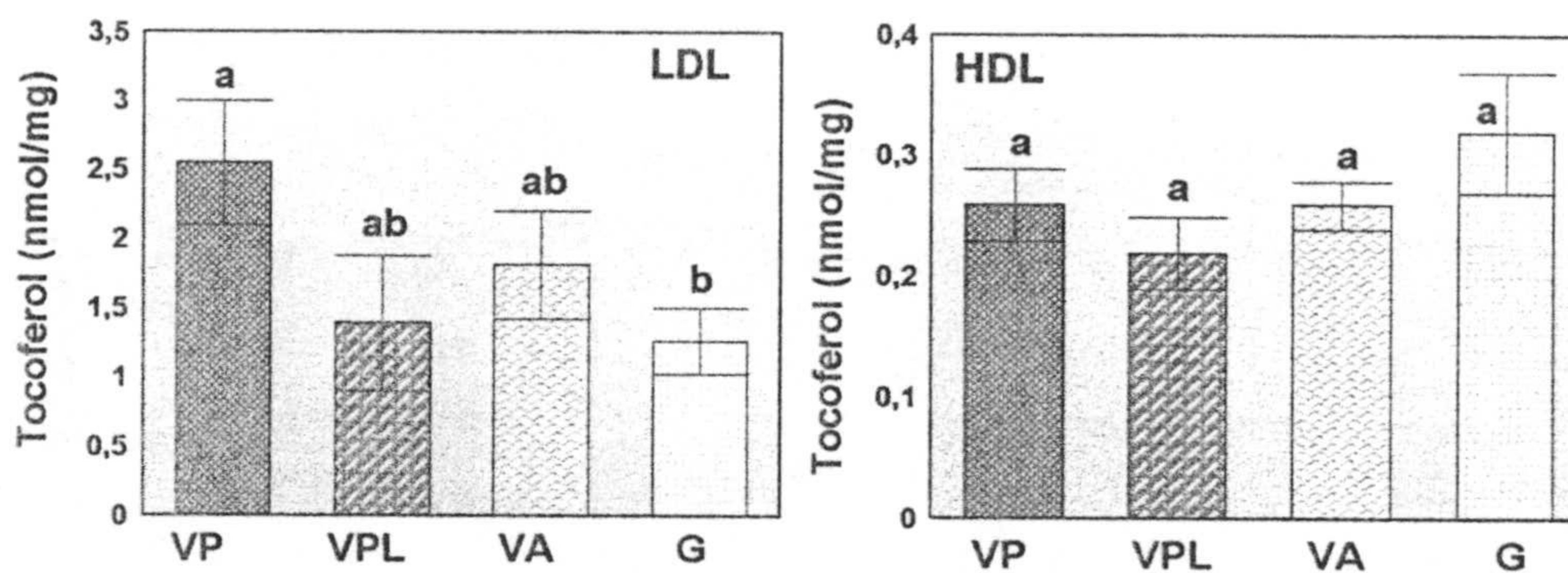
se ha dicho no existen diferencias significativas.

## 2.2.- Valores de triglicéridos en HDL y LDL

En la *tablas 4 y 5* se muestran los valores obtenidos para triglicéridos en LDL y HDL. En ambos tipos de lipoproteínas se observan mayores valores en los grupos VA y G, siendo el grupo VPL el que presenta un menor contenido en triglicéridos, con diferencias estadísticamente significativas con los tres grupos restantes en el caso de las LDL y con el grupo VA para las HDL.

## 2.3.- Contenido de $\alpha$ -tocoferol en LDL y HDL

En el caso de las LDL es el grupo VP el que presenta el mayor valor de tocoferol (*tabla 4 y figura 6*), presentando diferencias estadísticamente significativas con el grupo G.



**Figura 6** .- Niveles de  $\alpha$ -Tocoferol en LDL y HDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Para las HDL los valores no presentan diferencias significativas para este parámetro, aunque es el grupo G en este caso el que presenta un valor ligeramente superior a los otros tres (*tabla 5 y figura 6*).

## 2.4.- Perfil lipídico en LDL

El perfil lipídico en LDL y los índices grasos más importantes son mostrados en las *tablas 6 y 7*



**Tabla 4.-** Media  $\pm$  E.E.M. de los parámetros analizados en LDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

		PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>Colesterol total</i>	mg/mg	1,16 $\pm$ 0,08 a	0,44 $\pm$ 0,09 bc	0,55 $\pm$ 0,10 c	0,21 $\pm$ 0,05 b
<i>Colesterol libre</i>	mg/mg	0,43 $\pm$ 0,06 a	0,18 $\pm$ 0,07 b	0,23 $\pm$ 0,06 b	0,06 $\pm$ 0,02 b
<i>Colesterol esterificado</i>	mg/mg	0,70 $\pm$ 0,05 a	0,16 $\pm$ 0,01 bc	0,36 $\pm$ 0,09 c	0,13 $\pm$ 0,05 b
<i>Trigliceridos</i>	mg/mg	0,34 $\pm$ 0,02 a	0,15 $\pm$ 0,03 b	0,44 $\pm$ 0,06 a	0,37 $\pm$ 0,01 a
<i>Tocoferol</i>	nmol/mg	2,56 $\pm$ 0,45 a	1,40 $\pm$ 0,49 ab	1,82 $\pm$ 0,39 ab	1,27 $\pm$ 0,24 b
<i>Hidroperóxidos (To)</i>	nmol/mg	31,70 $\pm$ 2,77 a	29,57 $\pm$ 3,12 a	28,58 $\pm$ 3,95 a	28,81 $\pm$ 2,88 a
<i>Hidroperóxidos (TI)</i>	nmol/mg	67,06 $\pm$ 1,39 a	82,73 $\pm$ 2,51 b	88,86 $\pm$ 5,58 b	87,28 $\pm$ 2,68 b

**Tabla 5.-** Media  $\pm$  E.E.M. de los parámetros analizados en HDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

		PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>Colesterol total</i>	mg/mg	0,42 $\pm$ 0,04 a	0,50 $\pm$ 0,09 a	0,36 $\pm$ 0,03 ab	0,26 $\pm$ 0,05 b
<i>Colesterol libre</i>	mg/mg	0,06 $\pm$ 0,01 a	0,07 $\pm$ 0,01 a	0,04 $\pm$ 0,00 ab	0,02 $\pm$ 0,01 b
<i>Colesterol esterificado</i>	mg/mg	0,39 $\pm$ 0,07 a	0,48 $\pm$ 0,06 a	0,32 $\pm$ 0,03 ab	0,18 $\pm$ 0,07 b
<i>Trigliceridos</i>	mg/mg	0,13 $\pm$ 0,01 ab	0,10 $\pm$ 0,01 a	0,17 $\pm$ 0,01 b	0,20 $\pm$ 0,04 ab
<i>Tocoferol</i>	nmol/mg	0,26 $\pm$ 0,03 a	0,22 $\pm$ 0,03 a	0,26 $\pm$ 0,02 a	0,32 $\pm$ 0,05 a



a.- Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados mayoritarios, C16 y C18 (*tabla 6*), presenta su valor máximo en los animales del grupo G, al igual que se observa en plasma, presentando en el caso del C16 diferencias estadísticamente significativas con los tres grupos restantes y del C18 con el grupo VP.

Los ácidos C14 y C24 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de trabajo.

El índice AGS (*tabla 7*), alcanza su máximo valor en el grupo G, mostrando diferencias con los grupos VP y VPL.

b.- Ácidos grasos insaturados

b.1 .- Ácidos grasos monoinsaturados

El ácido graso mayoritario de este grupo, el C18:1n-9, presenta su máximo valor en los grupos VP y VPL, sobrepasando el 45% del total de ácidos grasos totales, mostrando diferencias significativas con el grupo G (*tabla 6*).

El C16:1n-9 también obtiene su máximo en estos dos grupos aunque en este caso las diferencias significativas aparecen con el grupo VA.

Los ácidos grasos de la serie n-7, presentan en ambos casos su máximo en el grupo VA, encontrándose en el caso del C16:1n-7 diferencias significativas con los grupos VP y G y para el C18:1n-7 con los grupos VP y VPL.

Por su parte el C22:1n-9 y el C24:1n-9 no muestran diferencias significativas entre los grupos.

El índice AGM (*tabla 7*), presenta el mínimo valor en el grupo G con diferencias significativas respecto a los otros tres grupos.

b.2.- Ácidos grasos poliinsaturados

El C18:2n-6, obtiene el valor más alto en el grupo G (*tabla 6*), encontrándose sólo diferencias significativas con el grupo VPL.

El C20:2n-6 no presenta diferencias significativas entre los grupos.

El índice AGD (*tabla 3*), refleja lo observado para el ácido graso mayoritario de



este grupo, con predominio en el grupo G y diferencias significativas con el grupo VPL.

La relación AGM:AGD, presenta sus valores más altos en los grupos VP y VPL, con diferencias significativas con el grupo G.

El resto de ácidos grasos poliinsaturados, como se observa en la *tabla 6*, no superan casi en ningún caso, salvo para el c20:4n-6, el 1% del total de ácidos grasos.

Así los ácidos grasos de la serie n-3, C18:3n-3 y C22:6n-3, presenta valores máximos en grupos distintos, así el C18:3n-3 lo muestra en los grupos VP y VA con diferencias significativas con los grupos VPL y G y el C22:6n-3 en el grupo G con diferencias significativas respecto al grupo VP.

Por su parte los ácidos grasos restantes de la serie n-6, C18:3n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6 y C22:5n-6, muestran que salvo para el último no existen diferencias significativas entre los grupos, aunque se observa un mayor valor para todos en el grupo G, el C22:5n-6 si presenta diferencias significativas entre los grupos VPL y G con los grupos VP y VA.

Por último el c18:4n-9 no muestra diferencias significativas entre los grupos.

Respecto al resto de índices estudiados, se observa en la *tabla 7* que el índice AGI encuentra su máximo valor en los grupos VP y VPL con diferencias significativas con el grupo G.

El índice AGP, lo encuentra en el grupo G con diferencias estadísticamente significativas con el grupo VPL., lo mismo se observa en el índice AGP (n-6), aunque no en el índice AGP>18c(n-6) donde no se han encontrado diferencias significativas.

La relación AGM-AGP, presenta el mínimo valor en el grupo G con diferencias significativas con los grupos VP y VPL.

Respecto a los índice correspondientes a la serie n-3, se observa en la *tabla 7* que el AGP (n-3) muestra sus máximos en los grupos VP y VA con diferencias significativas respecto al grupo VPL, mientras que el índice AGP >18c(n-3) no presenta diferencias significativas entre los grupos.

Por último el índice de insaturación (II), muestra el igual que en el plasma el valor más alto en el grupo VP y el mínimo en el grupo G, con diferencias significativas entre ellos.



**Tabla 6.-** Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos analizados en LDL. La aparición de letras no coincidentes en la misma fila indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,72 $\pm$ 0,12 a	0,83 $\pm$ 0,10 a	0,91 $\pm$ 0,16 a	1,15 $\pm$ 0,18 a
<i>C16</i>	20,65 $\pm$ 1,49 a	21,24 $\pm$ 0,89 a	22,57 $\pm$ 1,20 a	25,92 $\pm$ 1,10 b
<i>C16:1n9</i>	0,90 $\pm$ 0,05 a	0,90 $\pm$ 0,09 a	0,72 $\pm$ 0,04 b	0,83 $\pm$ 0,04 ab
<i>C16:1n7</i>	2,52 $\pm$ 0,15 a	1,68 $\pm$ 0,18 b	2,94 $\pm$ 0,34 a	1,83 $\pm$ 0,17 b
<i>C18</i>	9,25 $\pm$ 1,04 a	12,55 $\pm$ 0,80 ab	12,36 $\pm$ 1,14 ab	15,02 $\pm$ 1,39 b
<i>C18:1n9</i>	47,70 $\pm$ 2,27 a	46,78 $\pm$ 1,88 a	41,52 $\pm$ 2,07 ab	36,32 $\pm$ 2,14 b
<i>C18:1n7</i>	1,47 $\pm$ 0,12 a	1,35 $\pm$ 0,06 a	1,81 $\pm$ 0,12 b	1,51 $\pm$ 0,11 ab
<i>C18:2n6</i>	11,98 $\pm$ 0,86 ab	11,20 $\pm$ 0,82 a	12,90 $\pm$ 1,09 ab	14,69 $\pm$ 0,89 b
<i>C18:3n6</i>	0,19 $\pm$ 0,02 a	0,20 $\pm$ 0,02 a	0,21 $\pm$ 0,03 a	0,24 $\pm$ 0,03 a
<i>C18:3n3</i>	0,75 $\pm$ 0,02 a	0,57 $\pm$ 0,06 b	0,74 $\pm$ 0,04 a	0,59 $\pm$ 0,03 b
<i>C18:4n9</i>	0,27 $\pm$ 0,06 a	0,17 $\pm$ 0,03 a	0,22 $\pm$ 0,04 a	0,12 $\pm$ 0,01 a
<i>C20:2n6</i>	0,17 $\pm$ 0,01 a	0,17 $\pm$ 0,02 a	0,16 $\pm$ 0,01 a	0,14 $\pm$ 0,01 a
<i>C20:3n6</i>	0,19 $\pm$ 0,01 a	0,20 $\pm$ 0,02 a	0,25 $\pm$ 0,03 a	0,28 $\pm$ 0,06 a
<i>C20:4n6</i>	1,32 $\pm$ 0,10 a	1,30 $\pm$ 0,10 a	1,39 $\pm$ 0,09 a	1,59 $\pm$ 0,16 a
<i>C22:1n9</i>	0,07 $\pm$ 0,01 a	0,07 $\pm$ 0,01 a	0,09 $\pm$ 0,01 a	0,07 $\pm$ 0,01 a
<i>C24</i>	0,28 $\pm$ 0,02 a	0,25 $\pm$ 0,01 a	0,25 $\pm$ 0,02 a	0,29 $\pm$ 0,06 a
<i>C22:4n6</i>	0,10 $\pm$ 0,01 a	0,13 $\pm$ 0,01 a	0,12 $\pm$ 0,01 a	0,16 $\pm$ 0,07 a
<i>C24:1n9</i>	1,00 $\pm$ 0,10 a	0,90 $\pm$ 0,05 a	0,98 $\pm$ 0,07 a	0,90 $\pm$ 0,07 a
<i>C22:5n6</i>	0,14 $\pm$ 0,01 a	0,18 $\pm$ 0,01 b	0,13 $\pm$ 0,01 a	0,18 $\pm$ 0,01 b
<i>C22:6n3</i>	0,17 $\pm$ 0,05 a	0,23 $\pm$ 0,06 ab	0,21 $\pm$ 0,06 ab	0,39 $\pm$ 0,08 b



**Tabla 7 .-** Media  $\pm$  E.E.M. de los índices grasos más relevantes en LDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>AGS</i>	31,57 $\pm$ 2,66 a	34,88 $\pm$ 1,75 a	36,07 $\pm$ 2,45 ab	42,24 $\pm$ 2,28 b
<i>AGI</i>	68,43 $\pm$ 2,66 a	65,12 $\pm$ 1,75 a	63,93 $\pm$ 2,45 ab	57,76 $\pm$ 2,28 b
<i>AGM</i>	53,42 $\pm$ 2,81 a	51,43 $\pm$ 1,95 a	47,98 $\pm$ 2,28 a	40,36 $\pm$ 2,29 b
<i>AGD</i>	12,11 $\pm$ 0,93 ab	11,27 $\pm$ 0,89 a	12,98 $\pm$ 1,10 ab	14,71 $\pm$ 0,88 b
<i>AGP</i>	15,02 $\pm$ 1,02 ab	13,70 $\pm$ 1,09 a	15,95 $\pm$ 1,21 ab	17,40 $\pm$ 1,00 b
<i>AGM:AGD</i>	4,58 $\pm$ 0,51 a	4,84 $\pm$ 0,70 a	3,85 $\pm$ 0,31 ab	2,85 $\pm$ 0,32 b
<i>AGM:AGP</i>	3,66 $\pm$ 0,35 a	3,99 $\pm$ 0,59 a	3,11 $\pm$ 0,24 ab	2,39 $\pm$ 0,24 b
<i>AGP (n-6)</i>	13,90 $\pm$ 1,06 ab	12,93 $\pm$ 1,01 a	14,83 $\pm$ 1,23 ab	16,56 $\pm$ 1,05 b
<i>AGP (n-3)</i>	0,92 $\pm$ 0,05 a	0,67 $\pm$ 0,11 b	0,95 $\pm$ 0,05 a	0,83 $\pm$ 0,07 ab
<i>AGP &gt;18C (n-6)</i>	1,75 $\pm$ 0,18 a	1,56 $\pm$ 0,20 a	1,75 $\pm$ 0,18 a	1,78 $\pm$ 0,22 a
<i>AGP &gt;18C (n-3)</i>	0,17 $\pm$ 0,05 a	0,10 $\pm$ 0,06 a	0,21 $\pm$ 0,06 a	0,24 $\pm$ 0,09 a
<i>II</i>	2,93 $\pm$ 0,27 a	2,42 $\pm$ 0,17 ab	2,47 $\pm$ 0,23 ab	1,97 $\pm$ 0,18 b



## 2.5.- Contenido de hidroperóxidos basales e inducidos en LDL

Los niveles de hidroperóxidos basales muestran una ausencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio, existiendo valores muy similares entre ellos (Tabla 4 y figura 7).

Al inducirlos mediante la adición de AAPH, se observa un mayor nivel en los grupos VPL, VA y G, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo VP

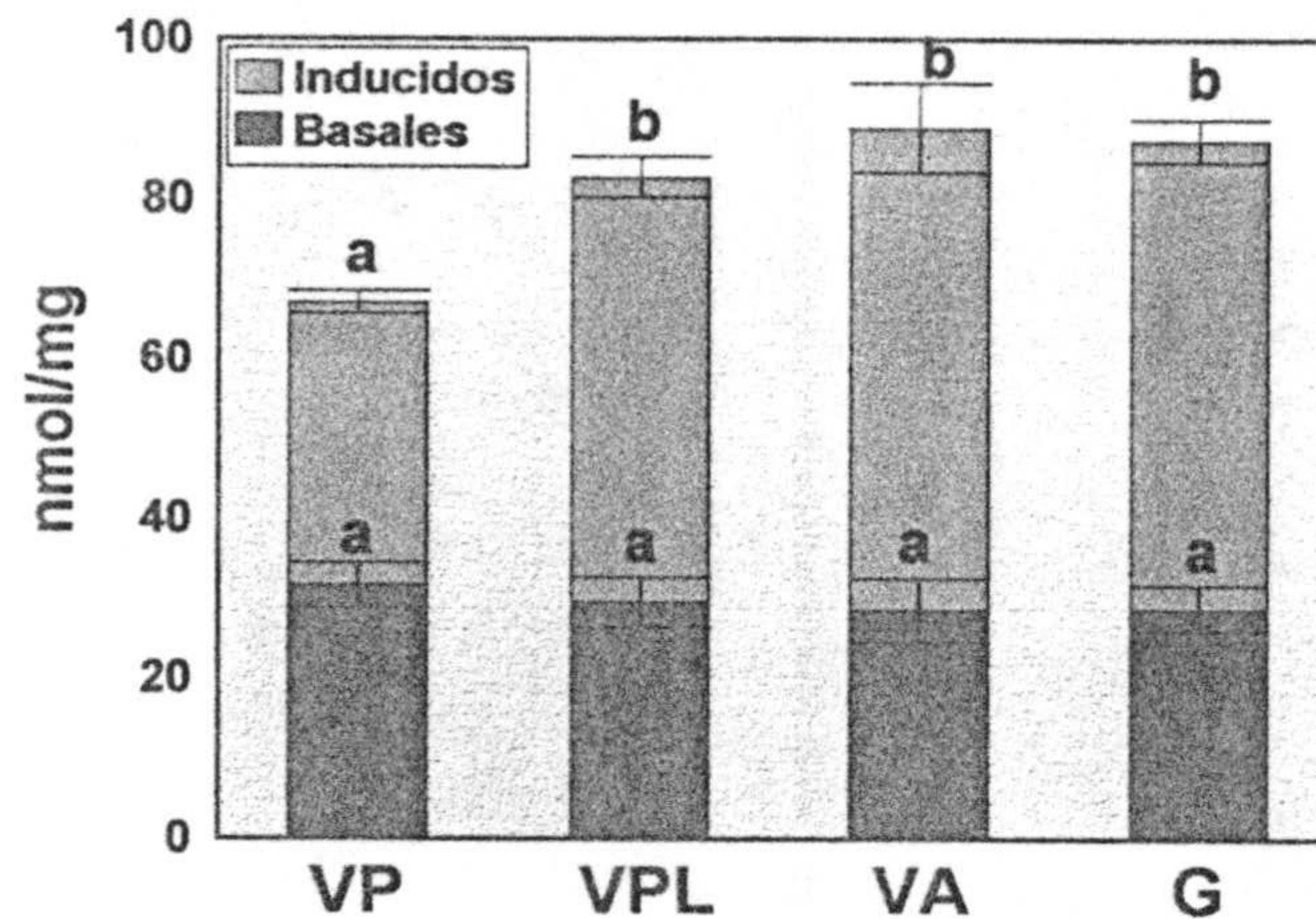


Figura 7.- Contenido de hidroperóxidos basales e inducidos en LDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 2.6.- Perfil lipídico en HDL

En las tablas 8 y 9 se muestra el perfil lipídico obtenido para HDL y los índices grasos más importantes.

### a.- Ácidos grasos saturados

El C16, ácido graso mayoritario de este grupo, el C18 y el C14, muestran la misma tendencia con un máximo en los grupos VA y G con diferencias significativas respecto a los dos grupos restantes. En el caso del C18 se encuentran además diferencias significativas entre los grupos VA y G (tabla 8).

En el caso del C24 no se encuentran diferencias significativas.

El índice AGS, mantiene la tendencia observada siendo mayoritario en los grupos VA y G (tabla 9).

### b.- Ácidos grasos insaturados

#### b.1.- Ácidos grasos monoinsaturados

El ácido graso C18:1n-9 mantiene en estas lipoproteínas la misma tendencia que en LDL y en plasma, siendo mayoritario en los grupos VP y VPL con diferencias estadísticamente significativas con los grupos VA y G, sin embargo se observa un descenso



general en este ácido graso no llegando en ningún caso al 45% del total de ácidos grasos analizados (*tabla 8*).

El C16:1n-9 mantiene la misma tendencia que el anterior ácido de la serie n-9.

los otros ácidos monoinsaturados de esta serie, C22:1n-9 y C24:1n-9, no presenta diferencias significativas entre los grupos.

Respecto a los dos monoinsaturados de la serie n-7, son mayoritarios en el grupo VA, con diferencias significativas en el caso del C16:1n-7 con los grupos VP y VPL.

El correspondiente índice, AGM (*tabla 9*), mantiene la tendencia del ácido graso mayoritario, siendo mayoritario en VP y VPL, encontrándose diferencias en el caso del grupo VPL con los grupos VA y G y en el caso del VP con el grupo G.

#### b.2.- Ácidos grasos poliinsaturados

En este grupo se observa que el C18:2n-6 y C20:2n-6 (*tabla 8*), no muestran diferencias significativas entre los grupos de trabajo, aunque en el índice AGD si se encuentran diferencias significativas entre los grupos VPL y G (*tabla 9*), siendo el grupo G el que mayor valor muestra, lo cual conlleva que en el índice AGM:AGD presente el mínimo valor el grupo G con diferencias significativas con los grupos restantes.

De la serie n-3 (*tabla 8*) solo se ha encontrado el C18:3n-3, que presenta un valor mínimo en el grupo G, existiendo diferencias significativas con los otros grupos.

Los restantes ácidos grasos de la serie n-6 (*tabla 8*) encontrados, C18:3n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6 y C22:5n-6, muestran que salvo el C20:3n-6 y el C22:5n-6 no presentan diferencias entre los grupos de trabajo.

En el caso del C20:3n-6 es el grupo VPL el que menor valor presenta existiendo diferencias significativas con los restantes grupos, mientras que la situación se invierte en el caso del C22:5n-6 siendo el máximo valor el encontrado en el grupo VPL, aunque sólo muestra diferencias con el grupo VP.

Por último de la serie n-9 encontramos el C18:4n-9, ácido graso que no presenta diferencia entre los grupos de trabajo.

El índice correspondiente a los ácidos grasos insaturados AGI (*tabla 9*), obtiene valores máximos en los grupos VP y VPL.

el correspondiente a los ácidos grasos poliinsaturados, AGP, no presenta



**Tabla 8.-** Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos analizados en HDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,63 $\pm$ 0,10 a	0,54 $\pm$ 0,04 a	0,98 $\pm$ 0,17 a	1,43 $\pm$ 0,23 b
<i>C16</i>	20,26 $\pm$ 0,94 a	20,18 $\pm$ 0,61 a	22,71 $\pm$ 0,72 b	23,71 $\pm$ 0,97 b
<i>C16:1n9</i>	0,90 $\pm$ 0,05 a	0,91 $\pm$ 0,07 a	0,72 $\pm$ 0,04 b	0,67 $\pm$ 0,05 b
<i>C16:1n7</i>	1,92 $\pm$ 0,15 ab	1,51 $\pm$ 0,13 b	2,34 $\pm$ 0,40 a	1,33 $\pm$ 0,18 b
<i>C18</i>	11,90 $\pm$ 1,13 a	11,52 $\pm$ 0,23 a	15,95 $\pm$ 1,80 b	19,97 $\pm$ 1,68 c
<i>C18:1n9</i>	41,73 $\pm$ 1,91 a	43,73 $\pm$ 1,50 a	35,36 $\pm$ 2,04 b	29,16 $\pm$ 2,30 c
<i>C18:1n7</i>	1,76 $\pm$ 0,02 a	1,73 $\pm$ 0,06 a	2,15 $\pm$ 0,21 a	1,79 $\pm$ 0,01 a
<i>C18:2n6</i>	15,75 $\pm$ 0,50 a	15,24 $\pm$ 0,94 a	15,83 $\pm$ 0,81 a	19,11 $\pm$ 2,11 a
<i>C18:3n6</i>	0,21 $\pm$ 0,03 a	0,25 $\pm$ 0,02 a	0,19 $\pm$ 0,02 a	0,19 $\pm$ 0,04 a
<i>C18:3n3</i>	0,68 $\pm$ 0,03 a	0,60 $\pm$ 0,05 a	0,66 $\pm$ 0,05 a	0,40 $\pm$ 0,03 b
<i>C18:4n9</i>	0,33 $\pm$ 0,04 a	0,22 $\pm$ 0,03 a	0,27 $\pm$ 0,01 a	0,23 $\pm$ 0,02 a
<i>C20:2n6</i>	0,19 $\pm$ 0,01 a	0,19 $\pm$ 0,01 a	0,22 $\pm$ 0,03 a	0,23 $\pm$ 0,03 a
<i>C20:3n6</i>	0,38 $\pm$ 0,02 a	0,31 $\pm$ 0,01 b	0,38 $\pm$ 0,02 a	0,37 $\pm$ 0,01 a
<i>C20:4n6</i>	2,92 $\pm$ 0,13 a	2,93 $\pm$ 0,14 a	2,69 $\pm$ 0,14 a	2,62 $\pm$ 0,16 a
<i>C22:1n9</i>	0,12 $\pm$ 0,02 a	0,17 $\pm$ 0,02 a	0,12 $\pm$ 0,03 a	0,12 $\pm$ 0,03 a
<i>C24</i>	0,22 $\pm$ 0,01 a	0,21 $\pm$ 0,02 a	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,25 $\pm$ 0,03 a
<i>C22:4n6</i>	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,21 $\pm$ 0,02 a	0,26 $\pm$ 0,01 a	0,24 $\pm$ 0,01 a
<i>C24:1n9</i>	0,84 $\pm$ 0,06 a	0,87 $\pm$ 0,07 a	0,72 $\pm$ 0,06 a	0,71 $\pm$ 0,04 a
<i>C22:5n6</i>	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,24 $\pm$ 0,01 b	0,22 $\pm$ 0,01 ab	0,22 $\pm$ 0,01 ab



**Tabla 9** .- Media  $\pm$  E.E.M. de los índices grasos más relevantes en HDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>AGS</i>	32,93 $\pm$ 2,00 a	32,35 $\pm$ 0,77 a	39,68 $\pm$ 2,50 b	45,24 $\pm$ 2,81 b
<i>AGI</i>	67,07 $\pm$ 2,00 a	67,65 $\pm$ 0,77 a	60,32 $\pm$ 2,50 b	54,76 $\pm$ 2,81 b
<i>AGM</i>	46,73 $\pm$ 2,16 ab	48,25 $\pm$ 1,62 a	40,67 $\pm$ 2,48 b	32,02 $\pm$ 2,62 c
<i>AGD</i>	15,87 $\pm$ 0,50 ab	15,26 $\pm$ 0,92 a	15,86 $\pm$ 0,81 ab	19,17 $\pm$ 2,10 b
<i>AGP</i>	20,34 $\pm$ 0,57 a	19,40 $\pm$ 1,04 a	19,65 $\pm$ 1,00 a	22,74 $\pm$ 1,97 a
<i>AGS:AGM</i>	0,79 $\pm$ 0,09 a	0,73 $\pm$ 0,04 a	1,10 $\pm$ 0,13 a	1,59 $\pm$ 0,22 b
<i>AGM:AGD</i>	2,99 $\pm$ 0,22 a	3,32 $\pm$ 0,38 a	2,62 $\pm$ 0,21 a	1,82 $\pm$ 0,24 b
<i>AGM:AGP</i>	2,72 $\pm$ 0,22 a	2,98 $\pm$ 0,34 a	2,56 $\pm$ 0,28 a	1,67 $\pm$ 0,22 b
<i>AGP (n-6)</i>	19,50 $\pm$ 0,61 a	18,70 $\pm$ 1,01 a	18,96 $\pm$ 0,98 a	22,30 $\pm$ 2,02 a
<i>AGP (n-3)</i>	0,68 $\pm$ 0,03 a	0,60 $\pm$ 0,05 a	0,66 $\pm$ 0,05 a	0,35 $\pm$ 0,06 b
<i>AGP &gt; 18C (n-6)</i>	3,59 $\pm$ 0,18 a	3,30 $\pm$ 0,16 a	3,05 $\pm$ 0,22 a	3,12 $\pm$ 0,26 a
<i>II</i>	2,97 $\pm$ 0,20 a	2,93 $\pm$ 0,08 a	2,28 $\pm$ 0,22 b	1,96 $\pm$ 0,24 b



diferencias significativas entre los grupos.

Por su parte la relación monoinsaturados - poliinsaturados (AGM:AGP) encuentra su valor mínimo en el grupo G mostrando diferencias significativas con los restantes grupos.

Los índices correspondientes a la serie n-6, AGP (n-6) y AGP>18 (n-6), no presentan diferencias significativas entre los distintos grupos (*tabla 9*).

El correspondiente a la serie n-3, AGP (n-3), indica que es el grupo G el que menor valor obtiene para este ácido graso, como se observo anteriormente.

Por último el índice II muestra valores máximos en los grupo VP y VPL con diferencias significativas respecto a VA y G.



### 3.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN HÍGADO

#### 3.1.- Peso de los hígados

Se parte de conejos con pesos similares, pero como se observa en la *tabla 10* el grupo VPL presenta un peso medio de hígado inferior al presentado por los otros tres grupos, aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos.

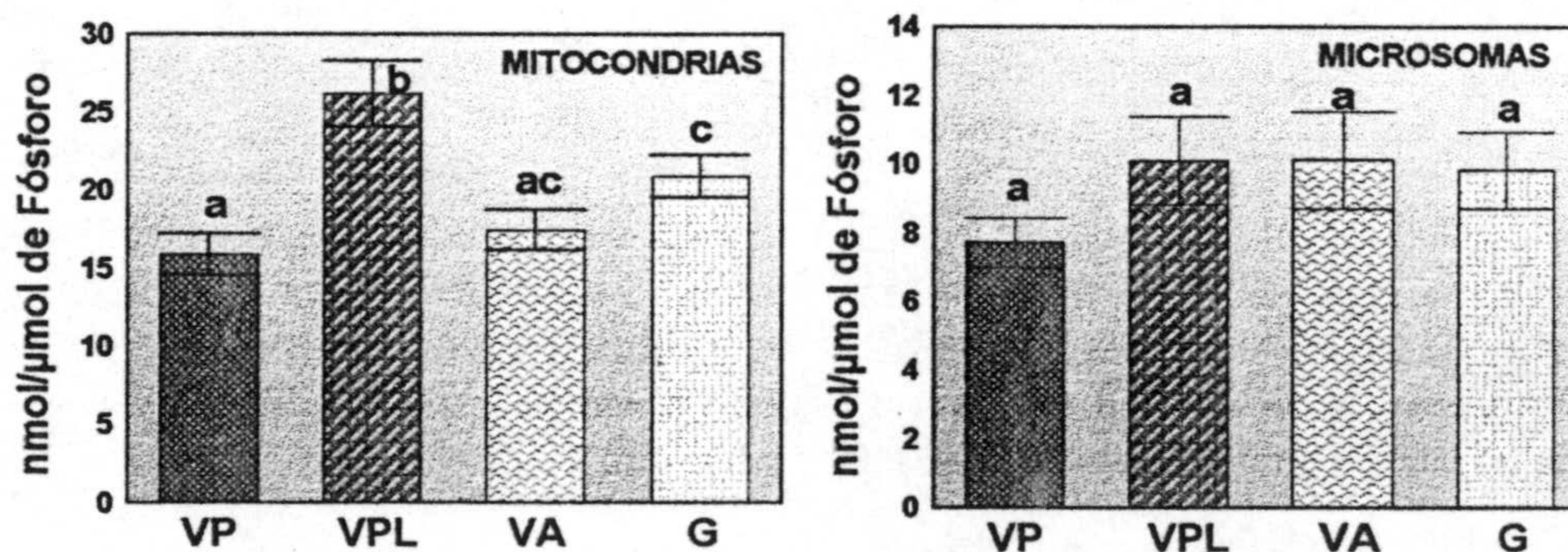
#### 3.2.- Proteínas mitocondriales y microsomales

En la *tabla 10* se muestran los niveles de proteínas obtenidos en mitocondrias, observándose que son los animales del grupo VPL los que mayor contenido en proteínas presenta, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los tres grupos restantes.

En microsomas (*tabla 11*), es el grupo G el que presenta un mayor nivel de proteínas, mostrando diferencia significativa con el grupo VP.

#### 3.3.- Nivel de TBARS en mitocondrias y microsomas

Los TBARS en mitocondrias, expresados como nmol de TBARS/ $\mu$ mol de fósforo, (*Tabla 10 y figura 8*) muestran sus valores más altos en los grupos VPL y G, sobre todo



**Figura 8.-** Valores obtenidos para los TBARS en mitocondrias y microsomas de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

en el primero de estos dos, existiendo diferencias significativas entre el grupo VPL y los tres restantes, presentando además el grupo G diferencias significativas respecto al grupo VP.



En microsomas sigue siendo el grupo VP el que menor valor de TBARS presenta, aunque en este caso no aparecen diferencias significativas entre ningún grupo, así como valores muy similares entre los grupo VPL, VA y G (tabla 11 y figura 8).

### 3.4.- Nivel de hidropéroxidos basales e inducidos en mitocondrias y microsomas

Los niveles de hidropéroxidos basales e inducidos en mitocondrias mantienen la tendencia observada para los TBARS, siendo los grupos VPL y G los que mayores valores

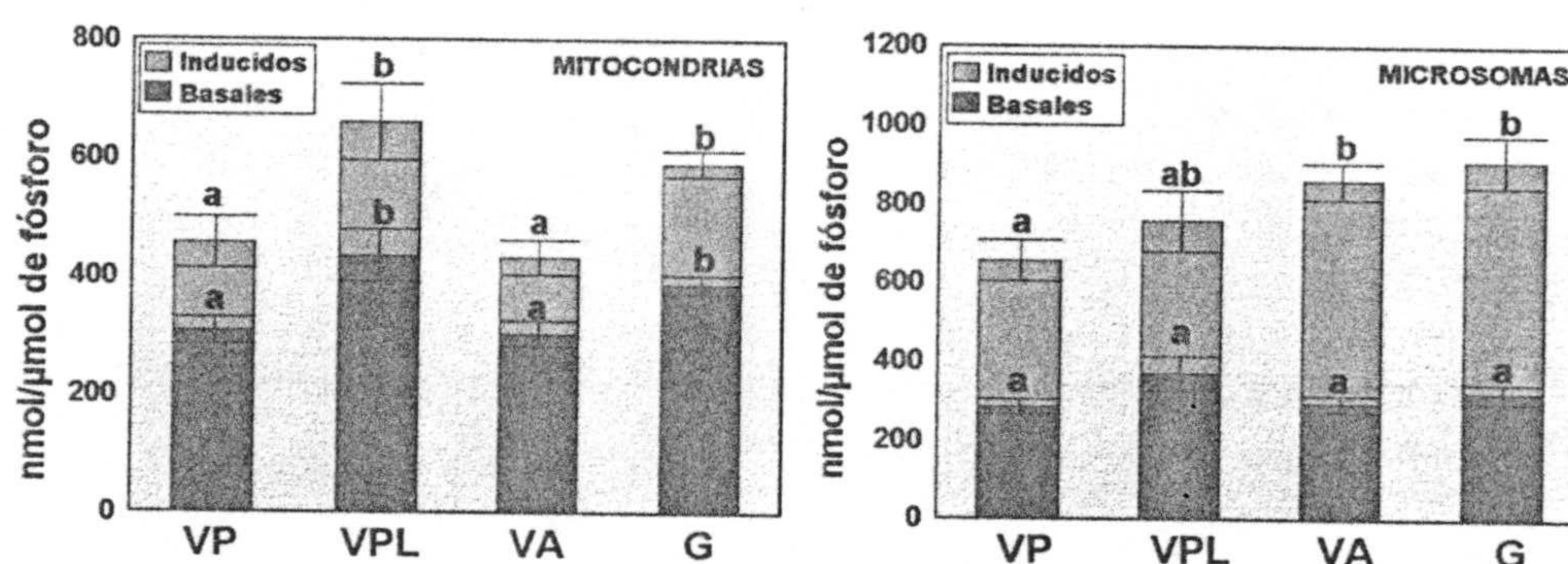


Figura 9.- Valores de hidropéroxidos basales e inducidos en mitocondrias y microsomas de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

presentan, aunque en este caso no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos y si con los dos grupos restantes, VP y VA (tabla 10 y figura 9).

En la tabla 11 y figura 9 se muestran los valores obtenidos para hidropéroxidos en microsomas, respecto a los hidropéroxidos basales se observa la no existencia de diferencias significativas entre los grupos. En los niveles de hidropéroxidos inducidos son los grupos VA y G los que mayores valores presentan, mostrando ambos diferencias estadísticamente significativas con el grupo VP.

### 3.5.- Niveles de fósforo en mitocondrias y microsomas

El fósforo de fosfolípidos mitocondriales se muestra en la tabla 10, observándose un mínimo en el grupo VPL seguido por el grupo G, existiendo diferencias significativas entre el grupo VPL y los tres grupos restantes. El girasol a su vez presenta además diferencias significativas con los grupos VP y VA.

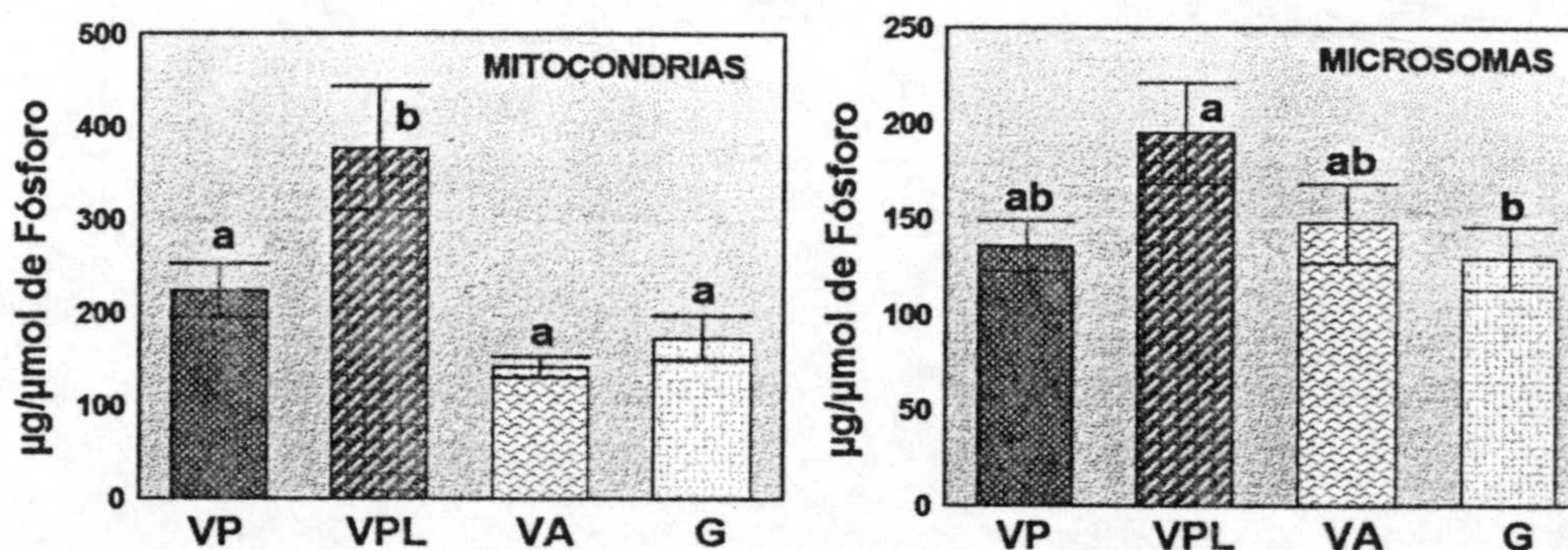
En microsomas no sucede lo mismo que en mitocondrias, no existiendo diferencias



significativas entre ninguno de los grupos de estudio (*tabla 11*).

### 3.6.- Colesterol en mitocondrias y microsomas

En la *tabla 10* y *figura 10* se muestran los resultados obtenidos para colesterol en



**Figura 10.-** Niveles de colesterol mitocondrial y microsomal hepático. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

mitocondrias, observándose un máximo en el grupo VPL con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos VP, VA y G, siendo el grupo VA el que menor valor presenta (casi el 50% del presentado por el grupo VPL).

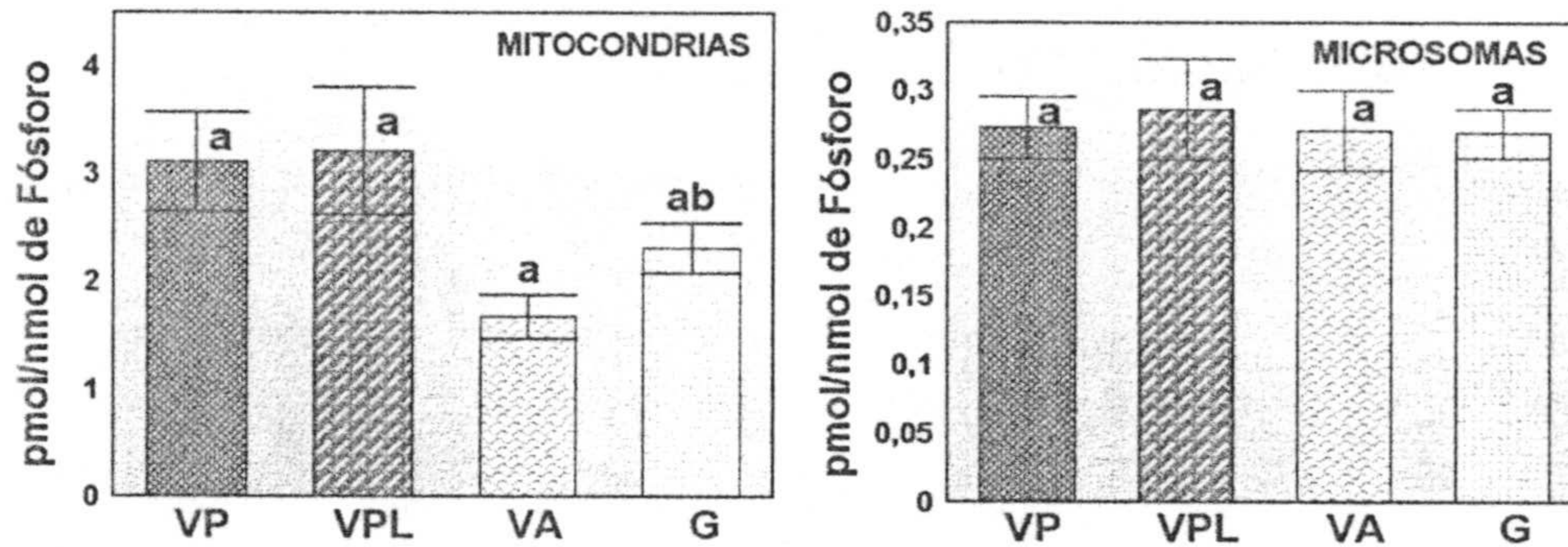
En microsomas (*tabla 11* y *figura 10*), se mantiene la tendencia mostrada en microsomas, aunque en este caso las diferencias significativas sólo se presentan entre los grupo VPL (valor más alto) y G (valor más bajo).

### 3.7.- Niveles de ubiquinonas 9 y 10 en microsomas y mitocondrias

En la *tabla 10* se muestran los niveles de ubiquinona 10 en mitocondrias de hígado expresada por mg de proteína, mientras que en la *figura 11* se muestra expresada por nmol de fósforo, observándose ligeras diferencias en los resultados aunque una misma tendencia. Así, al expresar estos resultados por mg de proteína, es el grupo VP el que presenta el máximo valor, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los restantes grupo, mientras que al expresar los resultados por nmol de fósforo, el grupo VPL iguala en valor al grupo VP, existiendo diferencias significativas sólo con el grupo VA que en ambos casos es el que menor valor presenta (casi un 50%).



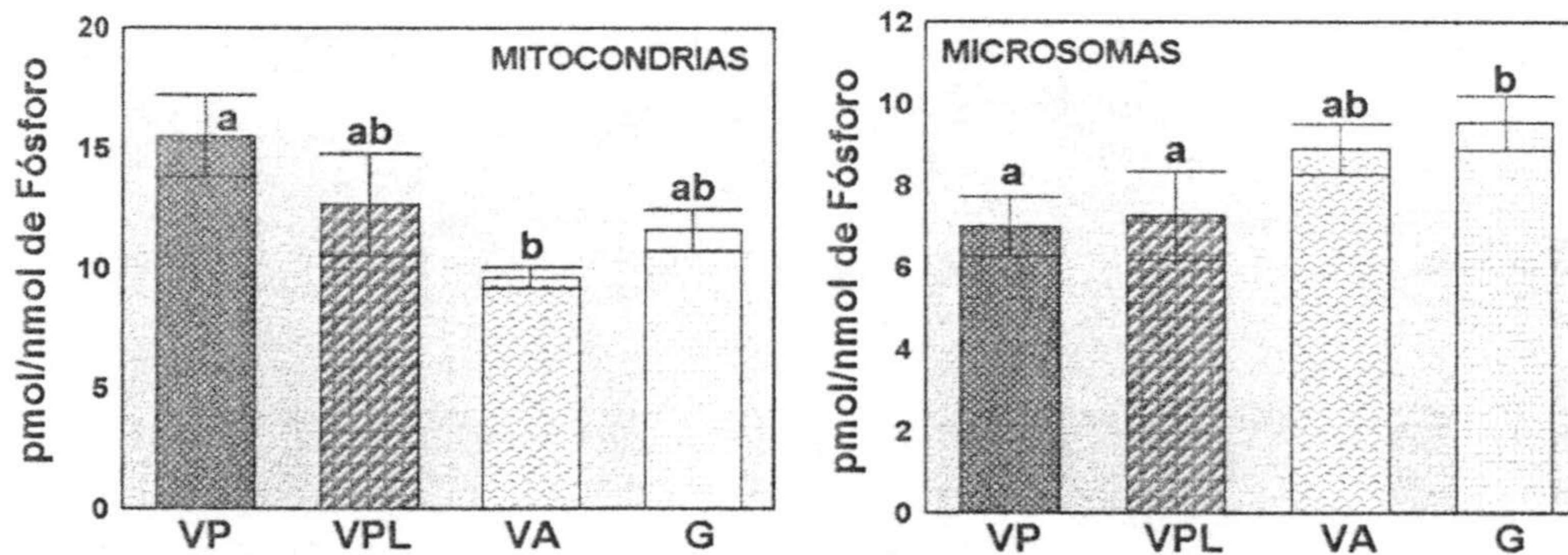
La ubiquinona 9 en mitocondrias (*tabla 10*) sigue la tendencia de la ubiquinona



**Figura 11.-** Niveles de ubiquinona 10 en mitocondrias y microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

10, siendo el grupo VPL en cuanto a contenido se refiere el mayor y el grupo VA el menor existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En microsomas no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo para la ubiquinona 10 (*tabla 11 y figura 11*).



**Figura 12.-** Niveles de a-tocoferol en mitocondrias y microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.8.- $\alpha$ -Tocoferol en mitocondrias y microsomas

En la *tabla 10* y *figura 12* se observan los valores de tocoferol para mitocondrias



hepáticas. El  $\alpha$ -tocoferol sigue una tendencia similar a la presentada por la ubiquinona 10, siendo los grupos VP y VPL los que mayores valores presentan y el grupo VA el que menor valor, existiendo diferencias significativas entre los grupos VP y VA.

En microsomas, como se observa en la *tabla 11* y *figura 12*, se invierte la relación observada para mitocondrias siendo en este orgánulo los grupos VA y G los que mayor valor muestran, encontrándose diferencias significativas con los grupos VP y VPL.

### 3.9.- Perfil lipídico en mitocondrias de hígado

En las *tablas 12* y *13* se muestran los resultados obtenidos en el perfil lipídico de mitocondrias de hígado, así como los índices más importantes.

#### a.- Ácidos grasos saturados

El comportamiento seguido en este grupo es bastante heterogéneo, como se observa en la *tabla 12*. El C14 y el C16 presentan un valor máximo en el grupo VA, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con el grupo G para el C14.

Por su parte el C18 no muestra diferencias significativas entre los grupos de trabajo, mientras que el C22 y C24 obtiene su máximo valor en el grupo G encontrándose diferencias significativas con los grupos VP y VA.

El comportamiento observado nos indica la tendencia del índice correspondiente a este grupo, AGS (*tabla 13*), encontrándose un valor máximo para los grupo VA y G con diferencias significativas respecto a VP y VPL.

#### b.- Ácidos grasos insaturados

##### b.1.- Ácidos grasos monoinsaturados

Dentro de la serie n-9 en este grupo, se observa en la *tabla 12* que el C16:1n-9 y el C24:1n-9 no presentan diferencias significativas entre los grupos, aunque un mayor valor en el grupo VPL. Por su parte el C18:1n-9, obtiene un máximo en el grupo VPL con diferencias respecto a los grupos VA y G.

Los de la serie n-7 muestran ambos su máximo en el grupo VA, con diferencias significativas en el caso del c16:1n-7 con el grupo VPL y en el caso del c18:1n-7 con el grupo VP y VPL.

El índice correspondiente, AGM (*tabla 13*), presenta su máximo valor en el grupo VPL, encontrándose diferencias significativas con el grupo G.



**Tabla 8.-** Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos analizados en HDL. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,63 $\pm$ 0,10 a	0,54 $\pm$ 0,04 a	0,98 $\pm$ 0,17 a	1,43 $\pm$ 0,23 b
<i>C16</i>	20,26 $\pm$ 0,94 a	20,18 $\pm$ 0,61 a	22,71 $\pm$ 0,72 b	23,71 $\pm$ 0,97 b
<i>C16:1n9</i>	0,90 $\pm$ 0,05 a	0,91 $\pm$ 0,07 a	0,72 $\pm$ 0,04 b	0,67 $\pm$ 0,05 b
<i>C16:1n7</i>	1,92 $\pm$ 0,15 ab	1,51 $\pm$ 0,13 b	2,34 $\pm$ 0,40 a	1,33 $\pm$ 0,18 b
<i>C18</i>	11,90 $\pm$ 1,13 a	11,52 $\pm$ 0,23 a	15,95 $\pm$ 1,80 b	19,97 $\pm$ 1,68 c
<i>C18:1n9</i>	41,73 $\pm$ 1,91 a	43,73 $\pm$ 1,50 a	35,36 $\pm$ 2,04 b	29,16 $\pm$ 2,30 c
<i>C18:1n7</i>	1,76 $\pm$ 0,02 a	1,73 $\pm$ 0,06 a	2,15 $\pm$ 0,21 a	1,79 $\pm$ 0,01 a
<i>C18:2n6</i>	15,75 $\pm$ 0,50 a	15,24 $\pm$ 0,94 a	15,83 $\pm$ 0,81 a	19,11 $\pm$ 2,11 a
<i>C18:3n6</i>	0,21 $\pm$ 0,03 a	0,25 $\pm$ 0,02 a	0,19 $\pm$ 0,02 a	0,19 $\pm$ 0,04 a
<i>C18:3n3</i>	0,68 $\pm$ 0,03 a	0,60 $\pm$ 0,05 a	0,66 $\pm$ 0,05 a	0,40 $\pm$ 0,03 b
<i>C18:4n9</i>	0,33 $\pm$ 0,04 a	0,22 $\pm$ 0,03 a	0,27 $\pm$ 0,01 a	0,23 $\pm$ 0,02 a
<i>C20:2n6</i>	0,19 $\pm$ 0,01 a	0,19 $\pm$ 0,01 a	0,22 $\pm$ 0,03 a	0,23 $\pm$ 0,03 a
<i>C20:3n6</i>	0,38 $\pm$ 0,02 a	0,31 $\pm$ 0,01 b	0,38 $\pm$ 0,02 a	0,37 $\pm$ 0,01 a
<i>C20:4n6</i>	2,92 $\pm$ 0,13 a	2,93 $\pm$ 0,14 a	2,69 $\pm$ 0,14 a	2,62 $\pm$ 0,16 a
<i>C22:1n9</i>	0,12 $\pm$ 0,02 a	0,17 $\pm$ 0,02 a	0,12 $\pm$ 0,03 a	0,12 $\pm$ 0,03 a
<i>C24</i>	0,22 $\pm$ 0,01 a	0,21 $\pm$ 0,02 a	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,25 $\pm$ 0,03 a
<i>C22:4n6</i>	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,21 $\pm$ 0,02 a	0,26 $\pm$ 0,01 a	0,24 $\pm$ 0,01 a
<i>C24:1n9</i>	0,84 $\pm$ 0,06 a	0,87 $\pm$ 0,07 a	0,72 $\pm$ 0,06 a	0,71 $\pm$ 0,04 a
<i>C22:5n6</i>	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,24 $\pm$ 0,01 b	0,22 $\pm$ 0,01 ab	0,22 $\pm$ 0,01 ab



*Tabla 11* .- Media  $\pm$  E.E.M. de los parámetros analizados en microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

		PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>Proteínas</i>	$\mu\text{g}/\text{nmol}$ de Fósforo	$4,40 \pm 0,34$ a	$5,29 \pm 0,43$ ab	$5,40 \pm 0,40$ ab	$5,70 \pm 0,35$ b
<i>TBARS</i>	$\text{nmol}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$7,72 \pm 0,72$ a	$10,11 \pm 1,28$ a	$10,14 \pm 1,41$ a	$9,83 \pm 1,11$ a
<i>Hidroperóxidos (To)</i>	$\text{nmol}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$284,73 \pm 20,15$ a	$369,47 \pm 44,58$ a	$293,31 \pm 20,71$ a	$321,86 \pm 24,42$ a
<i>Hidroperóxidos (T1)</i>	$\text{nmol}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$656,90 \pm 52,41$ a	$757,40 \pm 76,86$ ab	$859,39 \pm 45,71$ b	$908,66 \pm 65,39$ b
<i>Colesterol</i>	$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$136,36 \pm 13,32$ ab	$195,49 \pm 26,34$ a	$148,50 \pm 20,84$ ab	$129,99 \pm 16,47$ b
<i>Ubiquinona 10</i>	$\text{nmol}/\text{mg}$	$0,06 \pm 0,00$ a	$0,06 \pm 0,00$ a	$0,05 \pm 0,01$ a	$0,05 \pm 0,00$ a
<i>Tocoferol</i>	$\text{pmol}/\text{nmol}$ de Fósforo	$7,02 \pm 0,72$ a	$7,27 \pm 1,09$ a	$8,91 \pm 0,61$ ab	$9,53 \pm 0,67$ b



### b.2.- Ácidos grasos poliinsaturados

Dentro de este grupo, para los dos ácidos grasos diinsaturados encontrados, el C18:2n-6 y el C20:2n-6 (*tabla 12*), no se han observado diferencias significativas entre los grupos. Lo anteriormente mencionado se refleja en el índice correspondiente a este grupo, AGD (*tabla 13*).

El índice AGM:AGD presenta su valor máximo en el grupo VPL, con diferencias significativas respecto al grupo G.

En los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (*tabla 12*), se observa que el C18:3n-3 muestra un máximo en los grupos VP y VA con diferencias significativas con los grupos VPL y G, mientras que el resto de ácidos grasos de esta serie, C20:5n-3, C22:5n-3 y C22:6n-3, no muestran diferencias significativas entre los grupos. Los índices correspondientes a este grupo (*tabla 13*), AGP (n-3) y AGP>18 (n-3), reflejan lo observado para la mayoría de estos ácidos, es decir la inexistencia de diferencias significativas.

En los restantes ácidos grasos de la serie n-6 de este grupo, nos encontramos que el C18:2n-6, C20:3n-6 y el C22:4n-6 presentan el máximo valor en el grupo G, mientras que el C20:4n-6 y el C22:5n-6 no muestran diferencias significativas, aunque también se encuentra el máximo valor en el grupo G. Para los índices correspondientes a esta serie, en la *tabla 13* se muestra que para el AGP(n-6) no existen diferencias significativas entre los grupos, mientras que para el AGP>18(n-6) un máximo valor en el grupo G con diferencias significativas respecto al grupo VPL.

Por su parte el C18:4n-9 no presenta diferencias entre los grupos.

Respecto a los índices restantes, se encuentra que el AGI presenta máximo valor en los grupos VP y VPL con diferencias significativas con los grupos VA y G. El índice AGP indica la no existencia de diferencias significativas y el índice AGM:AGP un mínimo valor para el grupo G con diferencias significativas respecto al grupo VPL. Por último el índice de insaturación (II) no se observan diferencias significativas entre los grupos (*tabla 13*).

### 3.10.- Perfil lipídico en microsomas de hígado

El perfil lipídico existente en microsomas de hígado así como los índices grasos más importante se muestra en las *tablas 14 y 15*.



Tabla 12.- Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos encontrados en mitocondrias de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,26 $\pm$ 0,03 ab	0,32 $\pm$ 0,05 ab	0,37 $\pm$ 0,04 a	0,24 $\pm$ 0,02 b
<i>C16</i>	16,73 $\pm$ 0,32 ac	15,40 $\pm$ 0,99 a	18,62 $\pm$ 0,45 b	17,95 $\pm$ 0,40 cb
<i>C16:1n9</i>	0,43 $\pm$ 0,03 a	0,57 $\pm$ 0,12 a	0,38 $\pm$ 0,03 a	0,38 $\pm$ 0,03 a
<i>C16:1n7</i>	1,41 $\pm$ 0,11 ab	1,16 $\pm$ 0,13 a	1,86 $\pm$ 0,14 b	1,31 $\pm$ 0,09 a
<i>C18</i>	14,33 $\pm$ 0,33 a	14,58 $\pm$ 0,58 a	13,96 $\pm$ 0,57 a	15,40 $\pm$ 0,29 a
<i>C18:1n9</i>	31,92 $\pm$ 0,99 ab	35,71 $\pm$ 2,06 a	30,02 $\pm$ 1,52 b	28,24 $\pm$ 1,08 b
<i>C18:1n7</i>	2,00 $\pm$ 0,09 a	2,04 $\pm$ 0,09 a	2,59 $\pm$ 0,23 b	1,78 $\pm$ 0,08 a
<i>C18:2n6</i>	20,78 $\pm$ 0,80a	18,45 $\pm$ 1,52 a	20,40 $\pm$ 1,19 a	21,21 $\pm$ 0,68 a
<i>C18:3n6</i>	0,21 $\pm$ 0,02 ab	0,19 $\pm$ 0,02 ab	0,18 $\pm$ 0,01 a	0,26 $\pm$ 0,02 b
<i>C18:3n3</i>	0,82 $\pm$ 0,04 a	0,58 $\pm$ 0,07 b	0,78 $\pm$ 0,04 a	0,51 $\pm$ 0,04 b
<i>C18:4n9</i>	0,51 $\pm$ 0,06 a	0,57 $\pm$ 0,05 a	0,58 $\pm$ 0,08 a	0,54 $\pm$ 0,05 a
<i>C20:2n6</i>	0,33 $\pm$ 0,01 a	0,31 $\pm$ 0,01 a	0,33 $\pm$ 0,02 a	0,33 $\pm$ 0,02 a
<i>C20:3n6</i>	0,59 $\pm$ 0,02 a	0,54 $\pm$ 0,04 a	0,64 $\pm$ 0,07 a	0,85 $\pm$ 0,07 b
<i>C22</i>	0,46 $\pm$ 0,05 a	0,57 $\pm$ 0,08 ab	0,46 $\pm$ 0,02 a	0,70 $\pm$ 0,05 b
<i>C20:4n6</i>	5,68 $\pm$ 0,33 a	5,59 $\pm$ 0,46 a	5,44 $\pm$ 0,20 a	6,22 $\pm$ 0,37 a
<i>C20:5n3</i>	0,51 $\pm$ 0,04 a	0,49 $\pm$ 0,01 a	0,46 $\pm$ 0,02 a	0,46 $\pm$ 0,01 a
<i>C24</i>	0,38 $\pm$ 0,04 a	0,43 $\pm$ 0,05 ab	0,36 $\pm$ 0,02 a	0,52 $\pm$ 0,04 b
<i>C22:4n6</i>	0,67 $\pm$ 0,04 a	0,69 $\pm$ 0,05 a	0,81 $\pm$ 0,04 ab	0,86 $\pm$ 0,05 b
<i>C24:1n9</i>	0,89 $\pm$ 0,11 a	0,91 $\pm$ 0,10 a	0,82 $\pm$ 0,09 a	0,84 $\pm$ 0,07 a
<i>C22:5n6</i>	0,47 $\pm$ 0,05 a	0,46 $\pm$ 0,05 a	0,44 $\pm$ 0,02 a	0,50 $\pm$ 0,04 a
<i>C22:5n3</i>	0,44 $\pm$ 0,03 a	0,47 $\pm$ 0,04 a	0,43 $\pm$ 0,04 a	0,45 $\pm$ 0,04 a
<i>C22:6n3</i>	0,49 $\pm$ 0,16 a	0,50 $\pm$ 0,13 a	0,34 $\pm$ 0,11 a	0,45 $\pm$ 0,09 a



**Tabla 13** .- Media  $\pm$  E.E.M. de los índices grasos más relevantes en mitocondrias de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>AGS</i>	32,08 $\pm$ 0,32 ab	31,21 $\pm$ 1,07 a	33,73 $\pm$ 0,75 bc	34,82 $\pm$ 0,48 c
<i>AGI</i>	67,92 $\pm$ 0,32 a	68,79 $\pm$ 1,07 a	66,27 $\pm$ 0,75 b	65,18 $\pm$ 0,48 b
<i>AGM</i>	36,65 $\pm$ 1,18 ab	40,39 $\pm$ 2,17 a	35,66 $\pm$ 1,92 ab	32,56 $\pm$ 1,19 b
<i>AGD</i>	21,06 $\pm$ 0,78 a	18,64 $\pm$ 1,52 a	20,69 $\pm$ 1,19 a	21,55 $\pm$ 0,68 a
<i>AGP</i>	31,27 $\pm$ 1,03 a	28,40 $\pm$ 2,03 a	30,61 $\pm$ 1,28 a	32,62 $\pm$ 0,80 a
<i>AGM:AGD</i>	1,77 $\pm$ 0,12 ab	2,37 $\pm$ 0,38 a	1,81 $\pm$ 0,22 ab	1,53 $\pm$ 0,11 b
<i>AGM:AGP</i>	1,27 $\pm$ 0,09 ab	1,66 $\pm$ 0,29 a	1,32 $\pm$ 0,16 ab	1,07 $\pm$ 0,07 b
<i>AGP (n-6)</i>	28,56 $\pm$ 1,06 a	25,91 $\pm$ 1,90 a	28,12 $\pm$ 1,25 a	30,21 $\pm$ 0,77 a
<i>AGP (n-3)</i>	2,26 $\pm$ 0,18 a	1,92 $\pm$ 0,21 a	1,91 $\pm$ 0,18 a	1,86 $\pm$ 0,11 a
<i>AGP &gt;18C (n-6)</i>	7,70 $\pm$ 0,37 ab	7,41 $\pm$ 0,53 a	7,61 $\pm$ 0,20 ab	8,77 $\pm$ 0,46 b
<i>AGP &gt;18C (n-3)</i>	1,44 $\pm$ 0,17 a	1,34 $\pm$ 0,15 a	1,13 $\pm$ 0,17 a	1,36 $\pm$ 0,09 a
<i>H</i>	3,75 $\pm$ 0,05 a	3,82 $\pm$ 0,24 a	3,48 $\pm$ 0,07 a	3,47 $\pm$ 0,04 a



a.- Ácidos grasos saturados

En este grupo, salvo para el C24, no se observan diferencias entre los distintos grupos de trabajo. En el caso del C24 se encuentra que es el grupo G el que presenta el máximo valor existiendo diferencias significativas con los grupos restantes. El índice correspondiente AGS (*tabla 15*) muestra un valor máximo en el grupo G con diferencias significativas con los grupos restantes.

b.- Ácidos grasos insaturados

b.1.- Ácidos grasos monoinsaturados

En este grupo, como se muestra en la *tabla 14*, se observa que el C16:1n-9 y el C24:1n-9 no presentan diferencias significativas entre los grupos. El C18:1n-9 encuentra su máximo valor en el grupo VPL con diferencias significativas con el grupo VA y G, mientras que el C16:1n-7 y C18:1n-7 en el grupo VA.

El índice AGM (*tabla 15*) indica máximo valor en el VPL con diferencias significativas con el grupo G.

b.2.- Ácidos grasos poliinsaturados

Respecto a los diinsaturados de la serie n-6 el ácido C18:2n-6 (*tabla 14*) no muestra diferencias significativas entre los grupos y el C20:2n-6 un valor máximo en el grupo G con diferencias significativas respecto al grupo VPL.

El índice AGD (*tabla 15*) no refleja diferencias significativas entre los grupos y el AGM:AGD un valor máximo en el grupo VPL con diferencias significativas con el grupo G.

En este grupo dentro de los ácidos grasos de la serie n-3 (*tabla 14*), se observa que el C18:3n-3 presenta valor máximo en el grupo VP, seguido por el grupo VA, mientras que para los restantes, el C20:5n-3, C22:5n-3 y el C22:6n-3, no se encuentran diferencias entre los grupos de trabajo.

Los ácidos grasos restantes de la serie n-6, muestran para el C20:3n-6 y el C22:4n-6 valores máximos en el grupo G, mientras que el resto, C18:3n-6, C20:4n-6 y C22:5n-6 no muestran diferencias significativas entre los grupos. El índice AGP(n-6) y el AGP>18(n-6) (*tabla 14*) muestran un valor máximo en el grupo G con diferencias, en el caso del primer índice, con el grupo VPL, mientras que en el segundo con el grupo VP.

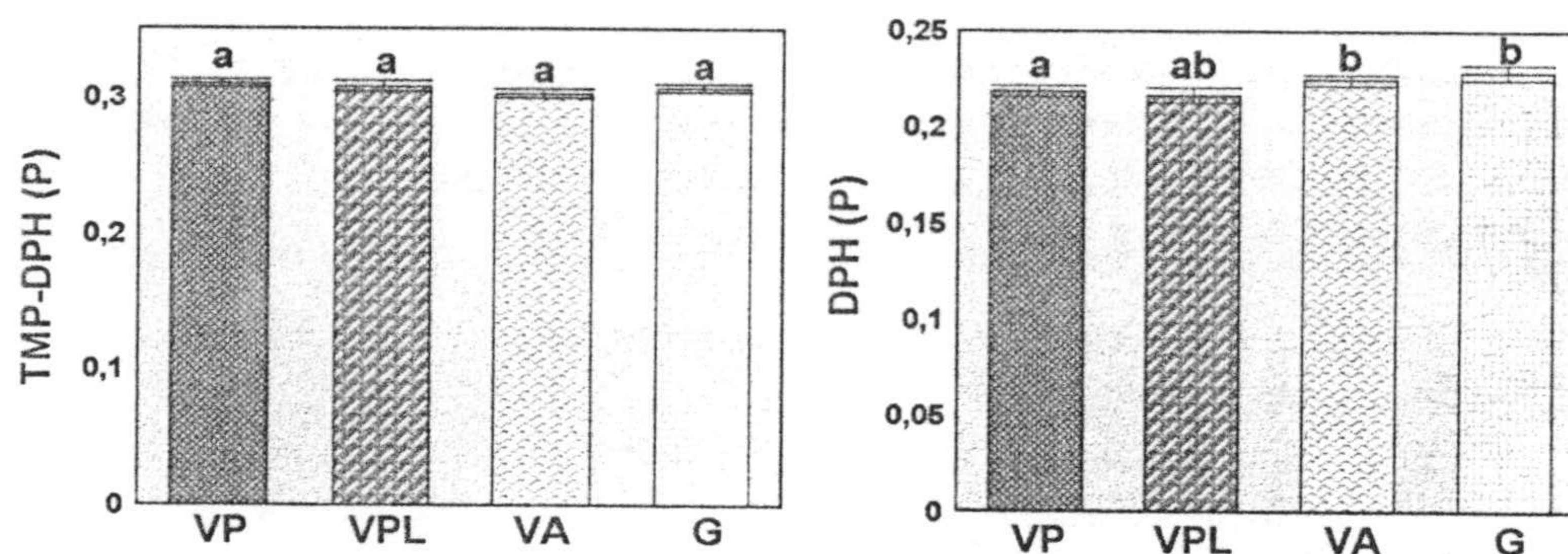
El c18:4n-9 no muestra diferencias significativas entre los grupos de estudio.



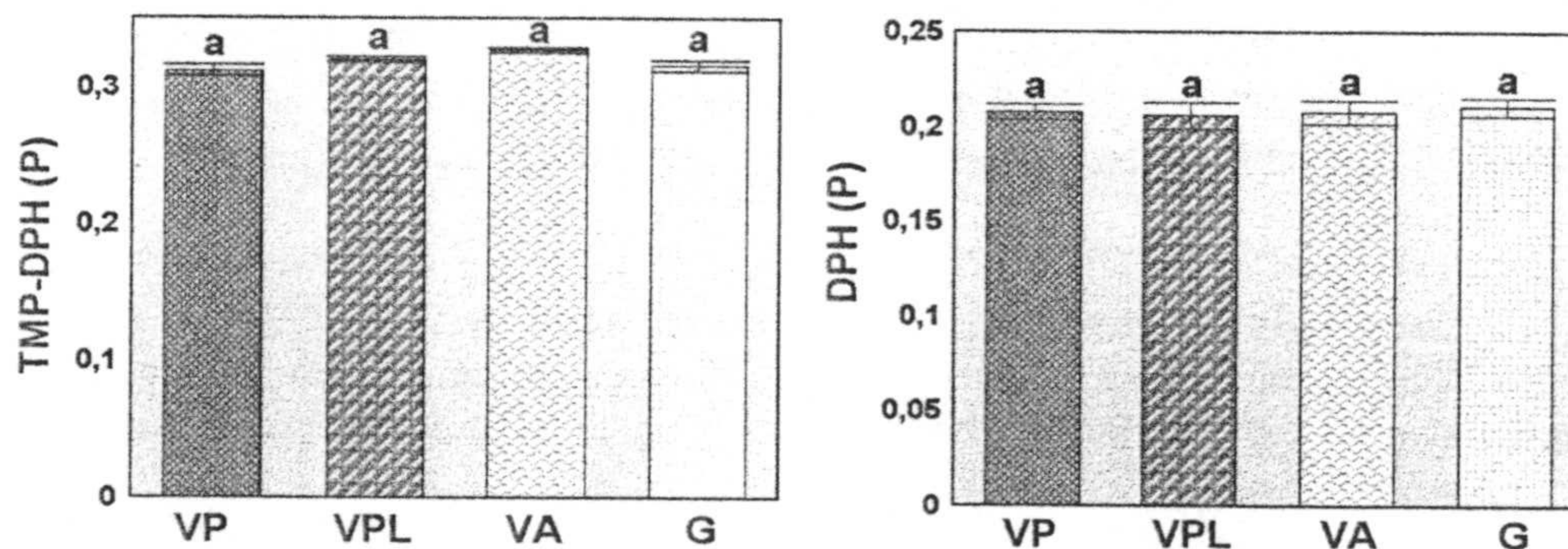
El índice AGP presenta un valor máximo en el grupo G con diferencias significativas respecto al grupo VPL, por su parte la relación AGM:AGP muestra un valor mínimo en el grupo G con diferencias significativas respecto al grupo VPL. Por último el índice II, al igual que en microsomas, no muestra diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio.

### 3.11.- Polarización de fluorescencia en mitocondrias y microsomas

Para la sonda TMP-DPH, como se muestra en la *figura 13*, no se observan diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos de estudio en mitocondrias.



*Figura 13* .- Polarización de fluorescencia observada en mitocondrias de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



*Figura 14* .- Polarización de fluorescencia obtenida en microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Sin embargo en microsomas (*figura 14*) se obtienen valores superiores de P en los grupos VPL, VA y VG, respecto al grupo VP, lo que indica una menor fluorescencia en estos tres grupos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre los grupos VA y VP.



Tabla 14.- Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos analizados en microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,28 $\pm$ 0,03 a	0,26 $\pm$ 0,02 a	0,29 $\pm$ 0,01 a	0,28 $\pm$ 0,01 a
<i>C16</i>	18,39 $\pm$ 0,40 a	17,98 $\pm$ 0,48 a	18,54 $\pm$ 0,33 a	18,66 $\pm$ 0,46 a
<i>C16:1n9</i>	0,41 $\pm$ 0,04 a	0,46 $\pm$ 0,08 a	0,33 $\pm$ 0,02 a	0,33 $\pm$ 0,02 a
<i>C16:1n7</i>	1,25 $\pm$ 0,10 ab	1,03 $\pm$ 0,10 a	1,48 $\pm$ 0,19 b	1,10 $\pm$ 0,09 ab
<i>C18</i>	17,50 $\pm$ 0,75 a	17,47 $\pm$ 0,45 a	17,83 $\pm$ 0,59 a	18,55 $\pm$ 0,31 a
<i>C18:1n9</i>	28,24 $\pm$ 0,87 ab	30,34 $\pm$ 1,81 a	25,49 $\pm$ 1,22 b	24,42 $\pm$ 1,00 b
<i>C18:1n7</i>	1,60 $\pm$ 0,07 a	1,46 $\pm$ 0,06 a	2,04 $\pm$ 0,16 b	1,45 $\pm$ 0,09 a
<i>C18:2n6</i>	21,33 $\pm$ 0,91 a	18,84 $\pm$ 1,04 a	21,42 $\pm$ 1,09 a	21,73 $\pm$ 0,65 a
<i>C18:3n6</i>	0,15 $\pm$ 0,01 a	0,16 $\pm$ 0,02 a	0,15 $\pm$ 0,02 a	0,20 $\pm$ 0,02 a
<i>C18:3n3</i>	0,77 $\pm$ 0,05 a	0,58 $\pm$ 0,06 bc	0,70 $\pm$ 0,03 ac	0,49 $\pm$ 0,04 b
<i>C18:4n9</i>	0,42 $\pm$ 0,06 a	0,42 $\pm$ 0,05 a	0,43 $\pm$ 0,05 a	0,41 $\pm$ 0,03 a
<i>C20:2n6</i>	0,36 $\pm$ 0,02 a	0,31 $\pm$ 0,01 b	0,34 $\pm$ 0,01 ab	0,39 $\pm$ 0,02 a
<i>C20:3n6</i>	0,66 $\pm$ 0,03 a	0,56 $\pm$ 0,03 a	0,70 $\pm$ 0,06 a	0,87 $\pm$ 0,06 b
<i>C20:4n6</i>	5,97 $\pm$ 0,36 a	6,05 $\pm$ 0,38 a	6,28 $\pm$ 0,19 a	6,46 $\pm$ 0,36 a
<i>C20:5n3</i>	0,51 $\pm$ 0,05 a	0,49 $\pm$ 0,03 a	0,52 $\pm$ 0,02 a	0,50 $\pm$ 0,02 a
<i>C24</i>	0,29 $\pm$ 0,04 a	0,31 $\pm$ 0,02 a	0,34 $\pm$ 0,03 a	0,48 $\pm$ 0,04 b
<i>C22:4n6</i>	0,51 $\pm$ 0,03 a	0,55 $\pm$ 0,05 ab	0,63 $\pm$ 0,03 bc	0,72 $\pm$ 0,04 c
<i>C24:1n9</i>	0,91 $\pm$ 0,22 a	0,92 $\pm$ 0,11 a	0,92 $\pm$ 0,11 a	0,82 $\pm$ 0,08 a
<i>C22:5n6</i>	0,49 $\pm$ 0,03 a	0,47 $\pm$ 0,04 a	0,47 $\pm$ 0,01 a	0,52 $\pm$ 0,04 a
<i>C22:5n3</i>	0,52 $\pm$ 0,03 a	0,65 $\pm$ 0,10 a	0,58 $\pm$ 0,05 a	0,59 $\pm$ 0,05 a
<i>C22:6n3</i>	0,51 $\pm$ 0,20 a	0,82 $\pm$ 0,27 a	0,69 $\pm$ 0,07 a	0,58 $\pm$ 0,15 a



**Tabla 15** .- Media  $\pm$  E.E.M. de los índices grasos más relevantes en microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>AGS</i>	36,45 $\pm$ 0,82 a	36,02 $\pm$ 0,45 a	37,00 $\pm$ 0,58 ab	38,51 $\pm$ 0,43 b
<i>AGI</i>	63,55 $\pm$ 0,82 a	63,98 $\pm$ 0,45 a	63,00 $\pm$ 0,58 ab	61,49 $\pm$ 0,43 b
<i>AGM</i>	32,41 $\pm$ 1,11 ab	34,22 $\pm$ 1,91 a	30,27 $\pm$ 1,52 ab	28,11 $\pm$ 1,06 b
<i>AGD</i>	21,64 $\pm$ 0,92 a	19,14 $\pm$ 1,04 a	21,77 $\pm$ 1,09 a	22,09 $\pm$ 0,66 a
<i>AGP</i>	31,14 $\pm$ 0,69 ab	29,76 $\pm$ 1,53 b	32,74 $\pm$ 1,02 ab	33,38 $\pm$ 0,73 a
<i>AGM:AGD</i>	1,53 $\pm$ 0,12 ab	1,87 $\pm$ 0,23 a	1,44 $\pm$ 0,13 ab	1,29 $\pm$ 0,08 b
<i>AGM:AGP</i>	1,11 $\pm$ 0,06 ab	1,28 $\pm$ 0,17 a	1,00 $\pm$ 0,08 ab	0,89 $\pm$ 0,06 b
<i>AGP (n-6)</i>	28,46 $\pm$ 0,87 ab	26,77 $\pm$ 1,43 a	29,90 $\pm$ 1,09 ab	30,86 $\pm$ 0,63 b
<i>AGP (n-3)</i>	2,31 $\pm$ 0,26 a	2,55 $\pm$ 0,35 a	2,40 $\pm$ 0,16 a	2,16 $\pm$ 0,21 a
<i>AGP &gt;18C (n-6)</i>	7,02 $\pm$ 0,74 a	7,77 $\pm$ 0,49 ab	8,37 $\pm$ 0,20 ab	8,93 $\pm$ 0,43 b
<i>AGP &gt;18C (n-3)</i>	1,55 $\pm$ 0,27 a	1,96 $\pm$ 0,38 a	1,70 $\pm$ 0,16 a	1,67 $\pm$ 0,20 a
<i>II</i>	3,16 $\pm$ 0,12 a	3,24 $\pm$ 0,06 a	3,22 $\pm$ 0,03 a	3,08 $\pm$ 0,03 a

**Tabla 16** .- Media  $\pm$  E.E.M. de los resultados obtenidos en citosol de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>Glutación Peroxidasa</i> U/mg	2213,25 $\pm$ 187,72 b	1558,61 $\pm$ 206,85 a	1397,96 $\pm$ 181,95 a	1061,17 $\pm$ 102,54 a
<i>Superóxido Dismutasa</i> U/mg	5,69 $\pm$ 0,29 a	5,64 $\pm$ 0,33 a	5,15 $\pm$ 0,22 a	5,36 $\pm$ 0,33 a
<i>Catalasa</i> $\text{seg}^{-1} * \text{mg}^{-1}$	0,13 $\pm$ 0,02 a	0,12 $\pm$ 0,01 ab	0,10 $\pm$ 0,01 ab	0,09 $\pm$ 0,01 b
<i>Glutación Reductasa</i> U/mg	12,46 $\pm$ 0,71 a	12,40 $\pm$ 0,63 a	11,83 $\pm$ 1,11 a	10,94 $\pm$ 0,76 a

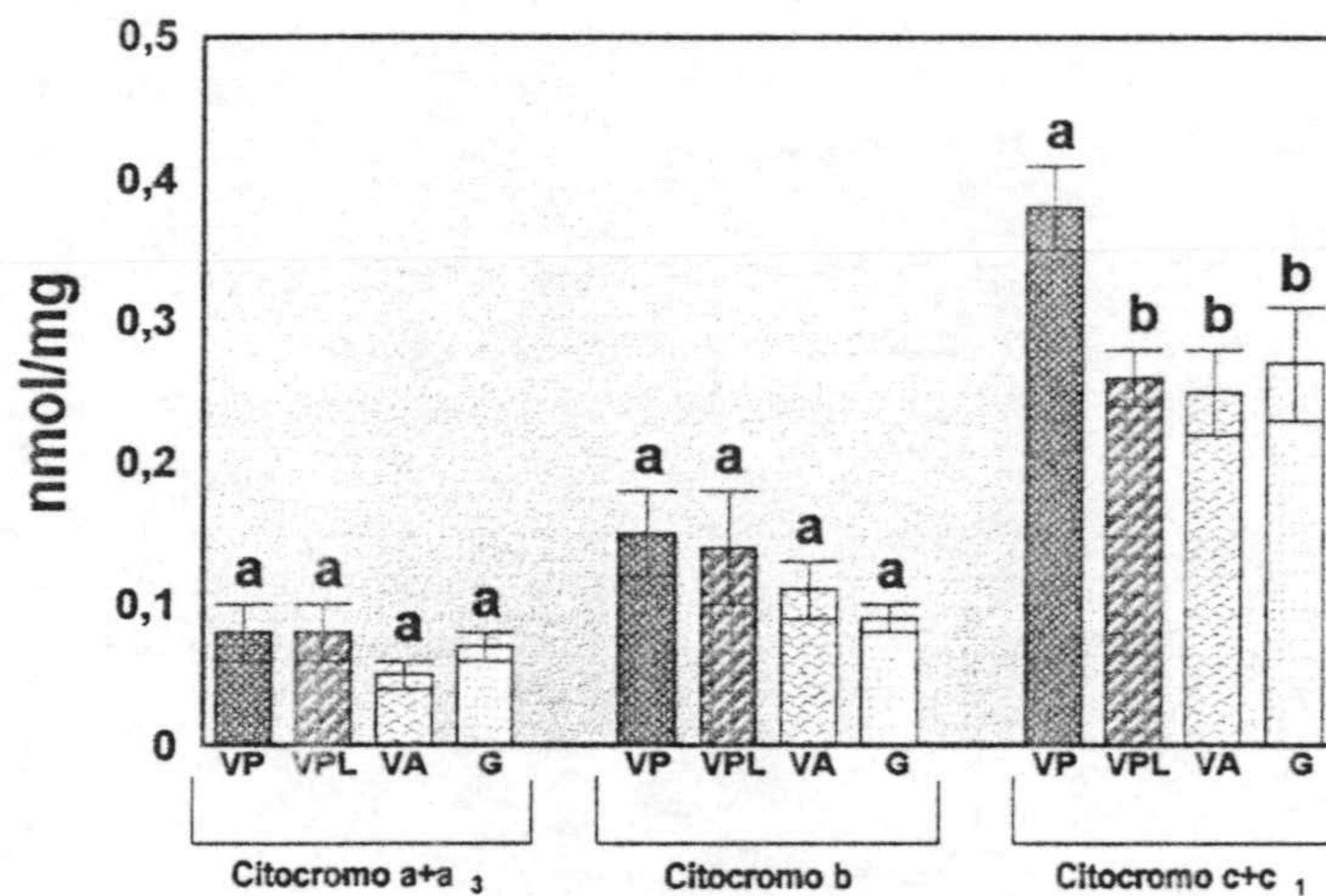


La sonda DPH no presenta diferencias significativas entre ninguno de los grupos ni en mitocondrias (*figura 13*) ni en microsomas (*figura 14*), aunque en ambos se observa una mayor fluidez o menor P en el grupo VP, sobre todo respecto al grupo G.

### 3.12.- Contenido en citocromo $a+a_3$ , b y $c+c_1$ de la cadena de transporte de electrones mitocondrial

Como se observa en la *tabla 10* y *figura 15* no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para el contenido en citocromo  $a+a_3$ , mostrando valores en todos los casos muy similares.

El citocromo b se comporta de igual manera que el  $a+a_3$ , no se encuentran diferencias significativas entre los grupos, aunque para este citocromo las diferencias entre



**Figura 15.-** Contenido de citocromos mitocondriales hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

los grupos son más marcadas, siendo los grupos VP y VPL los que mayor contenido presentan (*tabla 10* y *figura 15*).

El citocromo  $c+c_1$  vuelve a mantener la misma tendencia, aunque para este parámetro si se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo VP y los tres grupos restantes.

### 3.13.- Actividad específica y turnover de la citocromo oxidasa mitocondrial

Al igual que sucedía con el contenido en los citocromos anteriormente mencionados no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de estudios (*tabla 10* y *figura 16*).

El turnover no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo, aunque la tendencia es de un menor turnover en los grupos VP y VPL con respecto a los otros dos grupos (*tabla 10*, *figura 16*).



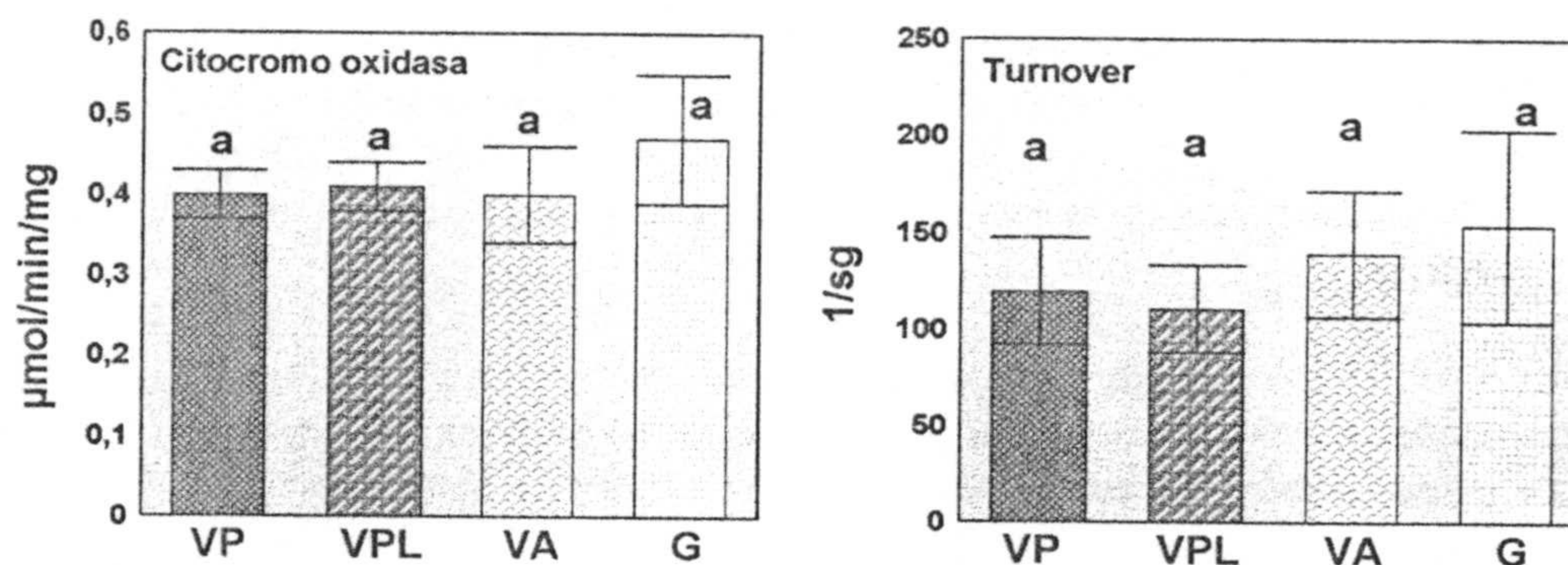


Figura 16.- Actividad de la citocromo oxidasa y turnover en mitocondrias de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.14.- Actividad de la catalasa en citosol

Como se muestra en la figura 17 y tabla 16, se observan diferencias significativas entre los grupos VP y G para la actividad de este enzima citosólico. En general los grupos VP y VPL son los que presentan mayor actividad, siendo el grupo G el que menor actividad muestra.

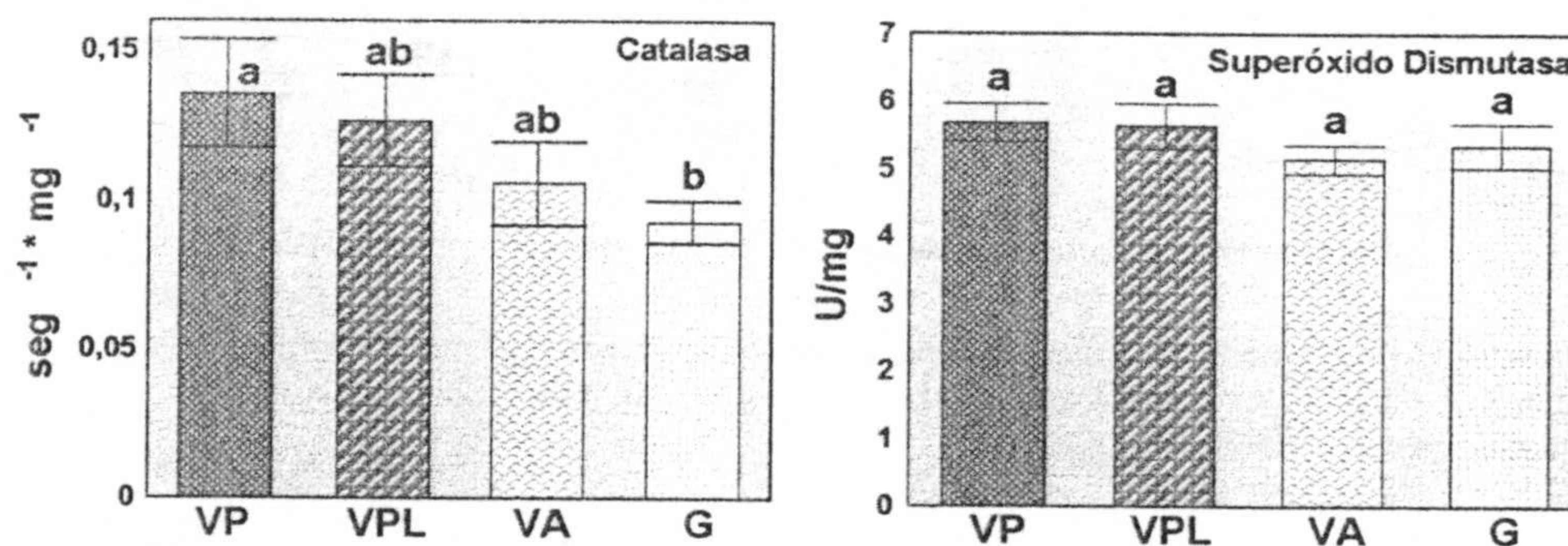


Figura 17.- Actividad de la catalasa y superóxido dismutasa en citosol de hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.15.- Actividad de la superóxido dismutasa en citosol

Esta enzima citosólica no muestra diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de estudio, tal y como se observa en la figura 17 y tabla 16, aunque



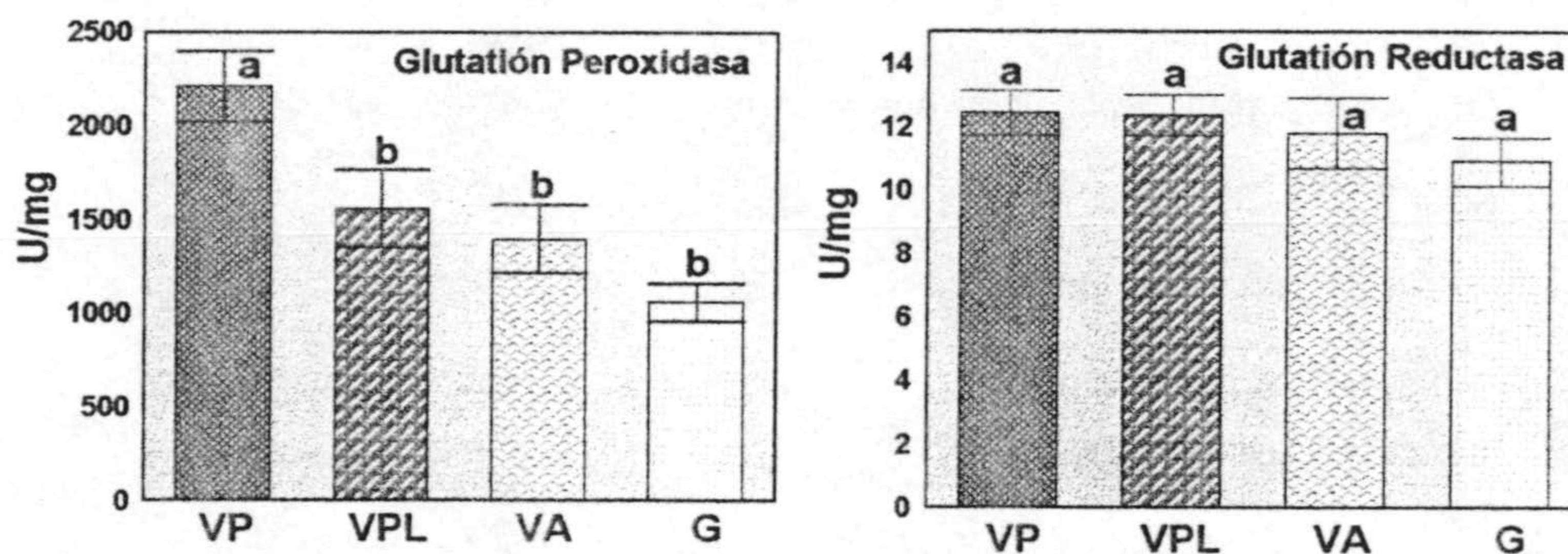
se ve una actividad ligeramente mayor en los grupos VP y VPL.

### 3.16.- Actividad de la glutación peroxidasa en citosol

Como se observa en la *figura 18 y tabla 16*, es el grupo VP el que presenta una mayor actividad de esta enzima citosólica, existiendo diferencias estadísticamente significativas con los otros tres grupos, siendo el grupo G el que menor actividad muestra, menos del 50% que el grupo VP.

### 3.17.- Actividad de la glutación reductasa en citosol

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de



*Figura 18*.- Actividad de la glutación peroxidasa y glutación reductasa en citosol hepático. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

estudio para este enzima (*figura 18 y tabla 16*), aunque si se observa un menor valor para el grupo G, siendo los grupos VP y VPL los que mayor valor presentan.



#### 4.- RESULTADOS DE LA ANALÍTICA REALIZADA EN CORAZÓN

##### 4.1.- Peso de los corazones

Como se puede observar en la *tabla 17*, son los animales del grupo VP los que presentan un peso medio de órgano más bajo mostrando diferencias estadísticamente significativas con el grupo VA, siendo este el de mayor peso medio de órgano.

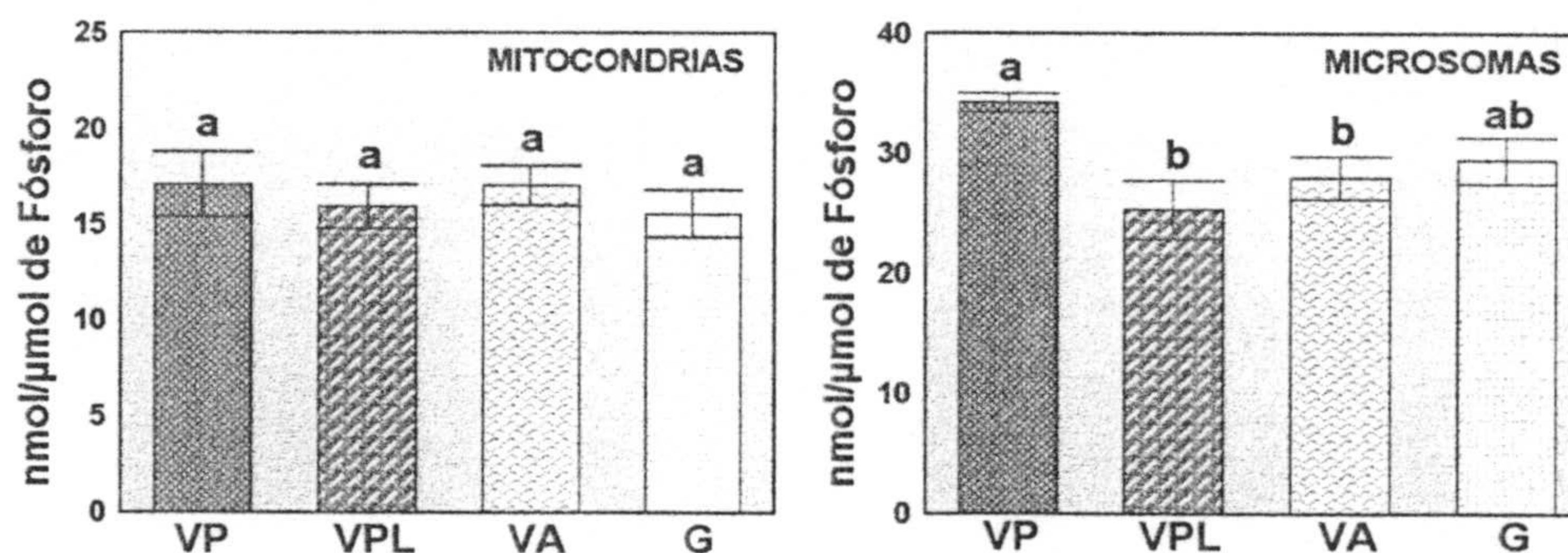
##### 4.2.- Proteínas mitocondriales y microsomales

Como se muestra en la *tabla 17*, las proteínas de mitocondrias de corazón no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aunque sí un mayor valor en los grupos VP y G.

En microsomas si se observan diferencias significativas (*tabla 18*) manteniendo la tendencia existente en mitocondrias, siendo el grupo VP el que muestra un mayor nivel de proteínas, existiendo diferencias significativas con los grupos VPL y VA.

##### 4.3.- Nivel de TBARS en mitocondrias y microsomas

En mitocondrias los niveles de TBARS no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo (*tabla 17 y figura 18*), siendo los valores muy similares entre sí.



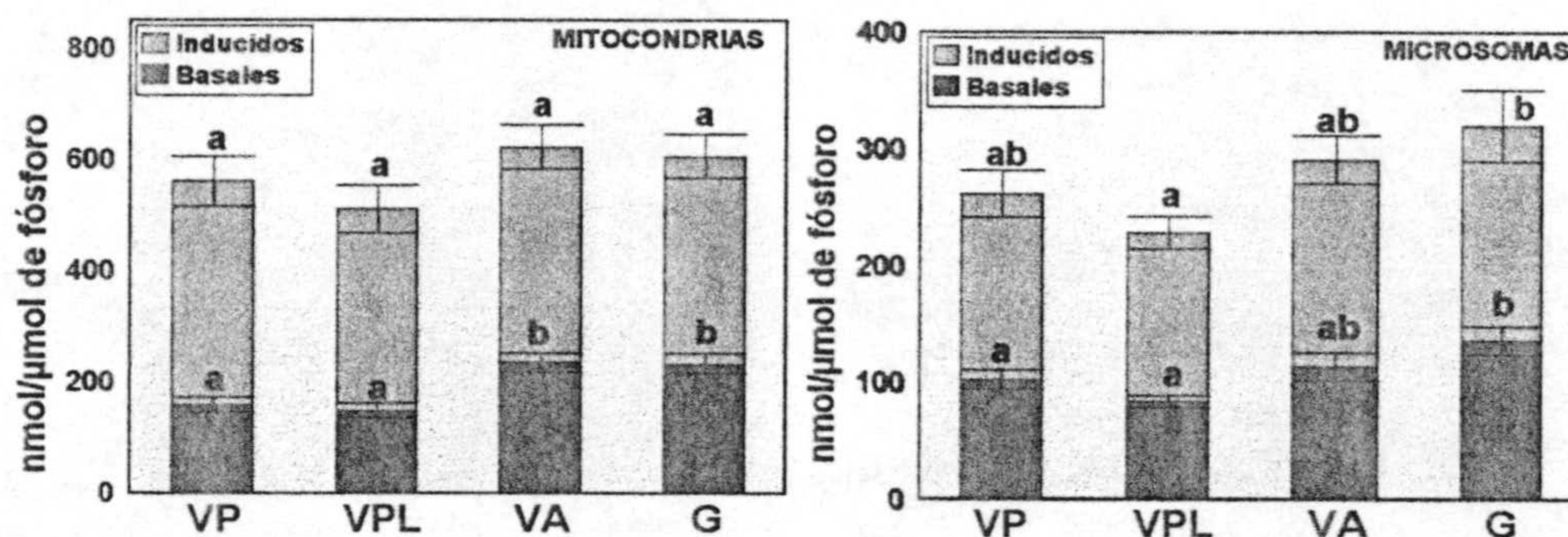
**Figura 18**.- Niveles de TBARS existentes en mitocondrias y microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En microsomas si se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (*tabla 18 y figura 18*), siendo el grupo VP el que mayor valor muestra, presentando diferencias significativas con los grupos VPL y VA.



#### 4.4.- Niveles de hidropéroxidos basales e inducidos en mitocondrias y microsomas

En mitocondrias de corazón, como se muestra en la *tabla 17* y *figura 19*, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, existiendo un valor mayor en los grupos VA y G.



**Figura 19** .- Nivel de hidropéroxidos basales e inducidos en mitocondrias y microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Lo mismo sucede para los valores inducidos, pero sin que existan diferencias significativas entre los grupos (*tabla 17* y *figura 19*).

En microsomas se mantiene la tendencia anterior salvo que en este orgánulo sólo se encuentran diferencias significativas entre los grupos VPL y G (*tabla 18* y *figura 19*), manteniéndose esas diferencias en el nivel de hidropéroxidos inducidos.

#### 4.5.- Nivel de fósforo en mitocondrias y microsomas

El nivel de fósforo en mitocondrias no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (*tabla 17*), aunque se observan ligeras diferencias sobre todo en el grupo VPL (máximo valor).

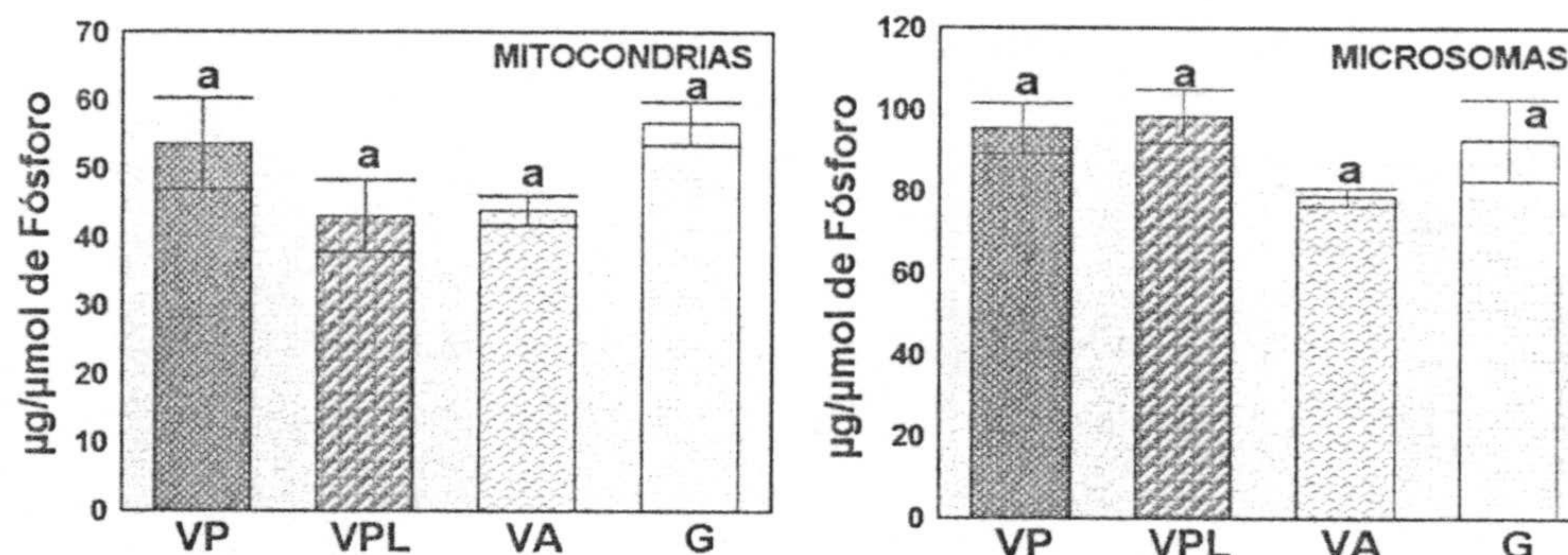
En microsomas es el grupo VP el que menor valor muestra para el fósforo, existiendo diferencias significativas entre este grupo y los tres restantes (*tabla 18*).

#### 4.6.- Colesterol en mitocondrias y microsomas

En la *tabla 17* y *figura 20* se indican los resultados obtenidos para el colesterol en mitocondrias, no hallándose diferencias significativas entre los grupos, aunque si un máximo valor en los grupos G y VP.



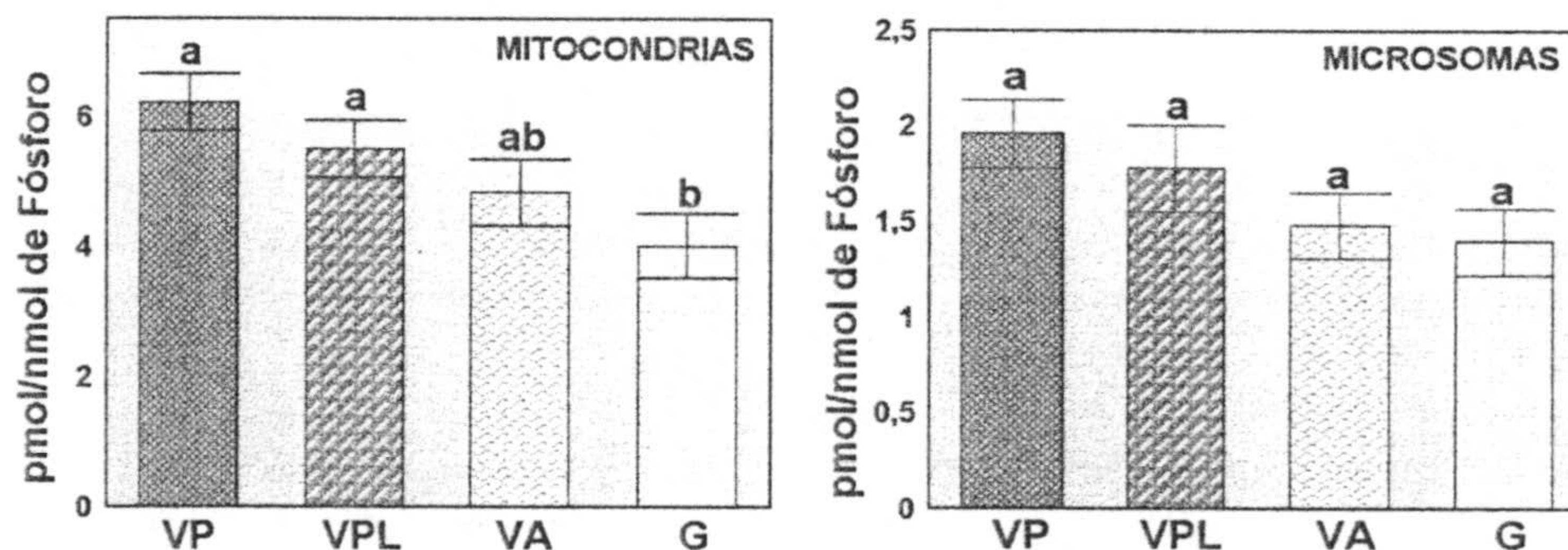
En microsomas tampoco existen diferencias significativas siendo en este caso el grupo VA el que menor valor presenta (*tabla 18 y figura 20*).



**Figura 20** .- Niveles de colesterol mitocondrial y microsomal en hígado. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.- Niveles de ubiquinonas 9 y 10 en mitocondrias y microsomas de corazón

Los valores obtenidos para la ubiquinona 10 en mitocondrias de corazón se muestran en la *tabla 17* y la *figura 21*, observándose en general un menor nivel de ubiquinona en el grupo G con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos VP y VPL, tanto al expresarlos por mg de proteína (*tabla 17*) como por fósforo (*figura 21*).



**Figura 21** .- Niveles de ubiquinona 10 en mitocondrias y microsomas. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

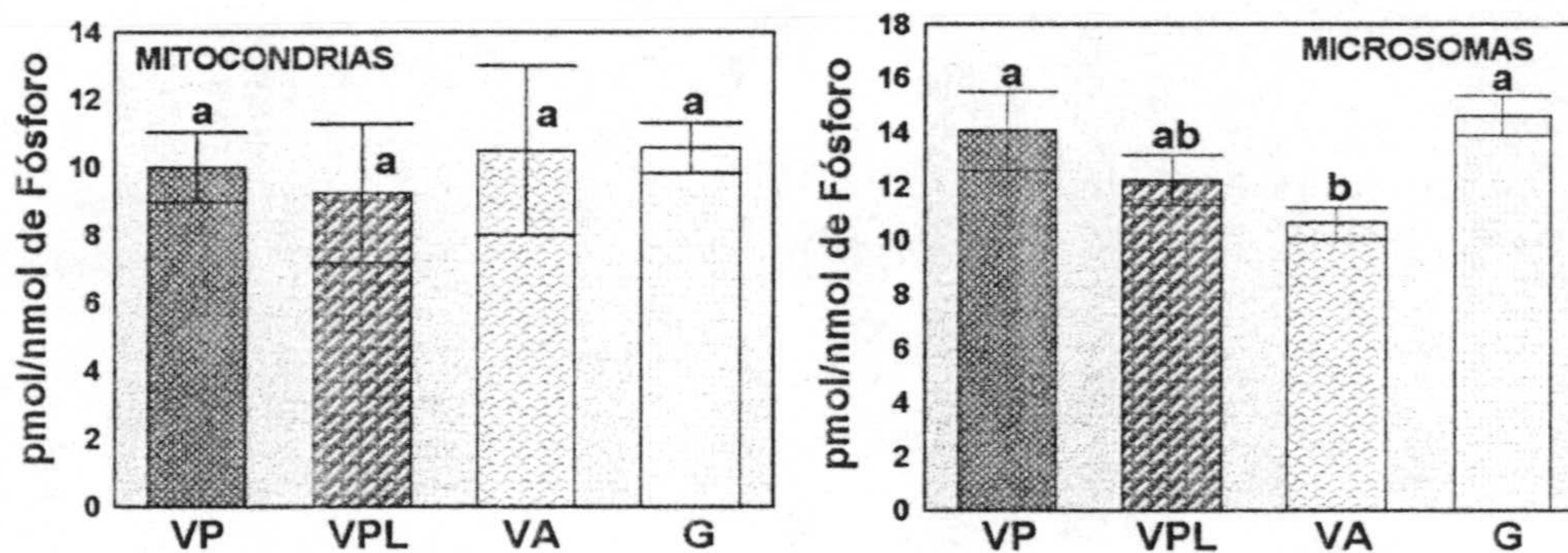


En microsomas se mantiene la misma tendencia que se ha observado en mitocondrias un mayor nivel de ubiquinona 10 en los grupos VP y VPL y menor en los grupos VA y G. Sin embargo en este caso no se observan diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio, ni al expresar los resultados por mg de proteína (*tabla 18*), ni al expresarlos por pmol de fósforo (*figura 21*).

La ubiquinona 9 en mitocondrias de corazón, mantiene la misma tendencia seguida por la ubiquinona 10, con un máximo valor encontrado en el grupo VP, mostrando diferencias significativas con los grupos VA y G (*tabla 17*).

#### 4.8.- Contenido en $\alpha$ -tocoferol en mitocondrias y microsomas

El contenido en  $\alpha$ -tocoferol en mitocondrias de corazón se muestra en la *tabla 17* y *figura 22*, para este parámetro no se observan diferencias significativas entre los grupos, siendo los valores muy similares entre ellos.



*Figura 22* .- Valores de  $\alpha$ -tocoferol en mitocondrias y microsomas hepáticos. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En microsomas, si se encuentran diferencias significativas, siendo el grupo VA el que menor valor presenta, mostrando diferencias significativas con los grupos VP y G (*tabla 18* y *figura 22*).

#### 4.9.- Perfil lipídico en mitocondrias de corazón

El perfil lipídico de la mitocondrias de corazón y los índices grasos más relevantes se muestran en las *tablas 19* y *20*.



**Tabla 17.** - Media  $\pm$  E.E.M. de los parámetros analizados en mitocondrias de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

		PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>Peso Corazón</i>	g	4,74 $\pm$ 0,37 a	5,25 $\pm$ 0,25 ab	6,12 $\pm$ 0,40 b	5,62 $\pm$ 0,18 ab
<i>Proteínas</i>	$\mu$ g/nmol de Fósforo	6,10 $\pm$ 0,46 a	5,47 $\pm$ 0,24 a	5,76 $\pm$ 0,19 a	6,15 $\pm$ 0,19 a
<i>TBARS</i>	nmol/ $\mu$ mol de Fósforo	17,09 $\pm$ 1,71 a	15,95 $\pm$ 1,14 a	17,02 $\pm$ 1,05 a	15,56 $\pm$ 1,24 a
<i>Hidroperóxidos (To)</i>	nmol/ $\mu$ mol de Fósforo	159,71 $\pm$ 14,48 a	148,17 $\pm$ 13,50 a	235,33 $\pm$ 17,58 b	233,10 $\pm$ 18,44 b
<i>Hidroperóxidos (TI)</i>	nmol/ $\mu$ mol de Fósforo	561,28 $\pm$ 44,64 a	512,15 $\pm$ 43,12 a	623,42 $\pm$ 39,89 a	606,85 $\pm$ 39,65 a
<i>Colesterol</i>	$\mu$ g/ $\mu$ mol de Fósforo	53,73 $\pm$ 6,58 a	43,19 $\pm$ 5,33 a	43,95 $\pm$ 2,21 a	56,77 $\pm$ 3,19 a
<i>Ubiquinona 10</i>	nmol/mg	1,04 $\pm$ 0,07 a	1,01 $\pm$ 0,09 a	0,85 $\pm$ 0,09 ab	0,66 $\pm$ 0,08 b
<i>Ubiquinona 9</i>	pmol/nmol de Fósforo	0,55 $\pm$ 0,06 a	0,47 $\pm$ 0,05 ab	0,35 $\pm$ 0,05 b	0,36 $\pm$ 0,03 b
<i>Tocoferol</i>	pmol/nmol de Fósforo	10,02 $\pm$ 1,03 a	9,25 $\pm$ 2,05 a	10,52 $\pm$ 2,50 a	10,59 $\pm$ 0,74 a
<i>Citocromo a + a<sub>3</sub></i>	nmol/mg	0,17 $\pm$ 0,02 ac	0,28 $\pm$ 0,05 b	0,27 $\pm$ 0,03 bc	0,18 $\pm$ 0,03 c
<i>Citocromo b</i>	nmol/mg	0,18 $\pm$ 0,02 a	0,20 $\pm$ 0,02 a	0,19 $\pm$ 0,03 a	0,16 $\pm$ 0,03 a
<i>Citocromo c + c<sub>1</sub></i>	nmol/mg	0,36 $\pm$ 0,03 ab	0,40 $\pm$ 0,04 a	0,37 $\pm$ 0,03 ab	0,29 $\pm$ 0,03 b
<i>Citocromo oxidasa</i>	$\mu$ mol/min/mg	0,52 $\pm$ 0,04 a	0,51 $\pm$ 0,04 a	0,45 $\pm$ 0,05 ab	0,36 $\pm$ 0,03 b
<i>Turnover</i>	1/seg	53,61 $\pm$ 5,02 a	35,74 $\pm$ 6,19 b	28,82 $\pm$ 2,66 b	37,46 $\pm$ 4,99 b



*Tabla 18* .- Media  $\pm$  E.E.M. de los parámetros analizados en microsomas de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

		PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>Proteínas</i>	$\mu\text{g/nmol}$ de Fósforo	$5,73 \pm 0,19$ a	$4,76 \pm 0,36$ b	$4,73 \pm 0,36$ b	$5,32 \pm 0,19$ ab
<i>TBARS</i>	$\text{nmol}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$34,30 \pm 0,79$ a	$25,39 \pm 2,46$ b	$28,04 \pm 1,81$ b	$29,49 \pm 1,91$ ab
<i>Hidroperóxidos (To)</i>	$\text{nmol}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$102,76 \pm 8,26$ a	$84,16 \pm 4,92$ a	$113,85 \pm 11,85$ ab	$136,57 \pm 12,26$ b
<i>Hidroperóxidos (T1)</i>	$\text{nmol}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$261,35 \pm 19,89$ ab	$229,32 \pm 13,91$ a	$291,00 \pm 20,36$ ab	$320,15 \pm 30,35$ b
<i>Colesterol</i>	$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de Fósforo	$95,50 \pm 6,26$ a	$98,56 \pm 6,53$ a	$78,90 \pm 2,27$ a	$92,86 \pm 9,91$ a
<i>Ubiquinona 10</i>	$\text{nmol}/\text{mg}$	$0,34 \pm 0,03$ a	$0,38 \pm 0,05$ a	$0,31 \pm 0,03$ a	$0,27 \pm 0,03$ a
<i>Tocoferol</i>	$\text{pmol}/\text{nmol}$ de Fósforo	$14,08 \pm 1,46$ a	$12,25 \pm 0,94$ ab	$10,66 \pm 0,60$ b	$14,65 \pm 0,75$ a



a.- Ácidos grasos saturados

Dentro de los ácidos grasos de este grupo se observa que el C14, C22 y C24 presentan el valor máximo en el grupo G, en el caso del C22 y del C24 se encuentran diferencias significativas con todos los grupos, mientras que en el caso del C14 con el grupo VPL. El C16 muestra un valor mínimo en el grupo VPL con diferencias significativas respecto al resto de grupos (*tabla 19*).

El índice correspondiente a este grupo, AGS (*tabla 20*), muestra máximos valores en los grupos VA y G con diferencias significativas respecto al grupo VPL.

b.- Ácidos grasos insaturados

b.1.- Ácidos grasos monoinsaturados

En este grupo se observa bastante heterogeneidad; así, el C16:1n-9 no muestra diferencias significativas entre los grupos, mientras que el C16:1n-7 y el C18:1n-7 valores máximos en el grupo VA, siendo a su vez este grupo el que menor valor obtiene para el C24:1n-9 (*tabla 19*).

El C18:1n-9, ácido graso mayoritario, presenta valores máximos en los grupos VP y VPL con diferencias significativas respecto al grupo VA.

El índice AGM (*tabla 20*) no muestra diferencias significativas entre los grupos.

b.2.- Ácidos grasos poliinsaturados

En el caso de los ácidos grasos diinsaturados, C18:2n-6 y C20:2n-6, (*tabla 19*) se observa la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas, lo cual se refleja igualmente en el índice AGD (*tabla 20*) correspondiente. La relación AGM:AGD tampoco muestra diferencias significativas entre los grupos.

Los ácidos grasos correspondientes a la serie n-3 de este grupo (*tabla 19*), muestran salvo en el caso del C18:3n-3 un máximo valor en el grupo VPL con diferencias significativas en el caso del C20:5n-3 con los tres grupos restantes, el C22:5n-3 con el grupo VP y G y el C22:6n-3 con el grupo G, el C18:3n-3 muestra, al contrario, su valor mínimo en los grupos VPL y G. El índice AGP (n-3) (*tabla 20*) presenta el valor mínimo en el grupo G con diferencias significativas respecto a los otros grupos y el índice AGP>18(n-3) un valor máximo en el grupo VPL y mínimo en el grupo G.

De los restantes ácidos grasos de la serie n-6 (*tabla 19*) se observa que los ácidos grasos C20:3n-6, C20:4n-6 y C22:4n-6 no muestran diferencias significativas entre los



grupos, mientras que el C22:5n-6 encuentra un valor máximo en el grupo VP con diferencias significativas respecto al grupo G. Los índices correspondientes AGP (n-6) y AGP>18(n-6) (*tabla 20*) no muestran diferencias significativas entre los grupos.

El C18:4n-9 obtiene un valor mínimo en el grupo VP con diferencias significativas respecto al grupo G.

El índice AGP al igual que el índice AGM:AGP no muestran diferencias significativas entre los grupos, mientras que el índice AGI muestra un valor máximo en el grupo VPL con diferencias significativas respecto a los grupos VA y G. Por último el índice II presenta el valor máximo en el grupo VPL con diferencias significativas respecto a los grupos restantes.

#### 4.10.- Perfil lipídico en microsomas de corazón

El perfil lipídico de la mitocondrias de corazón y los índices grasos más representativos se muestran en las *tablas 21* y *22*.

##### a.- Ácidos grasos saturados

El C14 y C18 no muestran diferencias entre los grupos (*tabla 21*), el C16 presenta un máximo valor en el grupo VA con diferencias significativas respecto al VP y VPL, mientras que el C22 y C24 el máximo valor en el grupo G.

El índice correspondiente, AGS (*tabla 22*), obtiene un valor máximo en los grupos VA y G con diferencias significativas respecto al grupo VPL.

##### b.- Ácidos grasos insaturados

##### b.1.- Ácidos grasos monoinsaturados

El C16:1n-9 y el C18:1n-9 muestran un valor máximo en el grupo VPL, mientras que los de la serie n-7, C16:1n-7 y C18:1n-7 en el grupo VA. Por su parte el C24:1n-9 es máximo en el grupo VP y VPL.

El índice correspondiente, AGM (*tabla 22*), presenta su máximo en el grupo VPL.

##### b.2.- Ácidos grasos poliinsaturados

Los correspondientes ácidos grasos diinsaturados, C18:2n-6 y C20:2n-6 (*tabla 21*), son máximos en el grupo G, con diferencias significativas en el caso del C18:2n-6 con los grupos VP y VPL y en el caso del C20:2n-6 con el VP y VA.



**Tabla 19.-** Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos analizados en mitocondrias de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,41 $\pm$ 0,08 ab	0,25 $\pm$ 0,03 a	0,60 $\pm$ 0,19 ab	0,61 $\pm$ 0,16 b
<i>C16</i>	14,85 $\pm$ 0,57 b	13,36 $\pm$ 0,42 a	15,25 $\pm$ 0,46 b	15,05 $\pm$ 0,57 b
<i>C16:1n9</i>	0,42 $\pm$ 0,02 a	0,42 $\pm$ 0,04 a	0,36 $\pm$ 0,01 a	0,37 $\pm$ 0,02 a
<i>C16:1n7</i>	1,74 $\pm$ 0,18 ab	1,18 $\pm$ 0,08 a	2,08 $\pm$ 0,25 b	1,66 $\pm$ 0,20 ab
<i>C18</i>	9,99 $\pm$ 0,39 a	10,41 $\pm$ 0,24 a	10,15 $\pm$ 0,21 a	10,29 $\pm$ 0,16 a
<i>C18:1n9</i>	29,86 $\pm$ 0,62 a	29,57 $\pm$ 1,27 a	26,64 $\pm$ 0,46 b	27,80 $\pm$ 0,87 ab
<i>C18:1n7</i>	2,81 $\pm$ 0,08 ac	2,95 $\pm$ 0,07 a	3,41 $\pm$ 0,07 b	2,60 $\pm$ 0,07 c
<i>C18:2n6</i>	22,63 $\pm$ 0,39a	22,82 $\pm$ 0,78 a	24,13 $\pm$ 0,77 a	24,51 $\pm$ 0,73 a
<i>C18:3n3</i>	0,72 $\pm$ 0,07 a	0,52 $\pm$ 0,04 b	0,68 $\pm$ 0,03 ac	0,54 $\pm$ 0,04 c
<i>C18:4n9</i>	0,39 $\pm$ 0,02 a	0,41 $\pm$ 0,02 ab	0,45 $\pm$ 0,01 ab	0,46 $\pm$ 0,02 b
<i>C20:2n6</i>	0,25 $\pm$ 0,01 a	0,25 $\pm$ 0,01 a	0,28 $\pm$ 0,02 a	0,28 $\pm$ 0,02 a
<i>C20:3n6</i>	0,54 $\pm$ 0,02 a	0,51 $\pm$ 0,02 a	0,53 $\pm$ 0,04 a	0,51 $\pm$ 0,04 a
<i>C22</i>	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,19 $\pm$ 0,02 a	0,13 $\pm$ 0,01 b	0,31 $\pm$ 0,02 c
<i>C20:4n6</i>	11,87 $\pm$ 0,68 a	13,44 $\pm$ 0,46 a	12,87 $\pm$ 0,61 a	12,17 $\pm$ 0,62 a
<i>C20:5n3</i>	0,40 $\pm$ 0,02 a	0,50 $\pm$ 0,03 b	0,39 $\pm$ 0,03 a	0,32 $\pm$ 0,02 a
<i>C24</i>	0,21 $\pm$ 0,02 a	0,21 $\pm$ 0,02 a	0,24 $\pm$ 0,01 a	0,30 $\pm$ 0,02 b
<i>C22:4n6</i>	0,44 $\pm$ 0,02 a	0,41 $\pm$ 0,01 a	0,38 $\pm$ 0,02 a	0,41 $\pm$ 0,02 a
<i>C24:1n9</i>	0,74 $\pm$ 0,12 a	0,77 $\pm$ 0,12 a	0,28 $\pm$ 0,01 b	0,65 $\pm$ 0,10 a
<i>C22:5n6</i>	0,49 $\pm$ 0,04 a	0,42 $\pm$ 0,01 ab	0,41 $\pm$ 0,01 b	0,37 $\pm$ 0,02 b
<i>C22:5n3</i>	0,86 $\pm$ 0,04 b	1,06 $\pm$ 0,14 a	0,92 $\pm$ 0,04 ab	0,78 $\pm$ 0,06 b
<i>C22:6n3</i>	0,36 $\pm$ 0,07 ab	0,41 $\pm$ 0,04 a	0,28 $\pm$ 0,01 ab	0,24 $\pm$ 0,02 b



*Tabla 20* .- Media  $\pm$  E.E.M. de los índices grasos más relevantes en mitocondrias de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>AGS</i>	25,46 $\pm$ 0,26 ab	24,40 $\pm$ 0,37 a	26,09 $\pm$ 0,41 b	26,56 $\pm$ 0,63 b
<i>AGI</i>	74,54 $\pm$ 0,26 ab	75,60 $\pm$ 0,37 a	73,91 $\pm$ 0,41 b	73,44 $\pm$ 0,63 b
<i>AGM</i>	35,57 $\pm$ 0,79 a	34,89 $\pm$ 1,31 a	32,58 $\pm$ 0,82 a	33,00 $\pm$ 0,88 a
<i>AGD</i>	22,88 $\pm$ 0,39 a	23,04 $\pm$ 0,80 a	24,41 $\pm$ 0,78 a	24,76 $\pm$ 0,74 a
<i>AGP</i>	38,97 $\pm$ 0,99 a	40,70 $\pm$ 1,11 a	41,33 $\pm$ 1,21 a	40,44 $\pm$ 1,28 a
<i>AGM:AGD</i>	1,56 $\pm$ 0,06 a	1,54 $\pm$ 0,12 a	1,35 $\pm$ 0,07 a	1,35 $\pm$ 0,07 a
<i>AGM:AGP</i>	0,98 $\pm$ 0,05 a	0,90 $\pm$ 0,06 a	0,85 $\pm$ 0,05 a	0,87 $\pm$ 0,06 a
<i>AGP (n-6)</i>	36,23 $\pm$ 1,03 a	37,82 $\pm$ 1,02 a	38,61 $\pm$ 1,26 a	38,21 $\pm$ 1,26 a
<i>AGP (n-3)</i>	2,35 $\pm$ 0,09 a	2,48 $\pm$ 0,17 a	2,27 $\pm$ 0,06 a	1,77 $\pm$ 0,12 b
<i>AGP &gt;18C (n-6)</i>	13,60 $\pm$ 0,61 a	15,00 $\pm$ 0,48 a	14,48 $\pm$ 0,61 a	13,60 $\pm$ 0,64 a
<i>AGP &gt;18C (n-3)</i>	1,62 $\pm$ 0,10 ab	1,96 $\pm$ 0,17 a	1,59 $\pm$ 0,08 b	1,23 $\pm$ 0,12 c
<i>II</i>	5,78 $\pm$ 0,16 b	6,30 $\pm$ 0,13 a	5,78 $\pm$ 0,19 b	5,53 $\pm$ 0,23 b



El índice correspondiente, AGD (*tabla 22*), muestra un valor máximo en el grupo G con diferencias significativas respecto a los grupos VP y VPL. La relación AGM:AGD refleja la tendencia observada existiendo diferencias significativas entre el grupo VPL y los grupos VA y G y el grupo VP y el grupo G.

Los de la serie n-3 de este grupo (*tabla 21*) de este grupo muestran, que salvo en el caso del C20:5n-3, no existen diferencias significativas entre los grupos, para este ácido graso el máximo valor se encuentra en el grupo VP mostrando diferencias significativas con los tres grupos restantes. Los índices AGP (n-3) y AGP>18(n-3) muestran el valor máximo en el grupo G con diferencias respecto a los otros grupos.

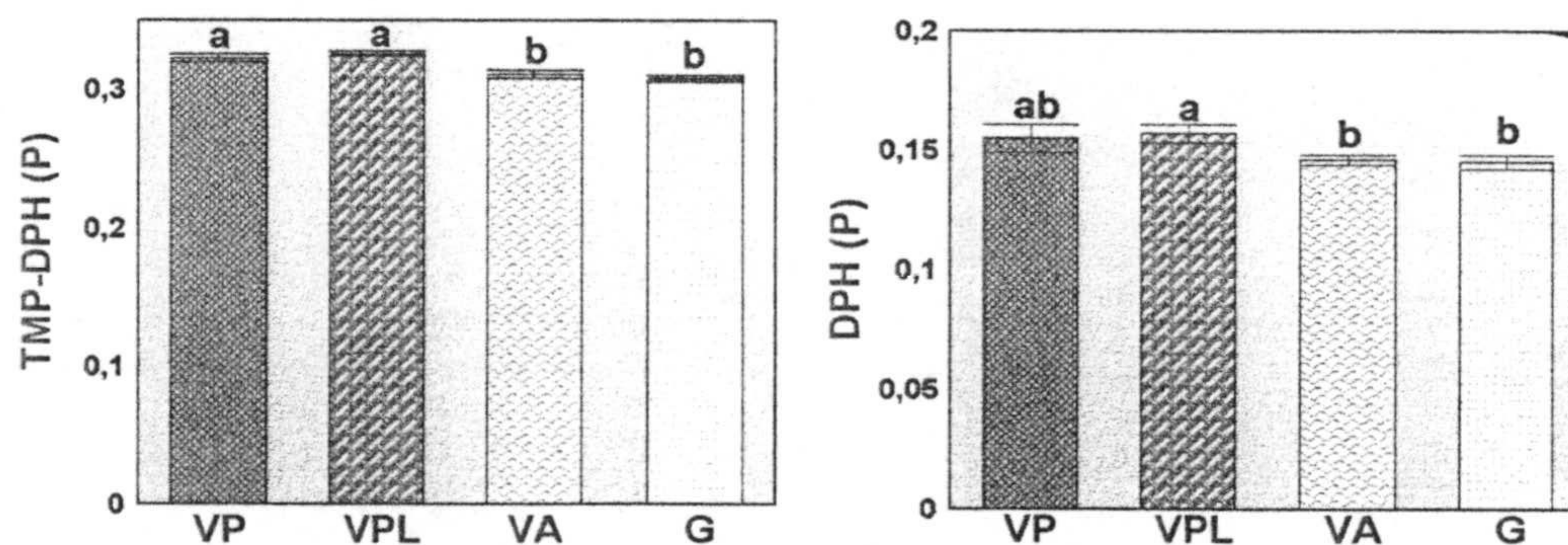
Para los restantes ácidos grasos de la serie n-6 encontramos que el C20:3n-6 y el C20:4n-6, no indican diferencias significativas entre los grupos, el C22:4n-6 muestra un valor máximo en el grupo G, mientras que el C22:5n-6 en el grupo VA. El AGP(n-6) (*tabla 22*) muestra su máximo valor en el grupo G con diferencias significativas respecto al grupo VPL, mientras que el índice AGP>18(n-6) no presenta diferencias significativas entre los grupos.

El C18:4n-9 no obtiene diferencias significativas entre los grupos.

El índice AGI muestra un máximo valor en el grupo VPL con diferencias significativas respecto a los grupos VA y G.

El índice AGP no presenta diferencias significativas y el índice AGM:AGP un valor máximo en el grupo VPL con diferencias respecto al grupo G. El índice II obtiene un valor máximo en el grupo VPL con diferencias significativas respecto a los grupos VA y G.

#### 4.11.- Polarización de fluorescencia en mitocondrias y microsomas



**Figura 23** .- Polarización de fluorescencia en mitocondrias de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



Tabla 21 .- Media  $\pm$  E.E.M. de los ácidos grasos analizados en microsomas de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
<i>C14</i>	0,29 $\pm$ 0,01 a	0,28 $\pm$ 0,02 a	0,35 $\pm$ 0,04 a	0,38 $\pm$ 0,11 a
<i>C16</i>	15,81 $\pm$ 0,55 a	15,90 $\pm$ 0,47 a	17,46 $\pm$ 0,36 b	16,46 $\pm$ 0,45 ab
<i>C16:1n9</i>	0,40 $\pm$ 0,02 ab	0,44 $\pm$ 0,03 a	0,34 $\pm$ 0,02 b	0,36 $\pm$ 0,01 b
<i>C16:1n7</i>	1,06 $\pm$ 0,13 ab	0,98 $\pm$ 0,10 a	1,57 $\pm$ 0,12 b	1,17 $\pm$ 0,10 a
<i>C18</i>	13,19 $\pm$ 0,31 a	12,61 $\pm$ 0,30 a	12,32 $\pm$ 0,32 a	13,05 $\pm$ 0,24 a
<i>C18:1n9</i>	26,55 $\pm$ 0,56 ab	28,30 $\pm$ 0,75 a	24,47 $\pm$ 0,94 bc	24,06 $\pm$ 0,61 c
<i>C18:1n7</i>	2,78 $\pm$ 0,09 a	2,75 $\pm$ 0,05 a	2,96 $\pm$ 0,10 a	2,52 $\pm$ 0,07 b
<i>C18:2n6</i>	17,58 $\pm$ 0,32a	17,19 $\pm$ 0,74 a	18,68 $\pm$ 0,59 ab	19,46 $\pm$ 0,50 b
<i>C18:3n3</i>	0,48 $\pm$ 0,05 a	0,47 $\pm$ 0,02 a	0,54 $\pm$ 0,03 a	0,44 $\pm$ 0,03 a
<i>C18:4n9</i>	0,48 $\pm$ 0,02 a	0,49 $\pm$ 0,02 a	0,50 $\pm$ 0,02 a	0,53 $\pm$ 0,01 a
<i>C20:2n6</i>	0,27 $\pm$ 0,01 a	0,31 $\pm$ 0,01 ab	0,29 $\pm$ 0,02 a	0,34 $\pm$ 0,01 b
<i>C20:3n6</i>	0,75 $\pm$ 0,03 a	0,73 $\pm$ 0,03 a	0,68 $\pm$ 0,04 a	0,76 $\pm$ 0,03 a
<i>C22</i>	1,34 $\pm$ 0,09 a	0,97 $\pm$ 0,06 b	1,10 $\pm$ 0,07 ab	2,01 $\pm$ 0,15 c
<i>C20:4n6</i>	13,73 $\pm$ 0,64 a	13,53 $\pm$ 0,49 a	13,54 $\pm$ 0,57 a	14,18 $\pm$ 0,61 a
<i>C20:5n3</i>	0,88 $\pm$ 0,03 a	0,73 $\pm$ 0,03 b	0,77 $\pm$ 0,04 b	0,65 $\pm$ 0,05 b
<i>C24</i>	0,46 $\pm$ 0,01 a	0,41 $\pm$ 0,02 a	0,45 $\pm$ 0,01 a	0,58 $\pm$ 0,03 b
<i>C22:4n6</i>	0,64 $\pm$ 0,02 ab	0,59 $\pm$ 0,02 b	0,67 $\pm$ 0,01 ac	0,76 $\pm$ 0,03 c
<i>C24:1n9</i>	1,26 $\pm$ 0,09 a	1,25 $\pm$ 0,11 a	1,10 $\pm$ 0,07 ab	0,90 $\pm$ 0,10 b
<i>C22:5n6</i>	0,51 $\pm$ 0,03 ab	0,54 $\pm$ 0,02 ab	0,57 $\pm$ 0,01 a	0,49 $\pm$ 0,02 b
<i>C22:5n3</i>	1,17 $\pm$ 0,03 a	1,12 $\pm$ 0,06 a	1,21 $\pm$ 0,06 a	1,10 $\pm$ 0,06 a
<i>C22:6n3</i>	0,40 $\pm$ 0,03 a	0,36 $\pm$ 0,03 a	0,42 $\pm$ 0,08 a	0,33 $\pm$ 0,07 a



Tabla 22.- Media  $\pm$  E.E.M. de los índices grasos más relevantes en microsomas de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

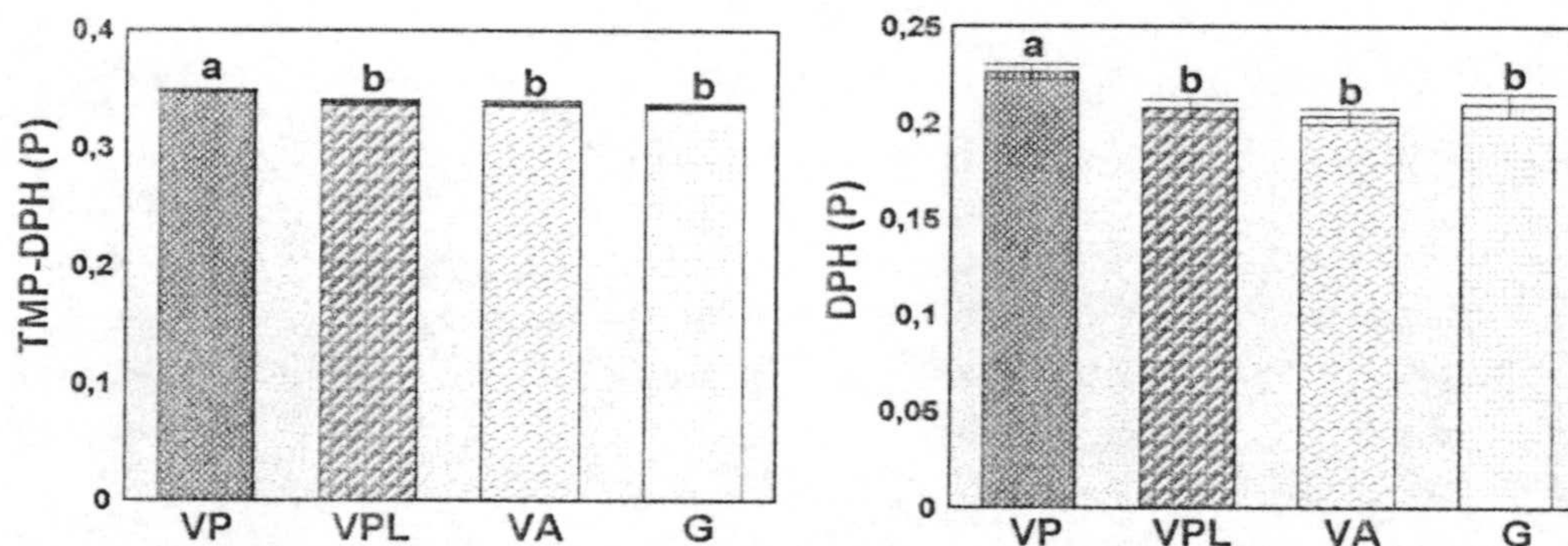
Acido Grasos	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
AGS	31,09 $\pm$ 0,48 ab	30,16 $\pm$ 0,46 a	31,68 $\pm$ 0,28 b	32,43 $\pm$ 0,43 b
AGI	68,91 $\pm$ 0,48 ab	69,84 $\pm$ 0,46 a	68,32 $\pm$ 0,28 b	67,57 $\pm$ 0,43 b
AGM	32,05 $\pm$ 0,68 ab	33,73 $\pm$ 0,77 a	30,45 $\pm$ 1,16 bc	29,00 $\pm$ 0,52 c
AGD	17,82 $\pm$ 0,32 a	17,50 $\pm$ 0,74 a	18,97 $\pm$ 0,58 ab	19,76 $\pm$ 0,48 b
AGP	36,86 $\pm$ 0,73 a	36,11 $\pm$ 0,90 a	37,87 $\pm$ 1,20 a	38,56 $\pm$ 0,67 a
AGM:AGD	1,81 $\pm$ 0,06 ab	1,96 $\pm$ 0,12 a	1,63 $\pm$ 0,11 b	1,47 $\pm$ 0,03 c
AGM:AGP	0,91 $\pm$ 0,04 ab	0,98 $\pm$ 0,05 a	0,86 $\pm$ 0,07 ab	0,79 $\pm$ 0,03 b
AGP (n-6)	33,45 $\pm$ 0,73 ab	32,94 $\pm$ 0,85 a	34,43 $\pm$ 1,13 ab	35,95 $\pm$ 0,68 b
AGP (n-3)	2,93 $\pm$ 0,03 a	2,68 $\pm$ 0,10 a	2,94 $\pm$ 0,13 a	2,15 $\pm$ 0,16 b
AGP >18C (n-6)	15,87 $\pm$ 0,67 a	15,70 $\pm$ 0,52 a	15,74 $\pm$ 0,55 a	16,49 $\pm$ 0,69 a
AGP >18C (n-3)	2,45 $\pm$ 0,05 a	2,21 $\pm$ 0,10 a	2,39 $\pm$ 0,15 a	1,71 $\pm$ 0,16 b
II	4,71 $\pm$ 0,13 a	4,82 $\pm$ 0,14 a	4,62 $\pm$ 0,11 a	4,48 $\pm$ 0,11 a

Tabla 23.- Media  $\pm$  E.E.M. de los enzimas citosólicos de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

	PICUAL	PICUAL LAVADO	ARBEQUINA	GIRASOL
Glutación Peroxidasa U/mg	125,92 $\pm$ 4,72 a	140,85 $\pm$ 7,98 ab	166,09 $\pm$ 11,99 b	155,81 $\pm$ 13,02 at
Superóxido Dismutasa U/mg	37,73 $\pm$ 4,22 a	39,29 $\pm$ 3,62 a	37,87 $\pm$ 2,65 a	36,72 $\pm$ 2,34 a
Catalasa $\text{seg}^{-1} * \text{mg}^{-1}$	0,37 $\pm$ 0,06 a	0,38 $\pm$ 0,06 a	0,36 $\pm$ 0,05 a	0,37 $\pm$ 0,05 a
Glutación Reductasa U/mg	35,88 $\pm$ 3,41 a	28,58 $\pm$ 3,24 a	36,86 $\pm$ 1,83 a	31,95 $\pm$ 3,22 a



Para la sonda TMA-DPH en mitocondrias, tal y como se muestra en la *figura 23*, se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos VP y VPL con respecto a los grupos G y VA, estos dos últimos son los que menos P presentan y por lo tanto mayor fluidez.

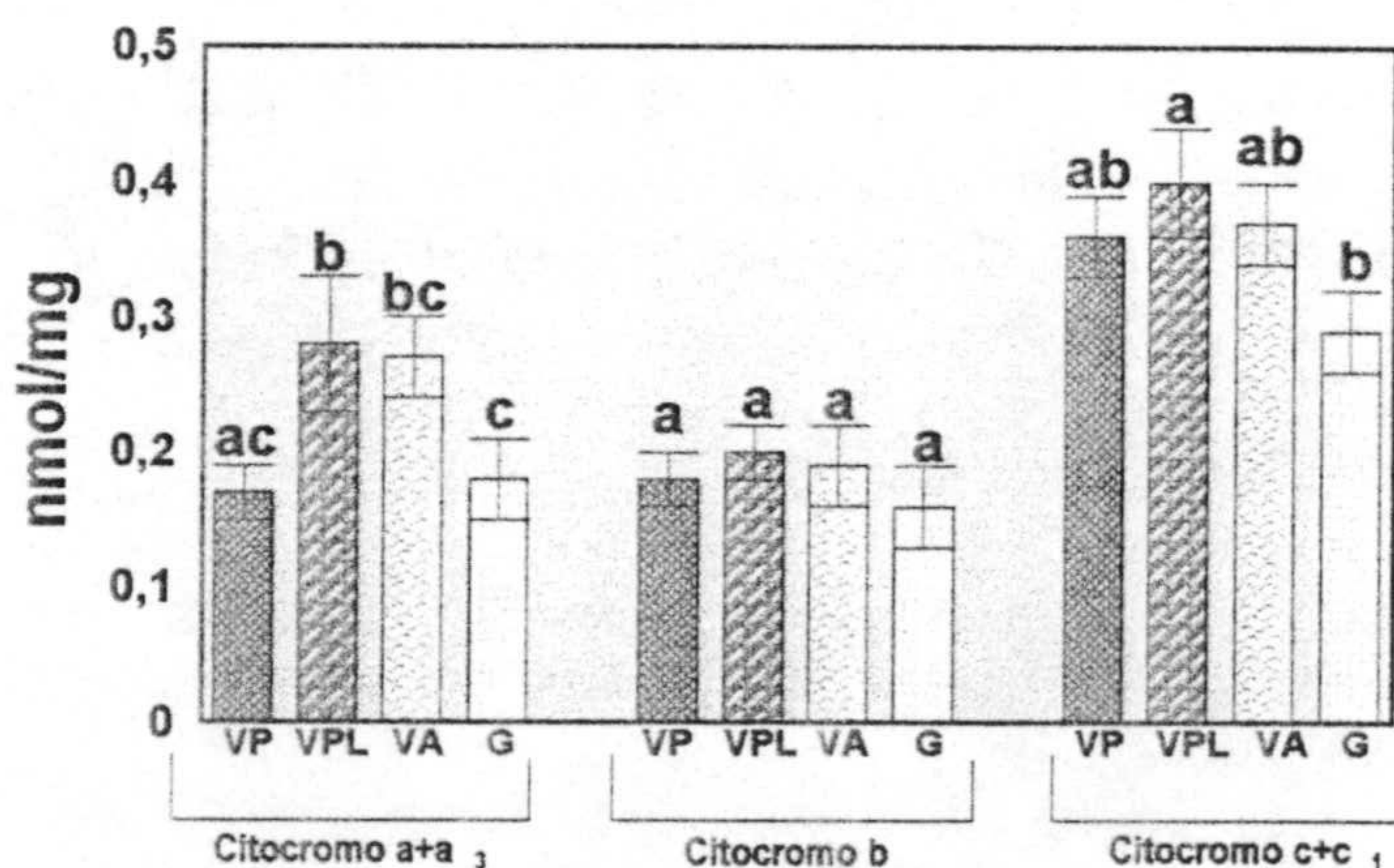


*Figura 24* .- Polarización de fluorescencia en microsomas de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En microsomas es el grupo VP el que mayor P muestra, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros tres grupos (*figura 24*).

La sonda DPH, presenta un comportamiento similar a la TMA-DPH, salvo que en

mitocondrias las diferencias estadísticamente significativas están entre los grupos VPL, VA y G (*figura 23*). En microsomas sucede lo mismo que en mitocondrias.



*Figura 24* .- Contenido en citocromos mitocondriales de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

**4.12.-Contenido en citocromo a + a<sub>3</sub>, b y c + c<sub>1</sub> de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

Para el contenido en citocromo



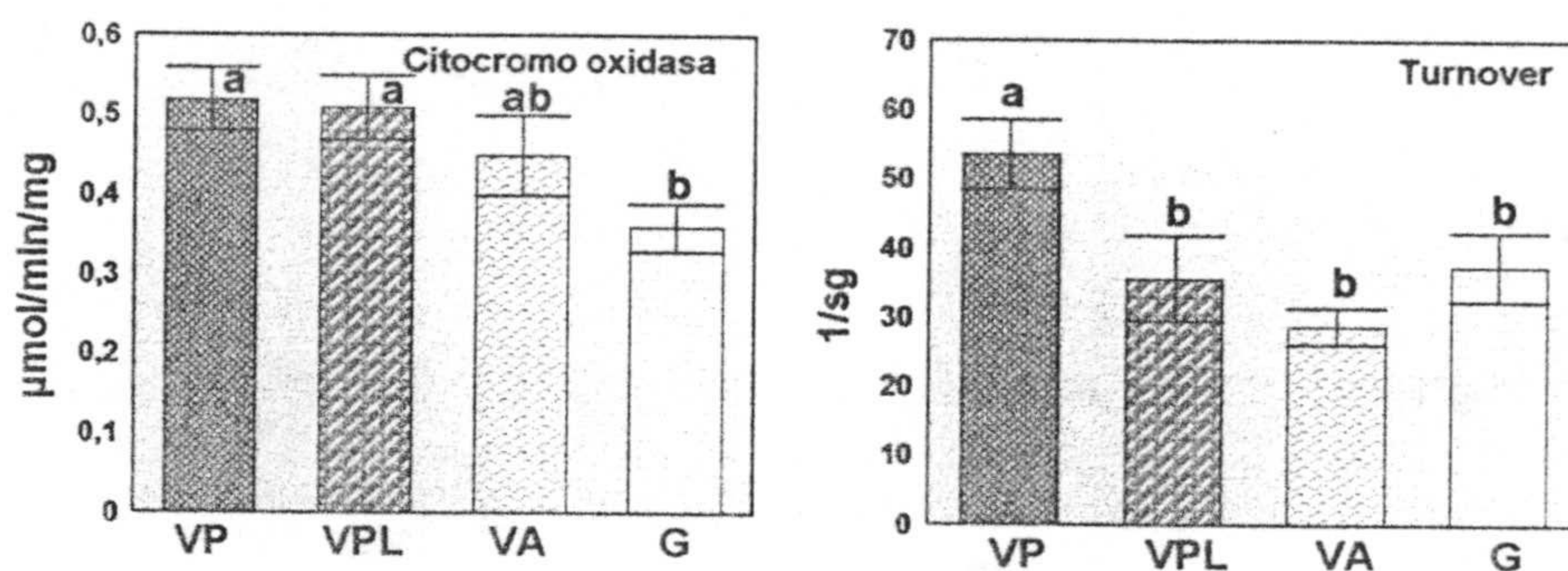
$c+c_1$ , como se muestra en la *figura 24* y *tabla 17*, se observan diferencias estadísticamente significativas, entre los grupos VPL y G, siendo el grupo G el que menor valor presenta

El citocromo b no presenta diferencias significativas.

Por último el citocromo  $a+a_3$ , muestra a los grupos VP y G como los que menor valor presentan.

#### 4.13.- Actividad específica y turnover de la citocromo oxidasa de la cadena de electrones mitocondria/

La actividad específica de la citocromo oxidasa, muestra los máximos valores en los grupos VP y VPL, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos y el grupo G (*figura 25* y *tabla 17*).



*Figura 25*.- Actividad específica y turnover de la citocromo oxidasa. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

El turnover, como se muestra en la *tabla 17* y *figura 25*, presenta un máximo valor en el grupo VP, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros tres grupos de estudio.

#### 4.14.- Actividad de la catalasa en citosol

En corazón no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de estudio para este enzima, como se muestra en la *figura 26* y *tabla 23*, presentando además todos valores muy similares.



4.15.- Actividad de la superóxido dismutasa en citosol

Al igual que sucede con la catalasa, esta otra enzima citosólica no presenta diferencias significativas entre los grupos de estudio, siendo asimismo los valores obtenidos similares entre sí, tal como se muestra en la *figura 26* y *tabla 23*.

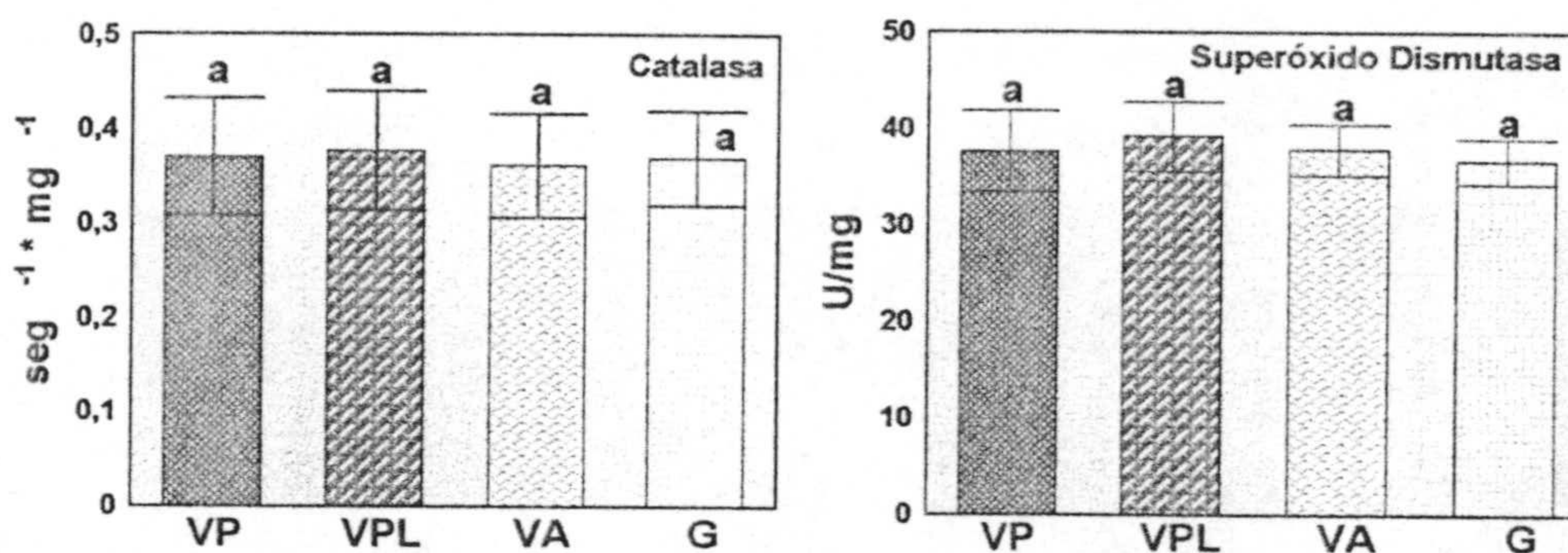


Figura 26.- Actividad de la catalasa y superóxido dismutasa en citosol de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

4.16.- Actividad de la glutatión peroxidasa en citosol

Los resultados obtenidos para la glutatión peroxidasa se muestra en la *figura 27* y *tabla 17*, en la cual se muestra que el mínimo valor es el presentado por el grupo VP,

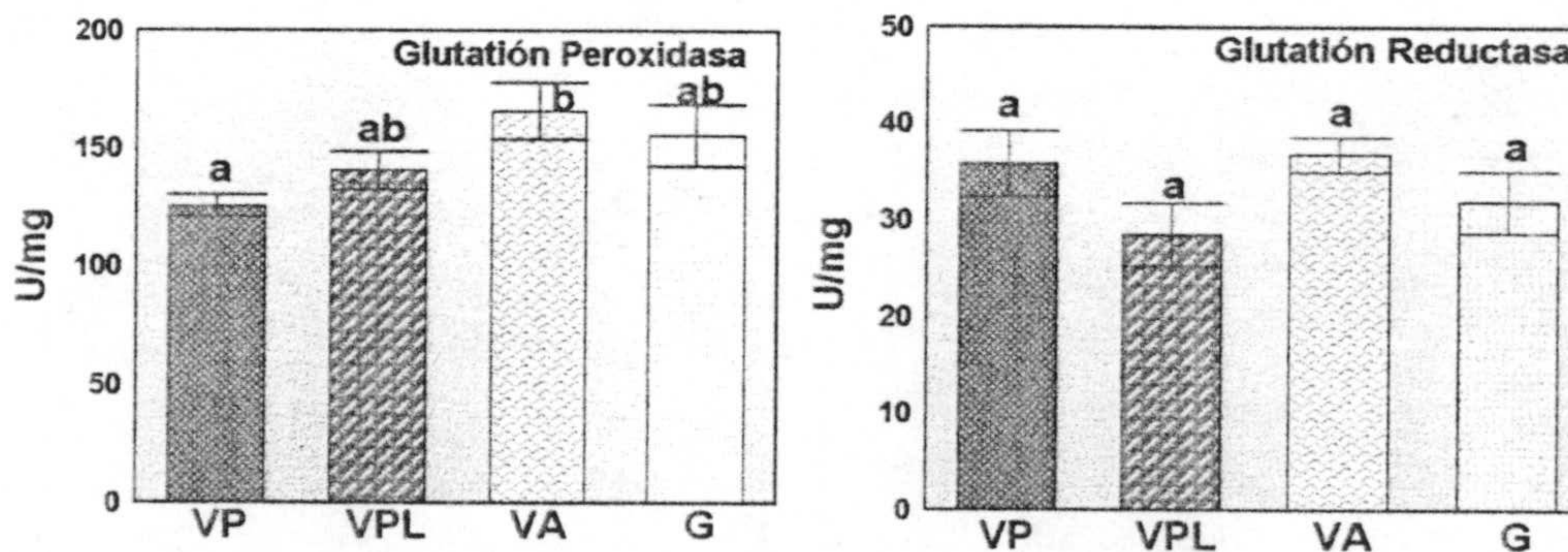


Figura 27.- Actividad de la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en citosol de corazón. La aparición de letras no coincidentes indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

presentando diferencias significativas con respecto al grupo VA.



#### 4.17.- Actividad de la glutatión reductasa en citosol

No se observan diferencias estadísticamente significativas para este enzima, como se muestra en la *figura 27* y *tabla 17*, aunque se observa que los máximos valores son los presentados por los grupos VA y VP.



# *CAPITULO V*

---

---

DISCUSIÓN







En este estudio se ha pretendido, fundamentalmente, estudiar el efecto que tiene la ingestión de algunos antioxidantes de la grasa dietética (tirosol, hidroxitirosol y tocoferol principalmente) sobre la peroxidación lipídica en membranas celulares y por tanto sobre la funcionalidad de las mismas, manteniendo constante y elevado el aporte en ácido oleico.

Para alcanzar este objetivo se han elegido cuatro fuentes grasas cuya composición en ácidos grasos es muy similar, como se observa en la tabla 4 del capítulo 3, presentando todas al ácido oleico (C18:1 n-9) como ácido graso mayoritario.

La diferencia más característica entre las fuentes grasas utilizadas, en lo que a perfil lipídico se refiere, radica en su contenido en ácido linoleico (C18:2n-6) que varía de un 3.5% presente en las variedades de oliva virgen Picual y Picual lavado a un 6.7% y 10.68% en la variedad de oliva virgen Arbequina y variedad girasol rico en oleico respectivamente.

Desde el punto de vista del contenido en antioxidantes, como se observa en la tabla citada anteriormente y en la *figura 1*, hay grandes diferencias entre las fuentes grasas utilizadas en este estudio. Así la variedad Picual presenta una alta cantidad de polifenoles (738.0 ppm de ácido caféico) y contenido medio en tocoferoles (314.30 mg/kg), la variedad girasol rico en oleico muestra el máximo valor de tocoferoles (921.60 mg/kg), aunque los

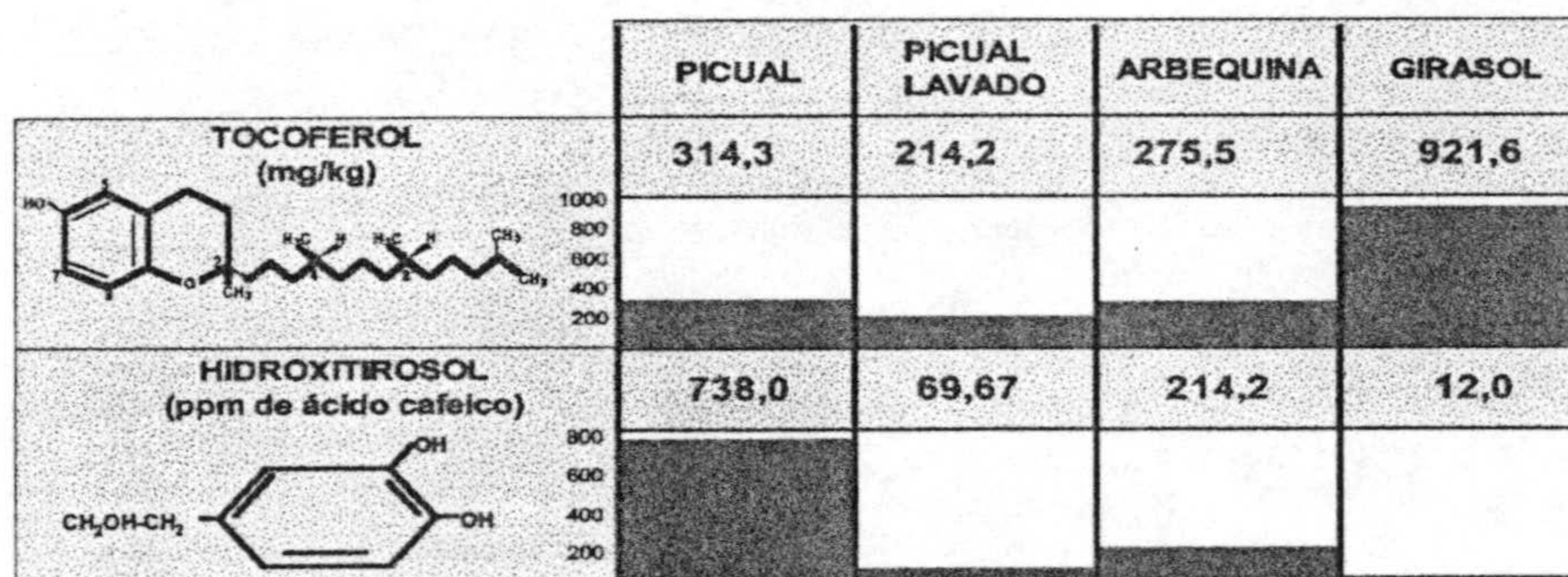


Figura 1.- Contenido en  $\alpha$ -tocoferol e hidroxitirosol en las fuentes grasas utilizadas.

polifenoles no son detectables. Por último la variedades Arbequina y Picual lavado con contenido similar en tocoferoles (275.50 mg/kg y 214.20 mg/kg respectivamente), mientras que su contenido en polifenoles es bajo en la variedad Arbequina (180.50 ppm de ácido caféico) y muy pequeño en la variedad Picual lavado (60.0 ppm de ácido caféico).

Con estas cuatro fuentes grasas lo que se ha pretendido es la obtención de membranas celulares con un perfil graso muy similar entre los distintos grupos de estudio,



de manera que la respuesta en ellas ante la peroxidación lipídica sea parecida y pueda actuar en mayor o menor grado el componente insaponificable de la grasa dietética como única defensa ante este fenómeno.

Son numerosos los estudios que demuestran la influencia que ejerce la composición en ácidos grasos de la grasa dietética sobre el perfil lipídico plasmático y de membrana (Girón M.D. et. al., 1992; Seiquer, I. et. al., 1994), observándose la influencia de la relación oleico:linoleico existente en la grasa dietética, en plasma y en menor grado en hígado y corazón (Seiquer, I. et. al., 1994, Quiles, J.L., 1995).

En el perfil lipídico plasmático obtenido en nuestro estudio se muestra esta influencia, así los animales que han ingerido como única fuente grasa las variedades Picual y Picual lavado son los que muestran un mayor contenido en ácido oleico ( $47,46 \pm 1,79$  y  $48,12 \pm 1,31$  respectivamente), siendo las variedades Arbequina y girasol rico en oleico las que mayor contenido presentan en ácido linoleico ( $15,72 \pm 0,92$  y  $17,64 \pm 0,66$  respectivamente), lo que concuerda con la composición de la fuente grasa que han ingerido.

Sin embargo en lo referente al contenido en ácido oleico, si bien las fuentes grasas presentaban un contenido muy similar, como se observa en la figura 2, en el perfil lipídico plasmático existen diferencias significativas entre los grupos Picual y Picual lavado y los grupos Arbequina y girasol rico en oleico (figura 2), lo cual es seguramente debido a la distinta relación oleico:linoleico presente en los aceites:

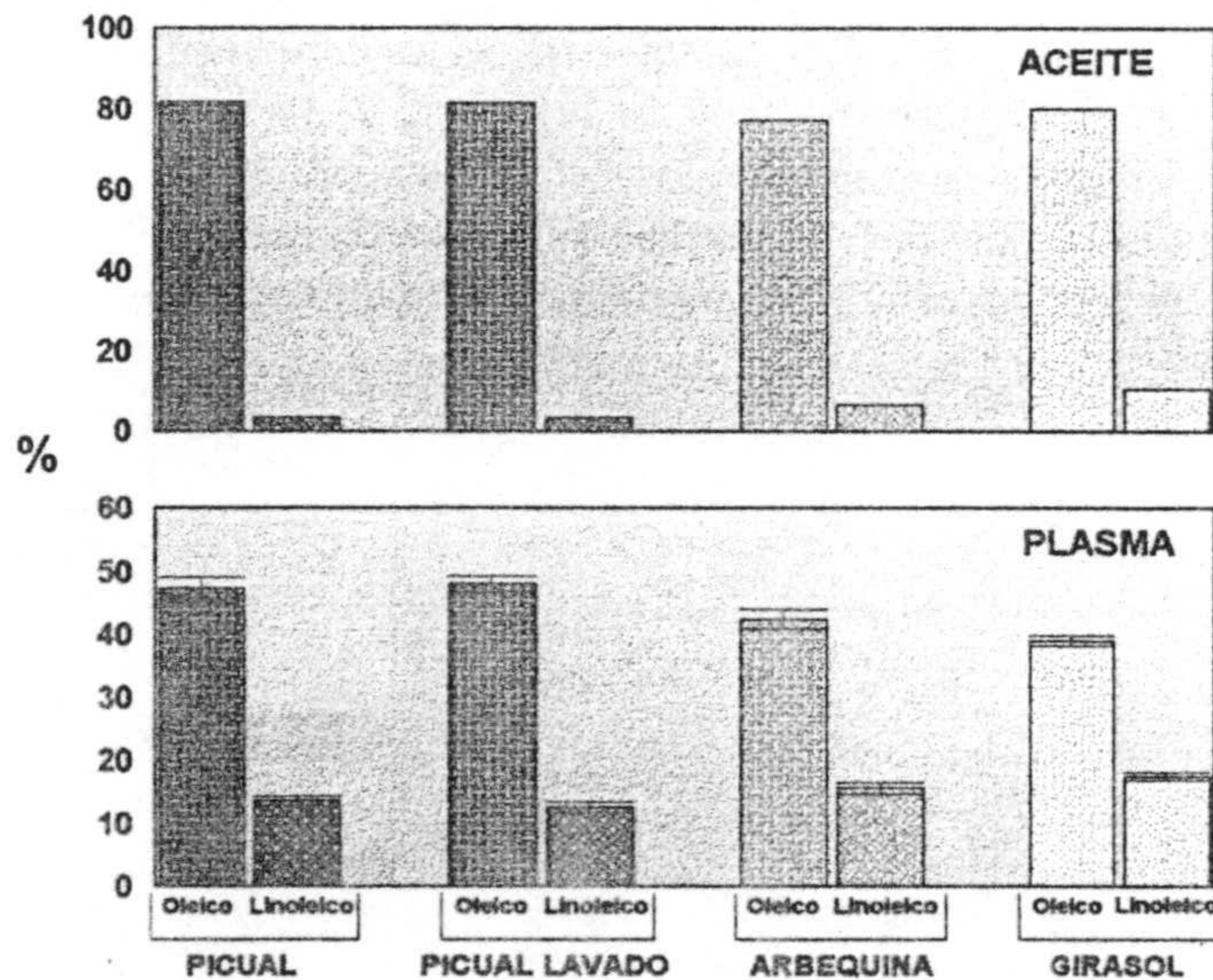


Figura 2.- Contenido en ácido oleico y ácido linoleico de los distintos aceites utilizados y en plasma.

Relación oleico:linoleico (aceites)

Relación oleico:linoleico (plasma)

- Picual

22.15

3,42



- Picual lavado	23.19	3,77
- Arbequina	11.53	2,71
- Girasol rico en oleico	7.50	2.22

Siendo esta relación la que, en vista de los resultados, va a determinar el perfil lipídico.

Los ácidos grasos saturados, fundamentalmente ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0), presentan un mayor porcentaje en los animales que ingieren las dietas con un mayor contenido en ácido linoleico, diferencias que no se observan en las fuentes grasas dietéticas utilizadas. Este mayor porcentaje de ácidos grasos saturados en dietas con mayor contenido en linoleico también se ha observado en estudios con minicerdos, aunque utilizando una fuente grasa más poliinsaturada (Seiquer, I., 1991).

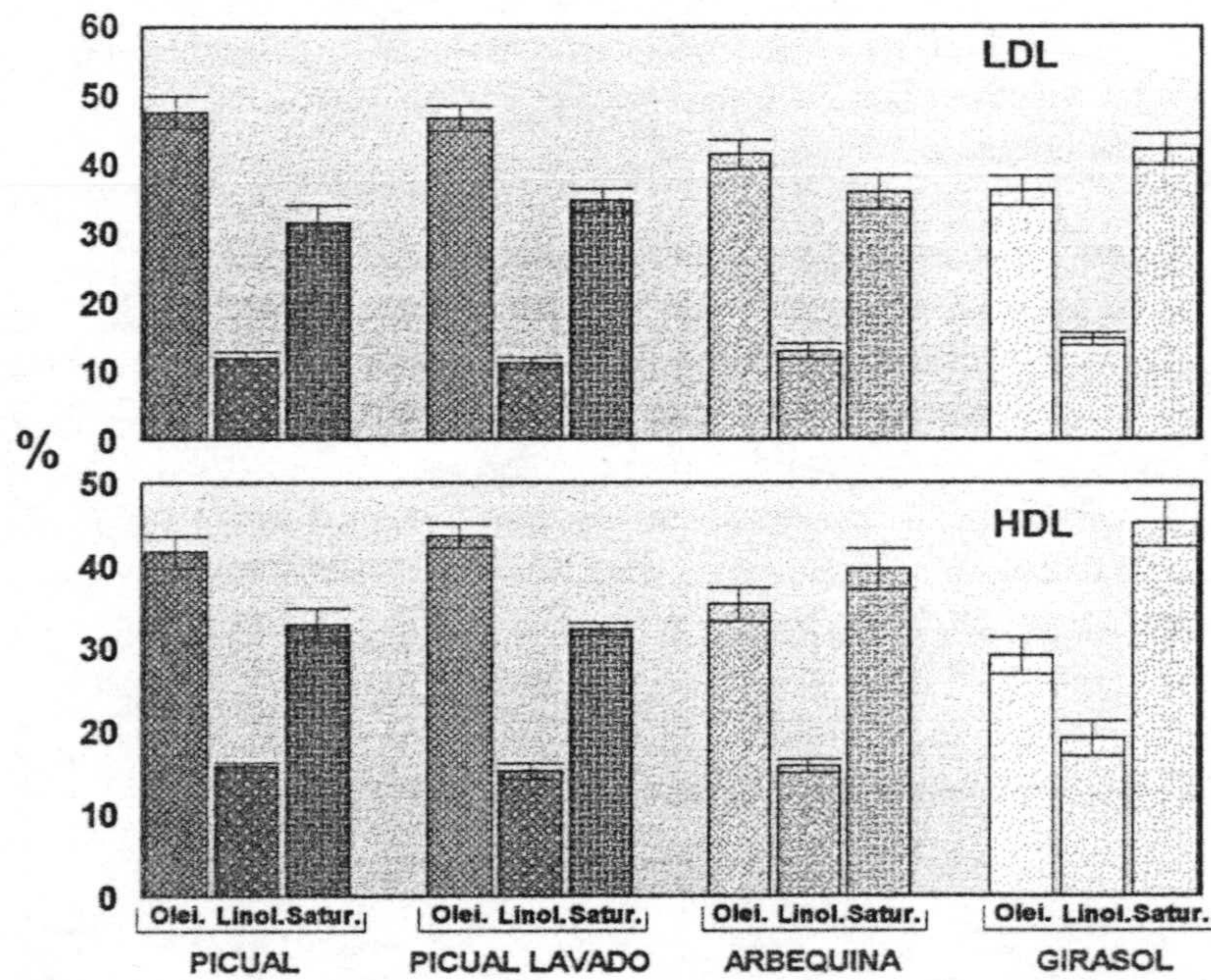


Figura 3.- Contenido en oleico, linoleico y total de ácidos grasos saturados en LDL y HDL.

En las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se observa una adaptación similar a la mostrada en plasma, encontrándose igualmente un mayor porcentaje de ácido linoleico en los grupos Arbequina y girasol rico en oleico, presentando estos grupos además el mayor porcentaje de ácidos grasos saturados totales (figura 3).



Este mayor nivel de ácidos grasos saturados se podría explicar como un mecanismo de mantenimiento de la estabilidad de fluidez de membrana, puesto que el ácido linoleico por su estructura, como consecuencia de sus dos dobles enlaces, aumenta la fluidez de membrana, (Senault, C. et. al., 1990; de Teresa, C., 1995), aumento que podría ser contrarrestado por un mayor contenido en ácidos grasos saturados. Además se ha observado que un alto contenido de ácido linoleico en las membranas celulares puede actuar sobre la delta-9-desaturasa, disminuyendo su actividad e incluso inhibiéndola (de Alaniz, M.T.J. et. al., 1986; Huang, Y.S. y Horrobin, D.F., 1987), con lo que los niveles de los ácidos palmítico y esteárico aumentarían.

Desde un punto de vista aterogénico, este mayor porcentaje de ácidos grasos saturados le confiere a las LDL unas propiedades físicas que favorecen la evolución del proceso aterosclerótico, como se ha observado en otros estudios (Glick, J.M. et. al., 1983).

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), mantienen la tendencia observada en las LDL, sin embargo se comienza a manifestar un menor valor en la relación oleico:linoleico, tendencia que será más marcada en mitocondrias y microsomas de hígado y corazón como se comentara más adelante.

En plasma como indicador del nivel de peroxidación lipídica, objetivo principal de este estudio, se ha utilizado el contenido de TBARS existente, mostrándonos que no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos de estudio. Sin embargo, el grupo Picual es el que menor valor presenta para este parámetro, siendo los grupos Arbequina y fundamentalmente girasol rico en oleico los que mayor valor presentan, datos que coinciden con los obtenidos en otros estudios, en los que a mayor nivel de poliinsaturados se encuentran un mayor nivel de TBARS en membranas mitocondriales y microsomas (Quiles, J.L., 1995; de Teresa, C., 1995). Esto nos indica que en nuestras

*Tabla 1.-* Contenido en  $\alpha$ -tocoferol, ubiquinona y retinol en plasma.

	<i>Ubiquinona 10</i> (pmol/ml)	<i><math>\alpha</math>-Tcoferol</i> (nmol/ml)	<i>Retinol</i> (nmol/ml)
<b>PICUAL</b>	48,30 $\pm$ 4,63 a	5,32 $\pm$ 0,60 a	1,62 $\pm$ 0,15 a
<b>PICUAL LAVADO</b>	51,03 $\pm$ 3,22 a	4,39 $\pm$ 0,46 a	1,44 $\pm$ 0,18 a
<b>ARBEQUINA</b>	50,83 $\pm$ 4,56 a	4,92 $\pm$ 0,64 a	1,61 $\pm$ 0,11 a
<b>GIRASOL</b>	39,73 $\pm$ 2,55 a	4,41 $\pm$ 0,43 a	1,62 $\pm$ 0,12 a

condiciones experimentales, si bien las diferencias en el porcentaje de poliinsaturados entre los grupos son significativas, no son lo suficientemente grandes como para dar diferencias importantes en la generación de TBARS, aunque sí para mostrar una determinada



tendencia.

A esto, se une al hecho de que los distintos grupos presentan en plasma un contenido en antioxidantes totales (tocoferol, ubiquinona y retinol) muy similar entre si y elevado (*tabla 1*), por lo que la defensa ante la peroxidación lipídica habría sido de igual consistencia.

En las LDL se ha utilizado el contenido en hidroperóxidos (*figura 4*), como parámetro de determinación del estado peroxidativo de las mismas, observandose al igual que en plasma la ausencia de diferencias significativas entre los grupos en el nivel de hidroperóxidos basales. Sin embargo en estas lipoproteínas sí nos encontramos diferencias significativas en cuanto a los niveles de tocoferol, siendo mayor en el grupo Picual (*figura 5*), diferencias no observadas ni en plasma ni en HDL. Estas diferencias nos podrían indicar en cierto modo un mayor gasto de tocoferol como antioxidante en los grupos Picual lavado, Arbequina y girasol rico en oleico para mantener niveles similares de hidroperóxidos.

En otros estudios realizados en ratas, pero utilizando una fuentes grasa mucho más poliinsaturada (Quiles, J.L., 1995), no se observa esta disminución de tocoferol en condiciones normales, aunque frente a la inducción de estrés oxidativo por ejercicio físico si se aprecia descenso en el contenido de tocoferol en los animales alimentados con la fuente grasa más poliinsaturada. Por lo tanto

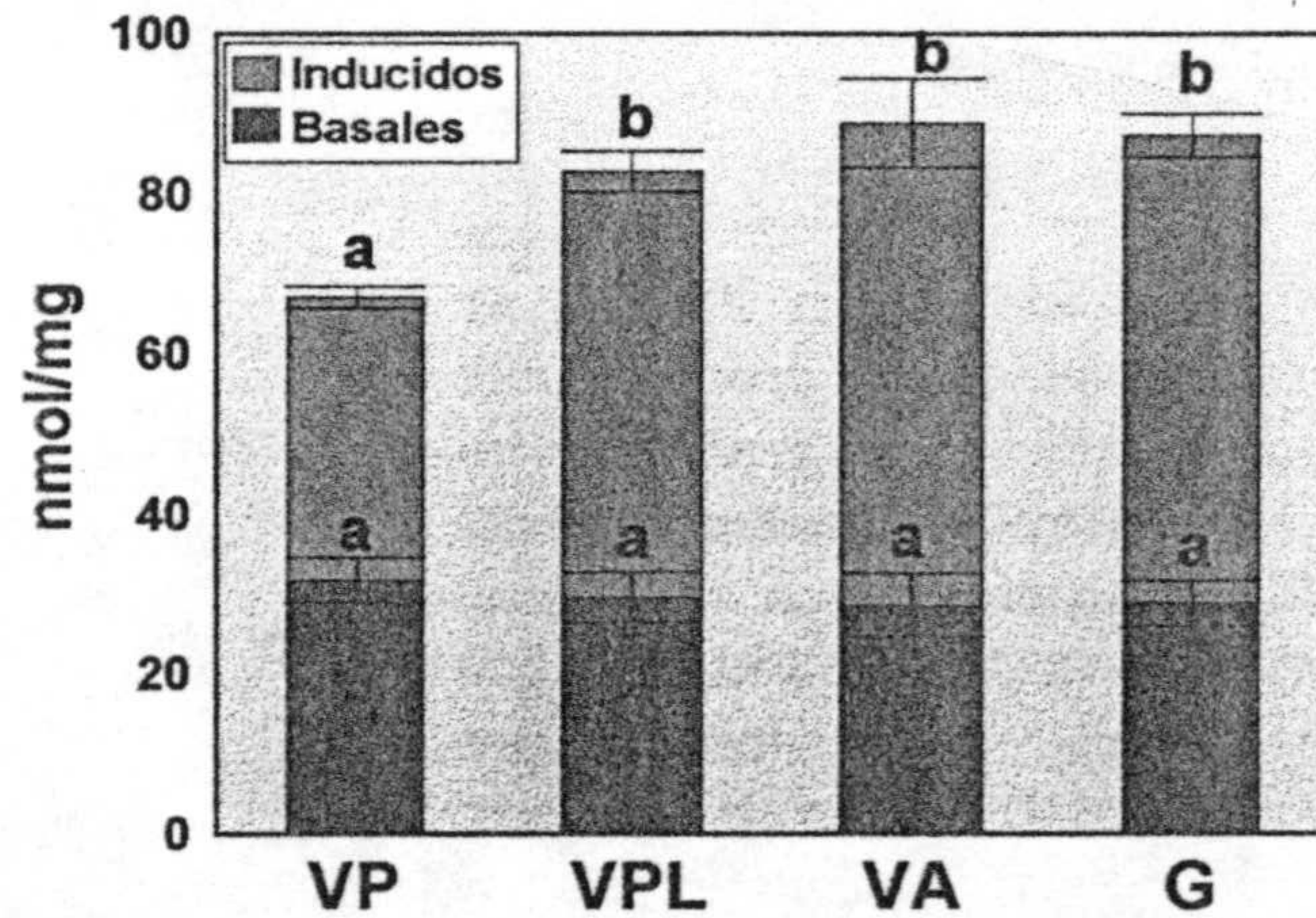


Figura 4.- Contenido de hidroperóxidos en LDL.

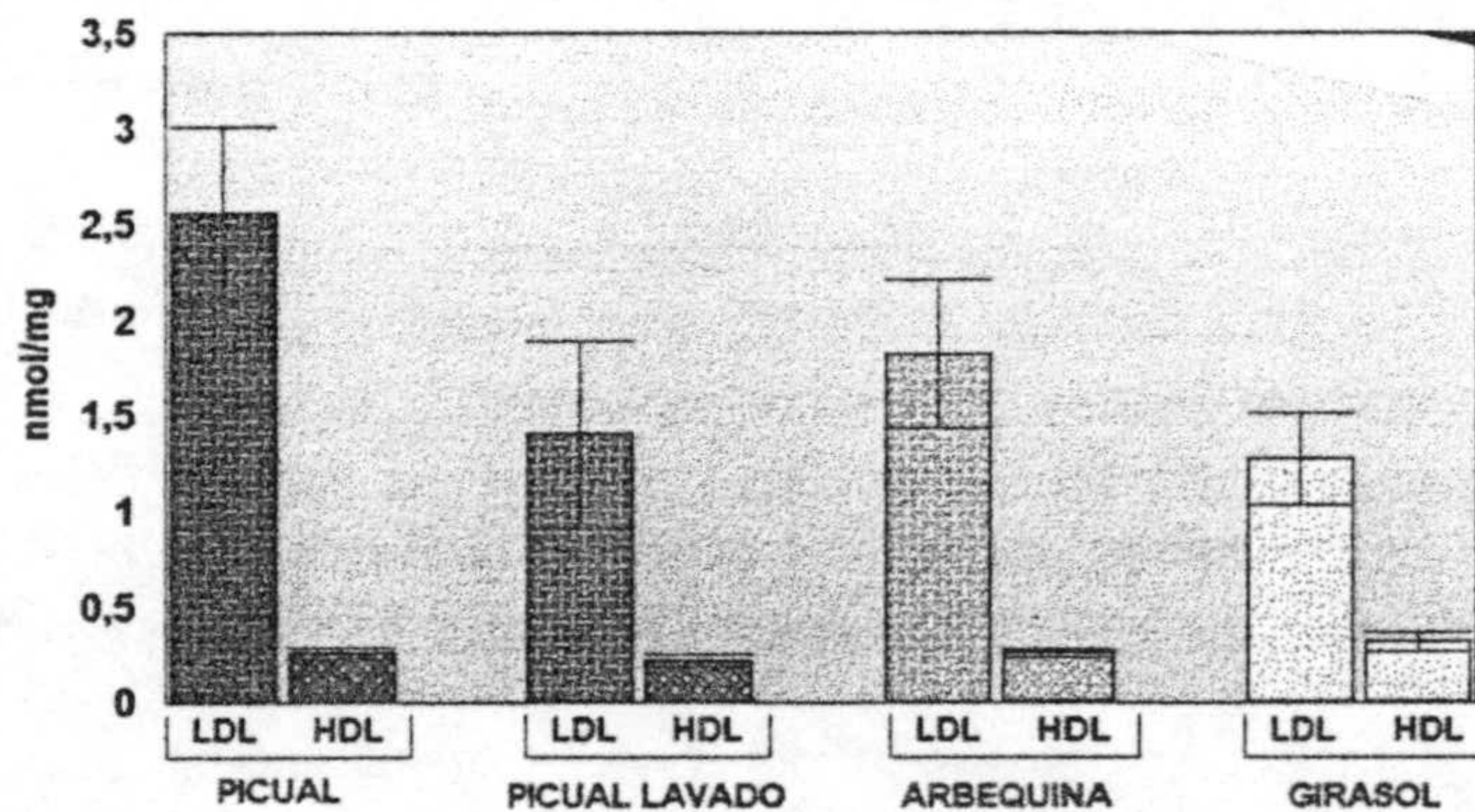


Figura 5.- Contenido de α-tocoferol en LDL y HDL.



creemos que en nuestras condiciones experimentales, como consecuencia de las ligeras diferencias en ácidos grasos poliinsaturados de las fuentes grasas utilizadas, tenga lugar una especial situación de estrés, aunque muy leve y con cierto carácter crónico, que permite al organismo mantener un similar nivel de hidroperóxidos en todos los grupos con un pequeño gasto de antioxidantes, que es mayor en aquellos grupos que presentan mayor poliinsaturación.

Al inducir el nivel de hidroperóxidos con AAPH, se observa que en los grupos Picual lavado, Arbequina y girasol rico en oleico su concentración aumenta significativamente con respecto al obtenido en el grupo Picual, lo que concuerda, para los grupos Arbequina y girasol rico en oleico, con los datos obtenidos en estudios realizados en ratas (Quiles J.L. et. al., 1994), en los que un mayor contenido en ácido linoleico provoca una mayor inducción en el nivel de hidroperóxidos y por lo tanto una mayor susceptibilidad (figura 6). Este incremento se debe, como demostró en estudios "in vitro"

Sevanian y Hochstein en 1985 (Sevanian, A. y Hochstein, P., 1985), a que por cada ácido graso monoinsaturado que se peroxida lo hacen 40 diinsaturados. En concreto en nuestro estudio la fracción lipoproteica LDL, presenta una relación oleico:linoleico de  $4.58 \pm 0.51$  para el grupo Picual, mientras que en los grupos Arbequina y girasol rico en oleico esta relación se reduce marcadamente, pasando a  $3.85 \pm 0.31$  y  $2.85 \pm 0.32$  respectivamente.

El caso del grupo Picual lavado en el que se observa una relación oleico:linoleico de  $4.84 \pm 0.7$ , no es debido a un mayor contenido en linoleico, sino consecuencia de los procesos de lavado a los que fué sometida la fuente grasa dietética utilizada, ya que en este proceso se aumentan los niveles de peróxidos por disminución de sus defensas antioxidantes naturales y continuo contacto directo con el oxígeno (Emker, E. A., 1984; Nergiz, C., 1993). Resultados similares han sido observados cuando se utilizan aceites de oliva refinados (de Teresa, C., 1995), los cuales a pesar de contener un porcentaje de poliinsaturados similar al contenido por aceites de oliva virgen, presentan una mayor concentración de hidroperóxidos.

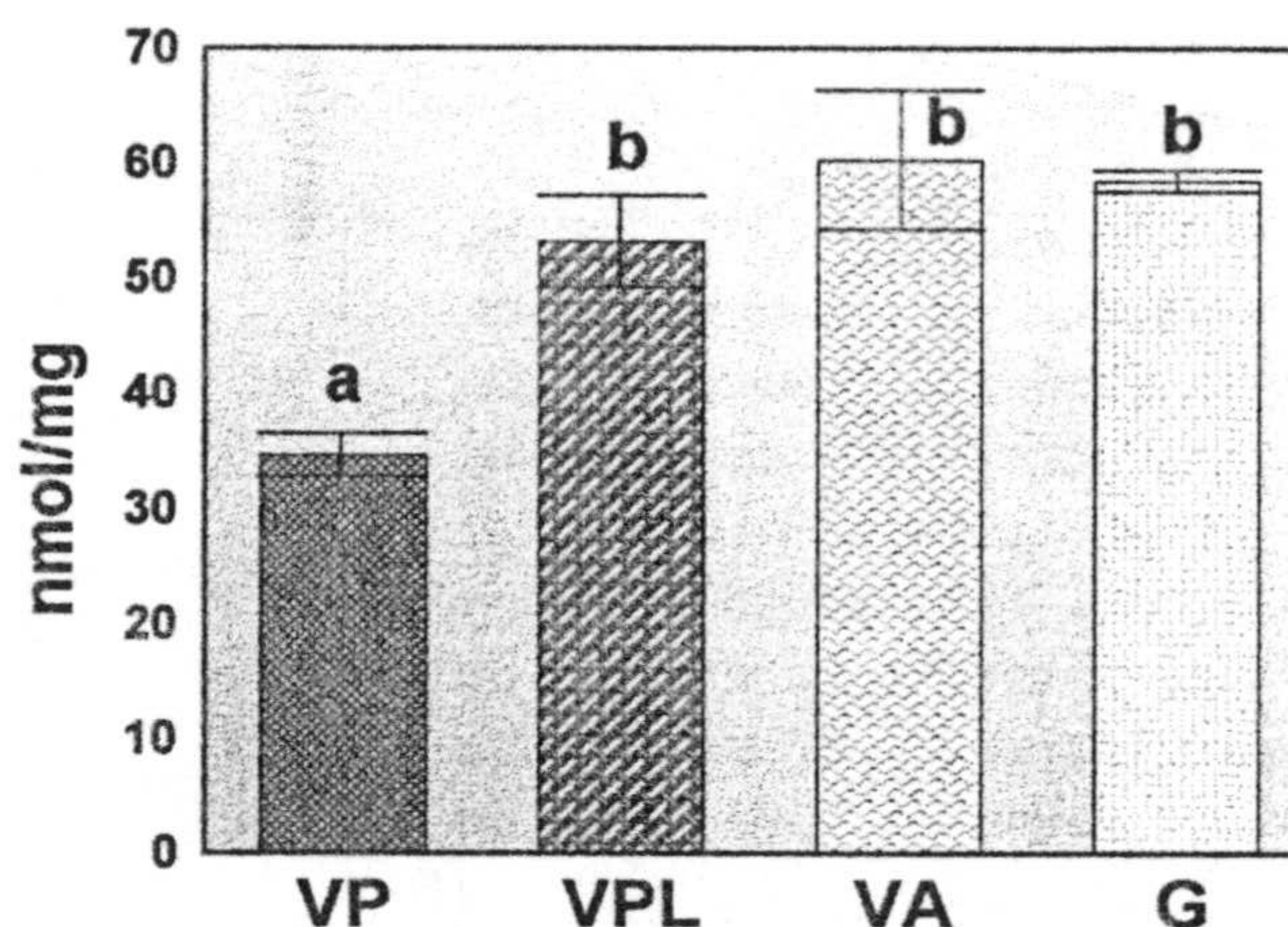


Figura 6.- Susceptibilidad a la formación de hidroperóxidos en IDL.



A esta mayor protección frente a la inducción de hidroperóxidos en la variedad de oliva virgen Picual como consecuencia de su menor concentración de linoleico, se une el hecho de presentar un mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol que el resto de variedades, el cual se ha observado que protege a las lipoproteínas de la peroxidación lipídica ( Jialal, I. y Grundy, S.M., 1992; Suzukawa, M. et. al., 1995).

Asimismo, también puede unirse a esta protección el mayor contenido en polifenoles (hidroxitirosol, fundamentalmente) presente en esta fuente grasa, ya que existen estudios que muestran un incremento en la resistencia de las LDL a la lipoperoxidación lipídica, gracias a los compuestos polifenólicos existentes en el aceite de oliva virgen y en concreto la oleuropeina y su derivado, el hidroxitirosol, sin embargo no se conoce su mecanismo de acción exacto, indicando como posibles mecanismo, la quelación de metales y la interacción directa con ciertos radicales (Wiseman, S.A. et. al., 1996; Manna, C. et. al., 1997). Otro mecanismo propuesto para este y otros polifenoles podría ser la interacción con otros antioxidantes y en concreto con el radical tocoferoxilo, regenerando al igual que la ubiquinona el pool de tocoferoles (Rice-Evans, C.A. et. al., 1996). Este último mecanismo podría explicar, junto al menor contenido en poliinsaturados, el mayor contenido en tocoferol. Esta protección no se observa en la variedad Arbequina, quizás por el bajo contenido de este compuesto que presenta la fuente grasa.

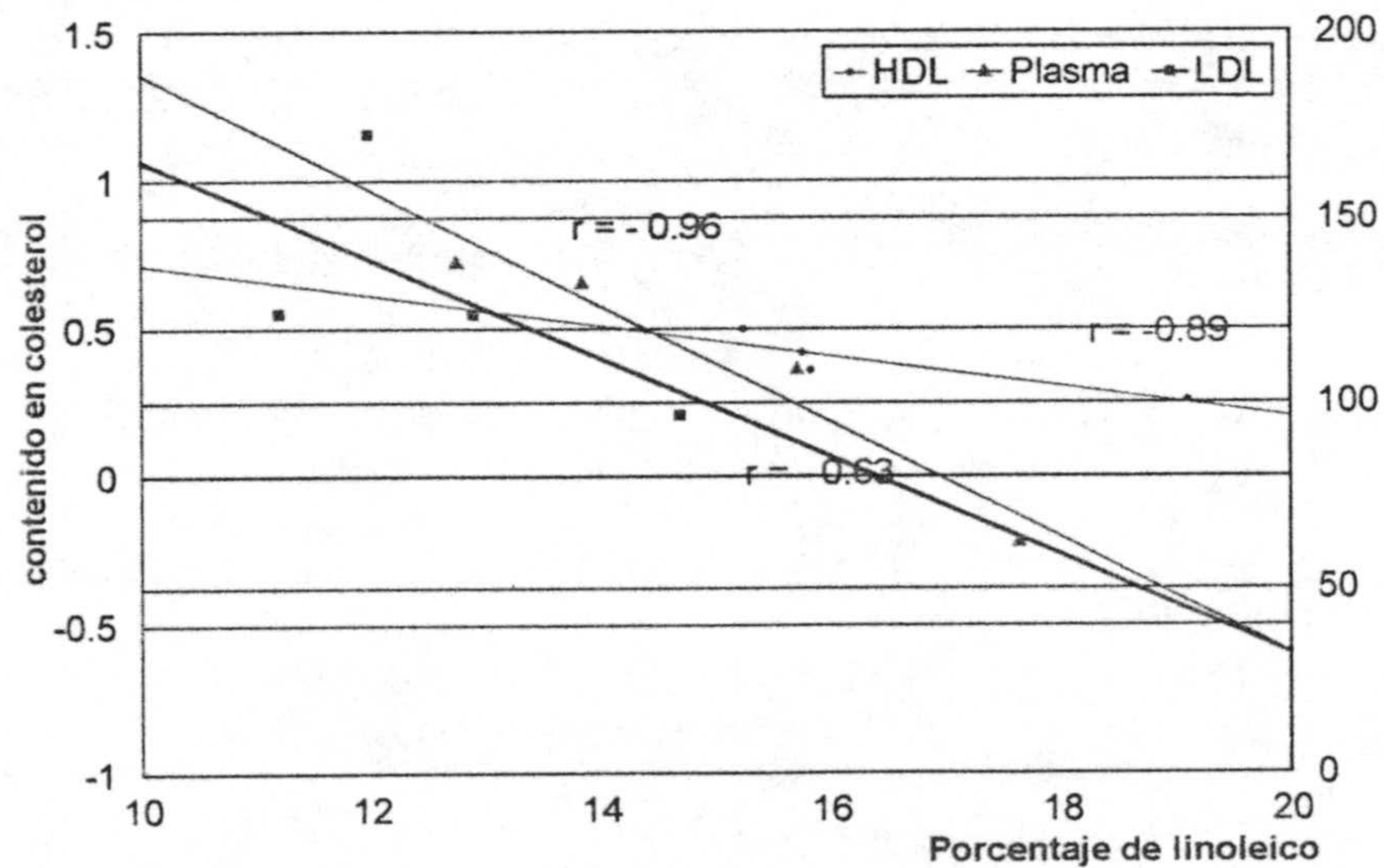


Figura 7.- Correlación entre el contenido en colesterol y los porcentajes de ácido linoleico en plasma, HDL y LDL.

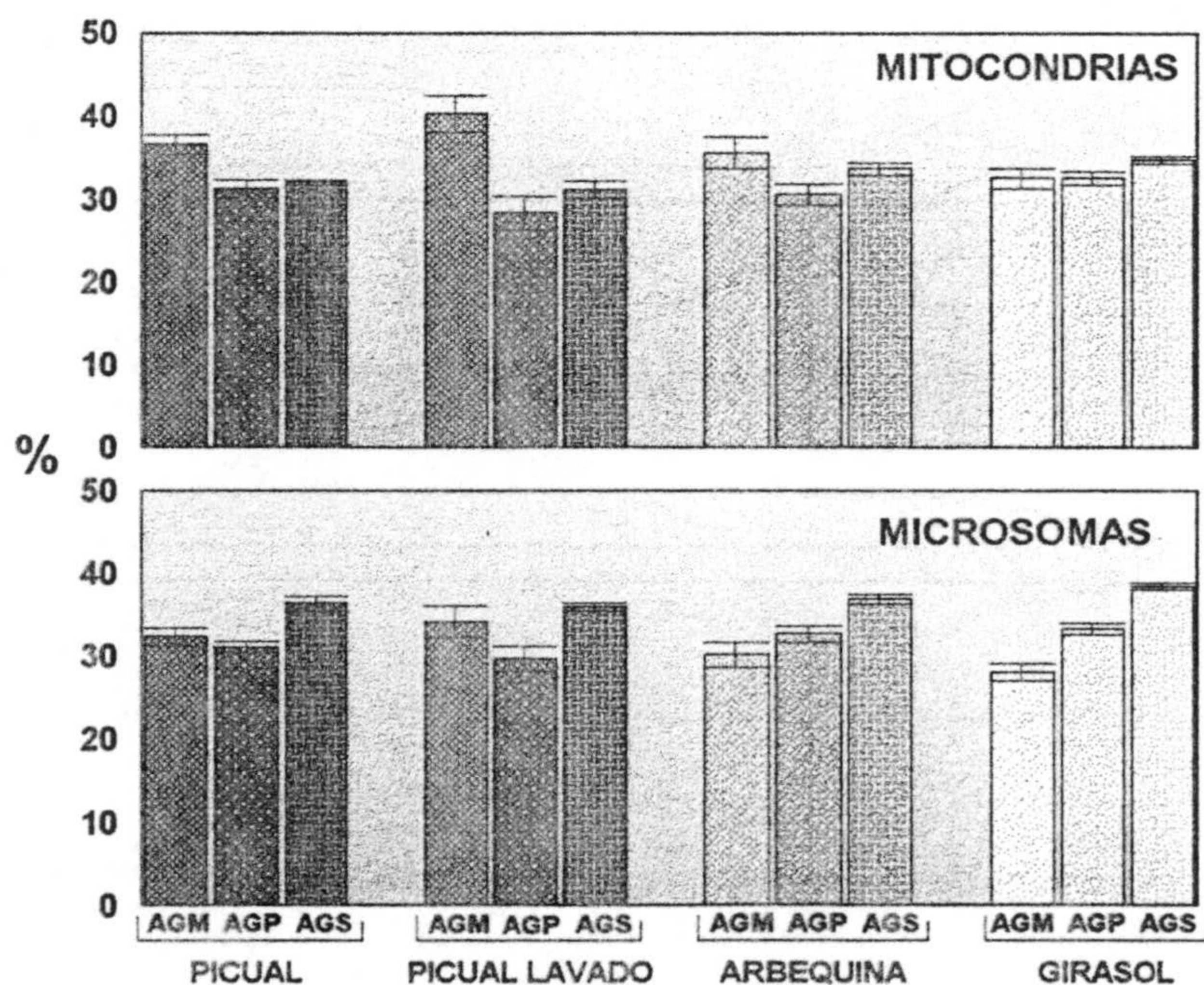
Respecto al contenido en colesterol tanto en lipoproteínas como en plasma, se observa, en general, que conforme mayor es el porcentaje en linoleico menor es el contenido de este. Esto puede ser debido a que a pesar de presentar un alto contenido en



monoinsaturados, el mayor contenido en diinsaturados (linoleico, fundamentalmente) hace que la variedad girasol, sobre todo, se comporte como una fuente grasa poliinsaturada. Este comportamiento estaría de acuerdo con lo descrito por varios autores, que destacan los efectos hipocolesteromiantes de una dieta poliinsaturada (Sugano, M. et. al., 1986; Masi, I. et. al., 1986), sin embargo, no observamos lo descrito por Mattson y Grunding en 1985 (Mattson, F.M. y Grundy, S.M., 1985), que mostraron que el ácido oleico es tan efectivo como el linoleico en reducir los niveles de colesterol plasmáticos. En otro estudio realizado en conejos y con fuentes grasas con similar contenido en oleico y linoleico, observaron igualmente un aumento de colesterol plasmático, aunque más leve y asuente en LDL y HDL.

Nuestros resultados ponen de manifiesto una correlación inversa, significativa estadísticamente, entre el contenido en colesterol total y el porcentaje de ácido linoleico en plasma y HDL. Esta correlación también existe en LDL, aunque sin ser en estas lipoproteínas significativo (*figura 7*).

Por otra parte, el patrón del perfil de ácidos grasos de las membranas mitocondriales y microsomales hepáticas de conejo, es similar al observado por otros



*Figura 8.-* Porcentaje en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en mitocondrias y microsomas hepáticos.



autores en condiciones experimentales similares, aunque utilizando una fuente grasa poliinsaturada con mucho mayor contenido en ácido linoleico y a la rata como animal de experimentación (de Teresa, C., 1995; Quiles, J.L., 1995).

Las cuatro dietas experimentales inducen valores similares de ácidos grasos saturados, oscilando entre un  $36.45 \pm 0.82$  para el grupo Picual y un  $38.51 \pm 0.43$  para el girasol rico en oleico en microsomas y entre un  $32.08 \pm 0.32$  para Picual y un  $34.82 \pm 0.48$  para girasol rico en oleico en mitocondrias hepáticas (*figura 8*).

Este mayor porcentaje de ácidos grasos saturados en membranas subcelulares, de los grupos alimentados con dietas que utilizan una fuente grasa con mayor contenido en diinsaturados, no ha sido observado en estudios llevados a cabo en ratas y con una fuente grasa con un mayor porcentaje de diinsaturados (Quiles, J.L., 1995), pero si en estudios realizados en membranas de eritrocito de mini-cerdos, también con una fuente grasa con mayor porcentaje de linoleico (Seiquer, I., 1991).

En cuanto al contenido en ácidos grasos monoinsaturados, son los grupos Picual y Picual lavado los que contienen un mayor porcentaje ( $36.65 \pm 1.18$  y  $40.39 \pm 2.17$  respectivamente en mitocondrias hepáticas y  $32.41 \pm 1.11$  y  $34.22 \pm 1.91$  en microsomas), siendo el grupos de animales alimentados con girasol rico en oleico, los que menor valor presentan para este ácido, entre un 4% y un 6% menos. Esto hace que el contenido en ácidos grasos diinsaturados y sobre todo de poliinsaturados mantenga una relación inversa a lo descrito anteriormente para los ácidos grasos monoinsaturados (*figura 8*).

Estas diferencias siguen un patrón similar al observado en plasma, aunque mucho menos marcado, en concreto la relación más utilizada para predecir la mayor o menor susceptibilidad a la peroxidación lipídica de las membranas, la relación AGM:AGP, es en microsomas de  $1.11 \pm 0.06$  para el grupo Picual,  $1.28 \pm 0.17$  para el Picual lavado,  $1.00 \pm 0.08$  para Arbequina y  $0.89 \pm 0.06$  para girasol rico en oleico.

Los valores de la relación anterior muestran que teóricamente sería el grupo de girasol rico en oleico ligeramente más susceptible a sufrir daños peroxidativos, ya que como se comentó en lipoproteínas, estudios llevados a cabo "in vitro" por Sevanian y Hochstein (Sevanian, A. y Hochstein, P., 1985), mostraron que por cada ácido graso monoinsaturado que se peroxida, lo hacen antes 40 diinsaturados, 80 triinsaturados y 160 tetrainsaturados, así pues es de esperar que membranas con mayor grado de poliinsaturados, muestren mayor grado de peroxidación lipídica, contribuyendo de forma significativa las reacciones de propagación y multiplicación de los radicales libres a la peroxidación global (Sevanian, A. y Hochstein, P., 1985). Además, los peróxidos lipídicos podrían continuar a lo largo de múltiples vías hasta la formación de peróxido cíclicos, lo que requiere que estas reacciones tengan lugar sobre ácidos grasos con dos o más insaturaciones, hecho que no sucede en el ácido oleico. Aunque el grado de susceptibilidad en estas membranas es, en general, mucho



menor que el inducido por grasas dietéticas poliinsaturadas típicas (girasol, maíz), que dan lugar a relaciones AGM:AGP en mitocondrias de 0.3 a 0.2 (de Teresa, C., 1995).

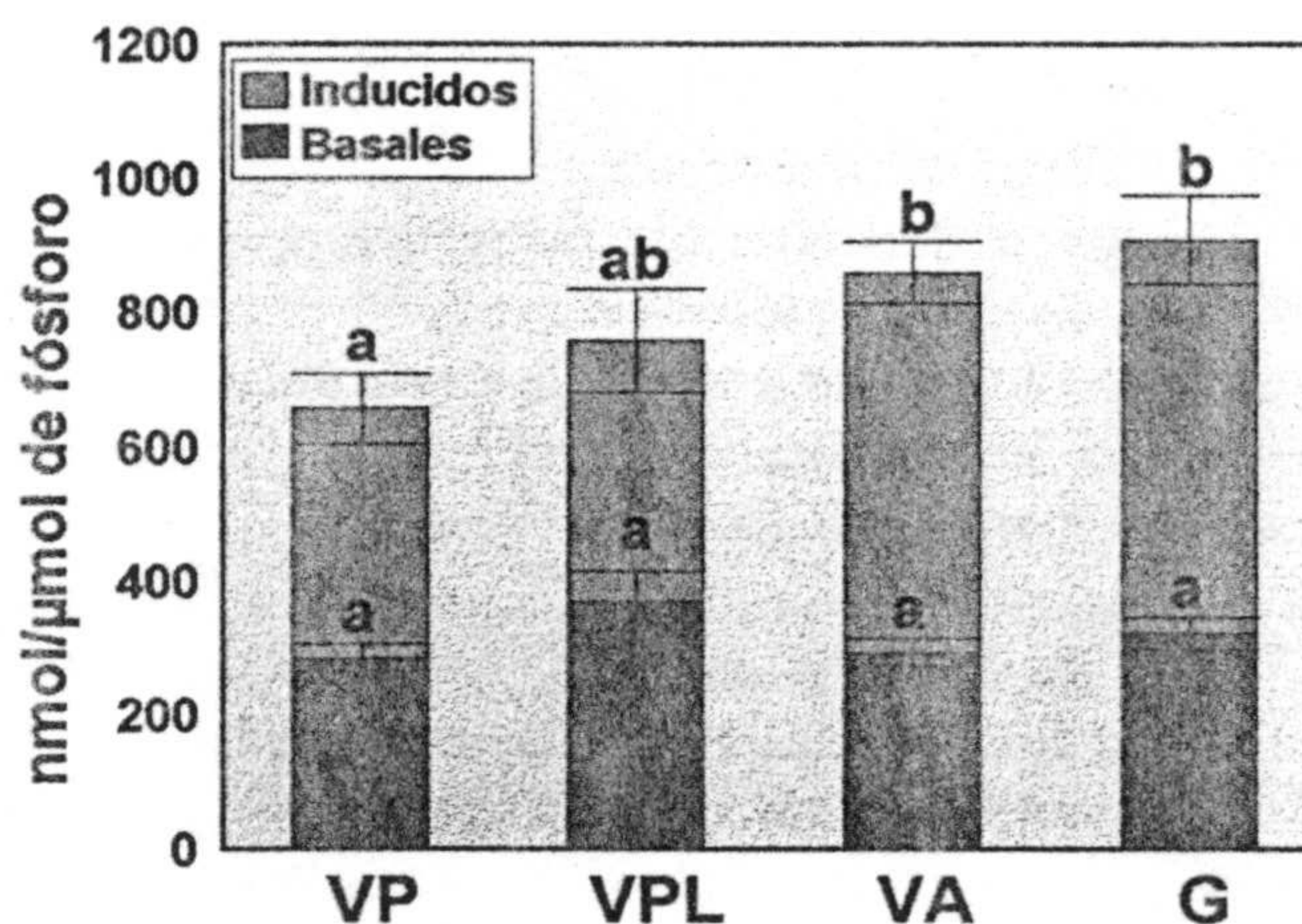
Como indicadores del nivel de peroxidación lipídica existente en mitocondrias y microsomas hepáticas se han utilizado dos parámetros, en contenido en hidroperóxidos y el contenido en TBARS.

En microsomas se observa una concentración basal de hidroperóxidos muy similar en los cuatro grupos experimentales (*figura 9*), siendo relativamente superior en el grupo Picual lavado. Sin embargo cuando inducimos la peroxidación lipídica mediante la adición de AAPH, se produce un mayor incremento en el contenido de hidroperóxidos en el grupo Arbequina y especialmente en el grupo girasol rico en oleico. Este mayor incremento en el contenido de hidroperóxidos, es atribuible al hecho de que

aunque presentan un mismo porcentaje de ácido oleico, en las grasas utilizadas existían ligeras diferencias en cuanto al porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados. Estas diferencias dan lugar, como ha sido mencionado anteriormente, a distintas relaciones AGM:AGP en las membranas microsomas hepáticas de los cuatro grupos de estudio.

Esta relación es de 0.89 para el grupo Picual y 1.11 para el grupo girasol rico en oleico, lo que supone que en el grupo Picual por cada 100 moléculas de ácidos grasos monoinsaturados se encuentran 90 de poliinsaturados, mientras que en el grupo girasol rico en oleico por cada 100 moléculas de monoinsaturados se encuentran 113 de poliinsaturados, lo que da lugar a una diferencia de 23 ácidos grasos poliinsaturados entre los dos grupos.

Esta diferencia no es tan marcada como la encontrada en otros estudios realizados en ratas y utilizando una fuente grasa más poliinsaturada, que como hemos mencionado anteriormente induce relaciones de 0.3 a 0.2 (de Teresa, C., 1995), pero sí lo suficiente como para generar un mayor nivel de hidroperóxidos, en los grupos más poliinsaturados.



*Figura 9.-* Contenido de hidroperóxidos basales e inducidos en microsomas hepáticos.



El grupo Arbequina muestra una relación AGM:AGD intermedia entre la encontrada para el grupo Picual y para el grupo girasol rico en oleico, demostrando su comportamiento esta situación.

No hay que olvidar lo mencionado anteriormente acerca de la situación particular que inducen estas fuentes grasas en la célula, ya que creemos que por sus ligeras diferencias dan lugar a la implantación de un estrés oxidativo muy leve o tenue y con un carácter crónico, lo cual podría permitir a la célula una cierta permisibilidad a la hora de inducir o utilizar los mecanismos de defensa antioxidante y de reparación de los que dispone, sobre todo en base a la mayor o menor peligrosidad que este estrés pueda causar en las diferentes membranas de estudio.

En lo referente a las defensas liposolubles,  $\alpha$ -tocoferol y coenzima  $Q_{10}$ , en microsomas son los grupos alimentados con las variedades Arbequina y girasol rico en oleico los que mayor contenido en  $\alpha$ -tocoferol presentan (*figura 10*), esto refuerza lo comentado anteriormente acerca de la mayor susceptibilidad de estas membranas a ser peroxidadas, ya que en otros estudios se ha observado un mayor contenido en  $\alpha$ -tocoferol en aquellas membranas que presentan un mayor grado de poliinsaturados, con la finalidad de una mayor protección frente a la peroxidación lipídica (Quiles, J.L., 1995; de Teresa, C., 1995).

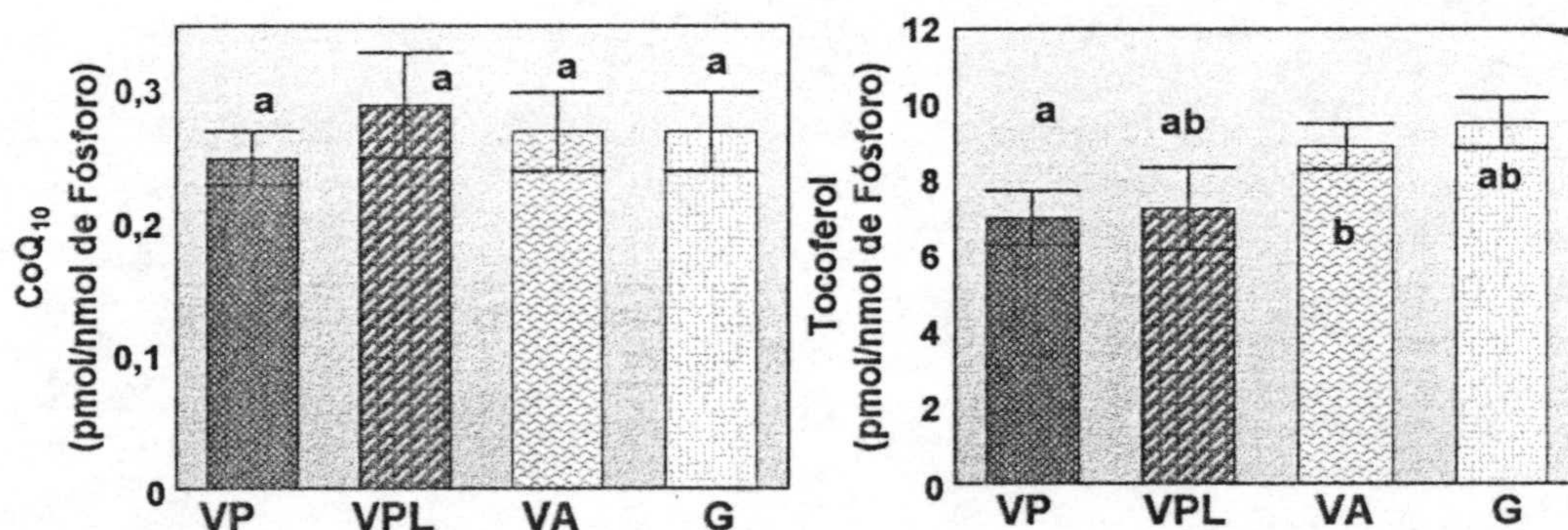


Figura 10.- Contenido en coenzima  $Q_{10}$  y  $\alpha$ -tocoferol en microsomas hepáticos.

El grupo Picual lavado vuelve a ser un grupo peculiar, ya que presenta mayor cantidad de hidroperóxidos basales e inducidos que el grupo alimentado con la misma fuente grasa pero sin ser sometido a este proceso de lavado. Asimismo, su relación AGM:AGD nos indica que serían las membranas menos susceptibles a sufrir peroxidación, hecho que como se ha demostrado no sucede. Estos datos, junto al similar contenido en  $\alpha$ -tocoferol y coenzima  $Q_{10}$  entre los grupos Picual y Picual lavado (*figura 10*), nos refuerza lo observado en LDL, es decir, la presencia en este grupo de una carga exógena de



hidroperóxidos, formados como consecuencia de la pérdida de antioxidantes naturales en esta fuente grasa durante el proceso al que es sometido. Hidroperóxidos que son al parecer incorporados a los fosfolípidos de membrana, pero que en nuestras condiciones analíticas, la columna y el método utilizado en la comatografía de gases, no nos ha permitido reconocerlos.

En otros estudios realizados en ratas y utilizando como fuente grasa un aceite de oliva sometido a un proceso de refinado, se observa también un mayor valor para los parámetros oxidativos estudiados (de Teresa, C., 1995).

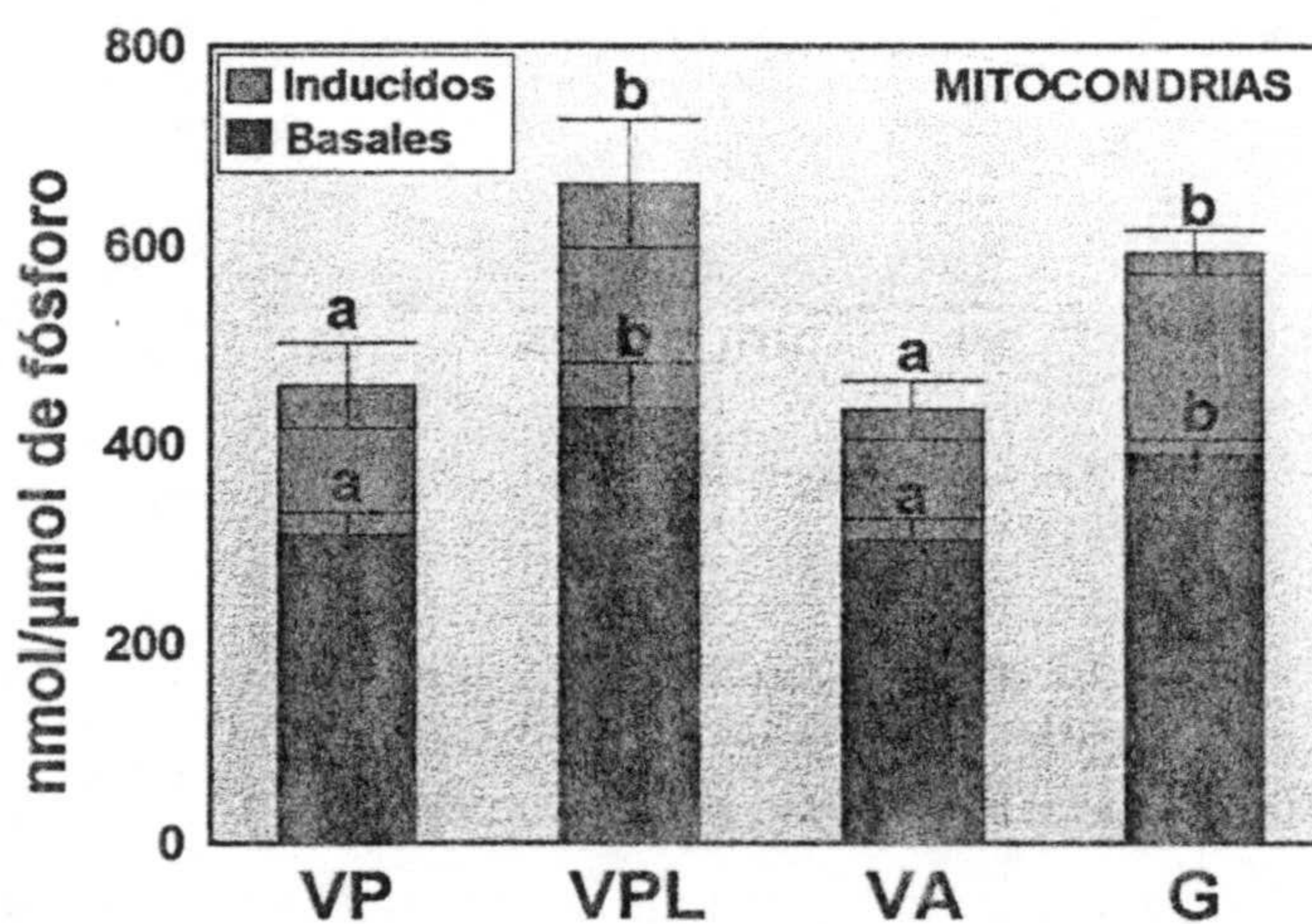
Esta idea se apoya igualmente, en el hecho de que tras la inducción con AAPH, el grupo Picual genera un contenido en hidroperóxidos ligeramente superior al del Picual, pero inferior a los encontrados en los grupos Arbequina y girasol rico en oleico.

En lo que respecta a uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, el malondialdehído, medido como TBARS, muestra en todos los grupos por término medio, 30 veces menor valor que el encontrado para hidroperóxidos, siguiendo en general el mismo patrón observado en estos.

Los niveles de TBARS, son ligeramente inferiores a los observados por otros autores que utilizaban fuentes grasas más poliinsaturadas y a la rata como animal de experimentación (Quiles, J.L., 1995; de Teresa, C., 1995; Casinello, M., 1997).

En mitocondrias hepáticas se observa para hidroperóxidos basales (*figura 11*), un patrón similar al encontrado en microsomas, aunque mucho más marcado. Así, se obtienen valores similares entre los grupos Picual y Arbequina, siendo significativamente superiores en los grupos Picual lavado y girasol rico en oleico.

Este mayor contenido en hidroperóxidos presentado por el grupo Picual lavado, vuelve a reforzar la idea de una carga exógena de peróxidos preformados, sobre los cuales no actúa el tocoferol,



*Figura 11.*- Contenido de hidroperóxidos basales e inducidos en microsomas hepáticos.



al mantener su contenido sin modificar, seguramente como consecuencia del hecho de tratarse de hidroperóxidos ya formados y no de radicales libres que induzcan peroxidación. Así, los contenidos de tocoferol y coenzima Q (figura 12) son similares a los obtenidos en el grupo Picual. Aunque tampoco se puede descartar, en base a las diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos, un posible efecto de los polifenoles presentes en la fuente grasa Picual y ausente en la Picual lavado.

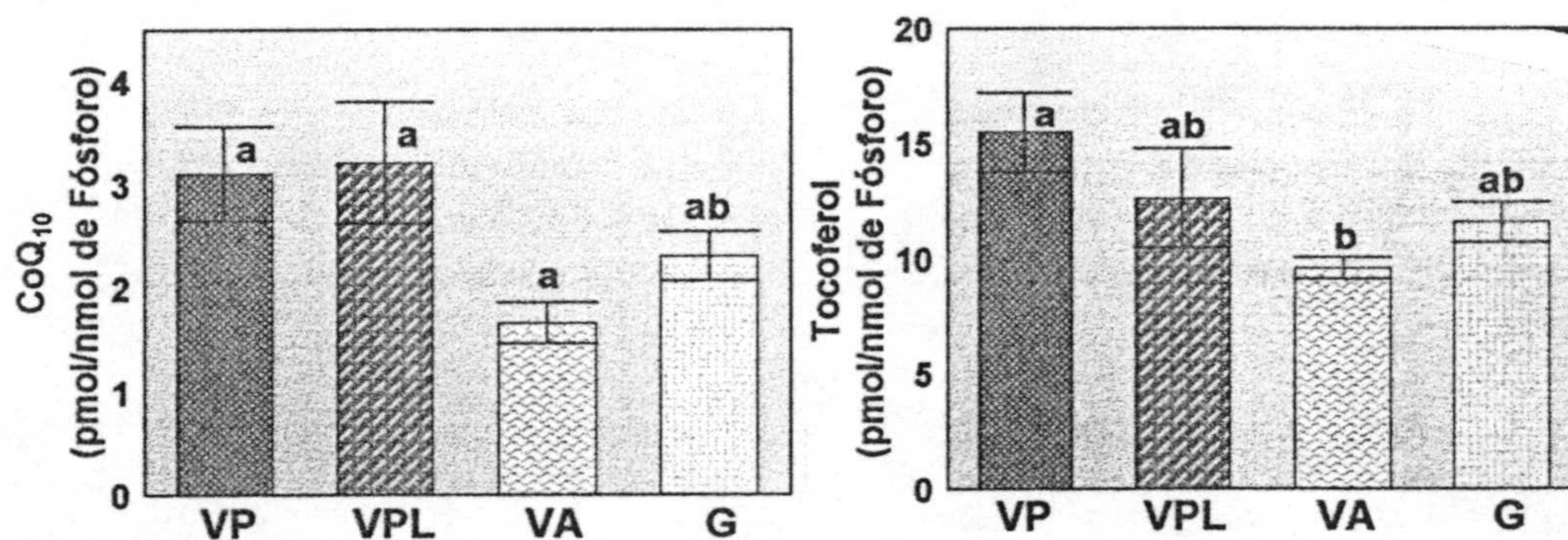


Figura 12.- Contenido en coenzima Q<sub>10</sub> y α-tocoferol en mitocondrias hepáticas.

Las mitocondrias del grupo de animales que ingieren la variedad Arbequina muestran, en cuanto al grado de peroxidación lipídica, un comportamiento un tanto peculiar, ya que generan un contenido de hidroperóxidos idéntico al generado por el grupo Picual, a pesar de presentar una relación AGM:AGP intermedia entre los grupos Picual y girasol rico en oleico. A su vez, es el grupo que menor cantidad de antioxidantes liposolubles (α-tocoferol, coenzima Q<sub>10</sub>) presenta. Huertas y colaboradores (Huertas, J.R, et.al., 1991; Quiles, J.L. et. al., 1994), cuando observan un fuerte descenso en α-tocoferol acompañado generalmente de un descenso en coenzima, como consecuencia de su función antioxidante mediante la regeneración del pool de tocoferol, se encontraban ante una situación caracterizada por una alta tasa de hidroperóxidos.

Lo anteriormente comentado, nos hace pensar que en las membranas mitocondriales del grupo Arbequina existe una generación de hidroperóxidos mayor de la que nosotros detectamos, pero que muy probablemente la actividad de los enzimas reparadores asociados a estas membranas, aunque supuestamente igual de eficiente en los grupos Picual lavado y girasol rico en oleico, muestran la suficiente actividad como para igualar sus valores de hidroperóxidos a los presentados por el grupo Picual.

Así, la fosfolipasa A<sub>2</sub> podría estar disminuyendo la vida media de los ácidos grasos peroxidados en los fosfolípidos, de hecho Sevanian y colaboradores (Sevanian, A. et.al., 1988), trabajando con liposomas compuestos de fosfolípidos observan una mayor actividad



de la fosfolipasa A<sub>2</sub> cuando se alcanza un determinado grado de peroxidación lipídica en las mismas.

Estos datos vuelven a reforzar la idea de un estrés leve y crónico que parece permitir a la célula una cierta permisibilidad en el momento de utilizar sus defensas antioxidantes. Mostrándose una aparentemente mayor utilización de las defensas antioxidantes en mitocondrias, seguramente por la mayor peligrosidad de este orgánulo al presentar una mayor capacidad para generar radicales libres.

En el caso del grupo Picual lavado, volvemos a encontrarnos en una situación de acúmulo de hidroperóxidos preformados, pero en esta situación no parece existir inducción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> lo que nos hace pensar que esta inducción, debe de ser un mecanismo consecuente del establecimiento de un estrés oxidativo y no del acúmulo de hidroperóxidos en sí.

Respecto al contenido de coenzima Q, se muestra un menor valor en los grupos girasol rico en oleico y Arbequina, lo cual es debido a su consumo como antioxidante, regenerando el pool de tocoferol. Este menor nivel de coenzima podría tener una repercusión negativa en su actividad en la cadena de transporte de lectrones mitocondrial, puesto que este compuesto se encuentra normalmente en concentraciones próximas a la Km del complejo III (Lenaz, G. et. al., 1990).

Las mitocondrias poseen un contenido en  $\alpha$ -tocoferol en general mayor que el obtenido en microsomas, a pesar de presentar estos mayor cantidad de fosfolípidos por unidad de superficie, lo cual podría ser un mecanismo adaptativo para prevenir la mayor generación de radicales libres que se produce en mitocondrias (Litarru, G.P., 1994).

El grupo Picual es el que presenta mayor valor en antioxidantes liposolubles, sobre todo para el  $\alpha$ -tocoferol, esta situación es similar a la observada en LDL, por lo que al igual que en las lipoproteínas, no podemos descartar un posible efecto antioxidante de los polifenoles existentes en la dieta, mediante el posible mecanismo de regeneración del pool de tocoferol, entre otras posibles vías de actuación antioxidante.

El otro parámetro indicador del grado de peroxidación lipídica estudiado, el contenido en TBARS, mantiene el patrón observado en hidroperóxidos.

En cuanto a los parámetros estructurales, siempre que existen procesos oxidativos en membranas estructurales, tienen lugar cambios a nivel estructural y por tanto en la funcionalidad de las mismas.

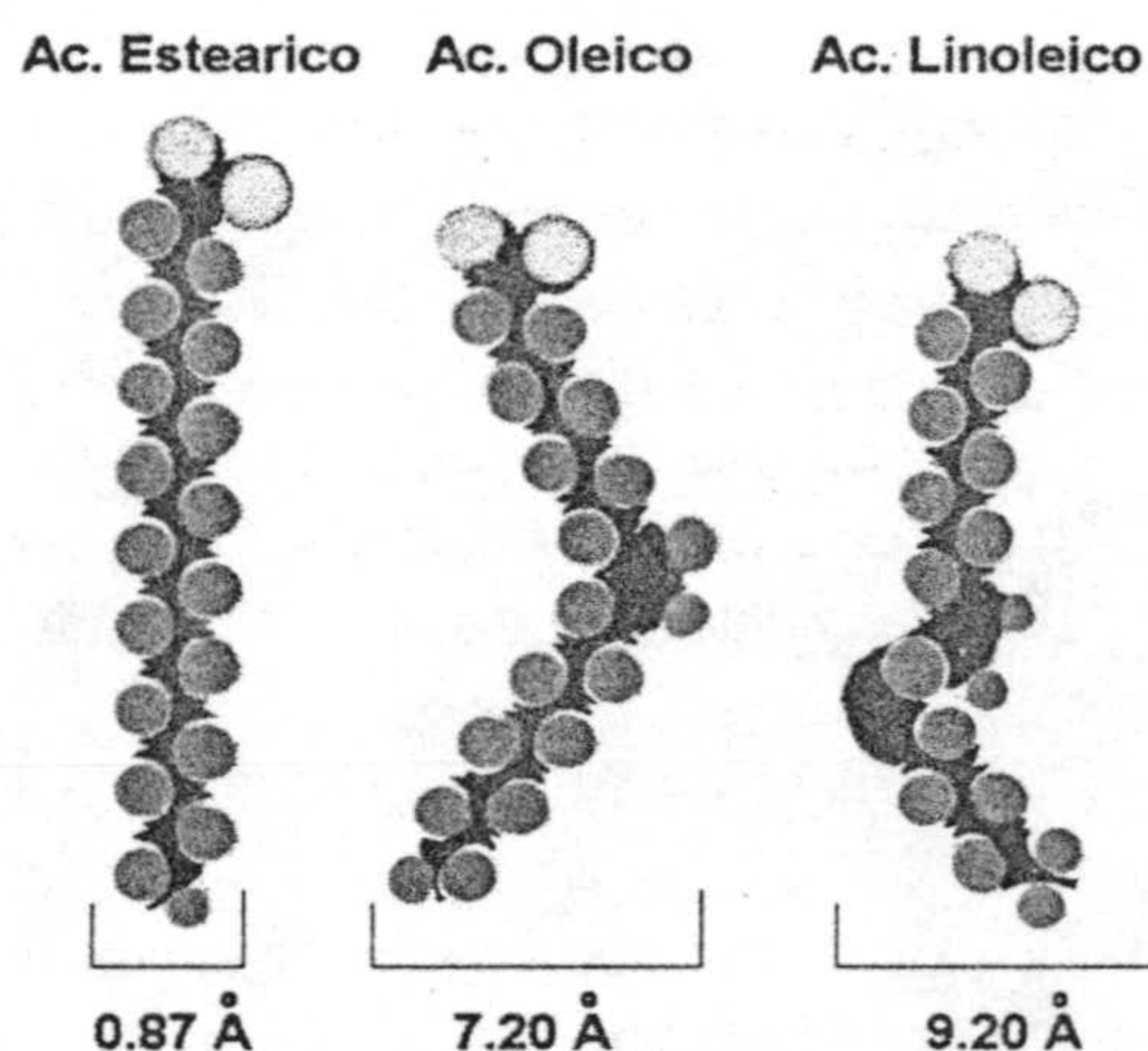
Uno de los parámetros más importantes para reconocer una posible repercusión sobre la funcionalidad de las membranas, es la polarización de fluorescencia, un indicador



inverso del grado de fluidez de las mismas.

La fluidez de las membranas biológicas está determinada por dos parámetros principalmente, el grado de insaturación y el contenido en colesterol, coenzima Q y tocoferoles (Senault, C. et. al., 1990; Hiratmatsu, M. et. al., 1993). Estudios "in vitro" han demostrado que la introducción de ácidos grasos poliinsaturados a membranas aumenta el grado de fluidez, mientras que adicionando colesterol, coenzima Q y tocoferoles se disminuye.

El ácido oleico al presentar un solo doble enlace, hizo pensar a algunos autores que su comportamiento sobre la fluidez en las membranas sería más parecido al presentado por los ácidos grasos saturados que al de los ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, estudiando detenidamente la molécula, esta suposición no está del todo clara (*figura 12*), ya que el ácido oleico solo presenta un doble enlace, pero entre los carbonos 9 y 10, es decir justo en la mitad de su cadena. La posición de este doble enlace hace que la molécula describa en su estructura tridimensional un ángulo de 45° aproximadamente, lo que hace que el diámetro de la base del cono que genera, sea de 7.2 Å aproximadamente. Sin embargo, el linoleico por la presencia de sus dos dobles enlaces entre los carbonos 9-10 y 12-13, genera un cono de aproximadamente 9 Å y en el caso del linoleico, sus tres dobles enlaces entre los carbono 9-10, 12-13 y 15-16, le confieren una diámetro similar al del oleico. Si comparamos estos diámetros con los de un ácido graso saturado, que es aproximadamente de 0.87 Å, entonces el ácido oleico ocuparía 8.5 veces más área en la membrana que un ácido graso saturado, el linoleico ocuparía 10 y el linolénico 9 veces más (de Teresa, C. 1995). Teniendo en cuenta esta similitud entre los distintos ácidos grasos y el hecho de tener membranas con muy ligeras diferencias en su perfil en ácidos grasos, nos indica que la fluidez no debe de presentar grandes diferencias, salvo las provocadas por los procesos de peroxidación lipídica.



*Figura 12.-* estructura tridimensional de los ácidos grasos esteárico, oleico y linoleico, mostrando el diámetro del área que ocuparían en la membrana.

De hecho, en nuestras condiciones experimentales y a pesar del distinto grado de peroxidación descrito anteriormente para cada dieta experimental, no observamos ningún cambio en la fluorescencia de microsomas hepáticos, ni con la sonda TMP-DPH ni con la DPH. Esto concuerda con lo dicho anteriormente y con su similar grado de peroxidación y



contenido en colesterol.

En mitocondrias hepáticas también observamos valores muy similares de polarización de fluorescencia, aunque se produce un ligero incremento obtenido con la sonda DPH en los grupos Arbequina y girasol rico en oleico, lo que nos indica un índice de mayor peroxidación en las mismas, sobre todo si tenemos en cuenta que parte de esta lipoperoxidación se ve tamponada por una movilización de colesterol, mecanismo descrito por Huertas y colaboradores (Huertas, J.R. et. al., 1992), cuando sometían membranas microsomaes a un estrés agudo inducido por adriamicina.

Sin embargo, las membranas tanto mitocondriales como microsomaes del grupo Picual lavado, vuelven a mostrar un característico comportamiento en cuanto al contenido en colesterol de las mismas.

En estas membranas, a pesar de ser las que poseen mayor nivel de hidroperóxidos, no se observa ningún descenso en los niveles de colesterol, no existiendo tampoco cambio en la polarización de fluorescencia para ninguna de las sondas.

En vista a este hecho, creemos que el mecanismo que induce la movilización de colesterol en las membranas celulares cuando aumenta el estrés oxidativo, va a ser iniciado por la presencia de radicales libres, pero no por la acumulación de hidroperóxidos de origen exógeno en las membranas, como ocurre en el grupo Picual lavado.

Junto a la fluidez de membrana estudiamos otro parámetro de gran importancia en la funcionalidad de las mitocondrias, siendo este, el efecto que va a ejercer sobre la obtención en la energía en las mitocondrias las distintas fuentes grasas utilizadas.

Para determinar este efecto se han estudiado el contenido en citocromo de los distintos complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (*figura 13*), asimismo se ha determinado la actividad específica de la citocromo oxidasa, complejo terminal de la cadena.



En líneas generales no se observan grandes diferencias entre ninguna de las fuentes grasas utilizadas, aunque se puede indicar un ligero mayor valor en todos los componentes en los grupos Picual y Picual lavado, es decir los que mayor contenido en oleico presentan. Estos datos concuerdan en cierto modo con los obtenidos por otros autores (de Teresa, C., 1995; Quiles, J.L., 1995; Casinello, M., 1997), los cuales utilizaban a la rata como animal de experimentación y fuentes grasas con mayores diferencias en su composición en ácidos grasos, estos autores observaban que frente a un estrés inducido, bien por ejercicio, tratamiento con xenobióticos o calentamiento de la fuente grasa, una disminución en los grupos alimentados con las fuentes grasas más poliinsaturadas, es decir, las que presentaban un mayor grado de peroxidación lipídica, siendo por el contrario incrementada o mantenida en los grupos con un mayor contenido en oleico.

Esta misma situación puede ser llevada a las membrans de este estudio, ya que como hemos mencionado se establece en ellas una situación de estrés leve y crónico, observándose igualmente que son los grupos alimentados con girasol rico en oleico y Arbequina los que menor valor presentan para los distintos citocromos, aunque las diferencias no son significativas, ni tan marcadas como en los estudios indicados anteriormente.

A este menor valor en el contenido en citocromos, se le adiciona el hecho de que estos grupos son los que menos coenzima Q muestran, componente movil de gran

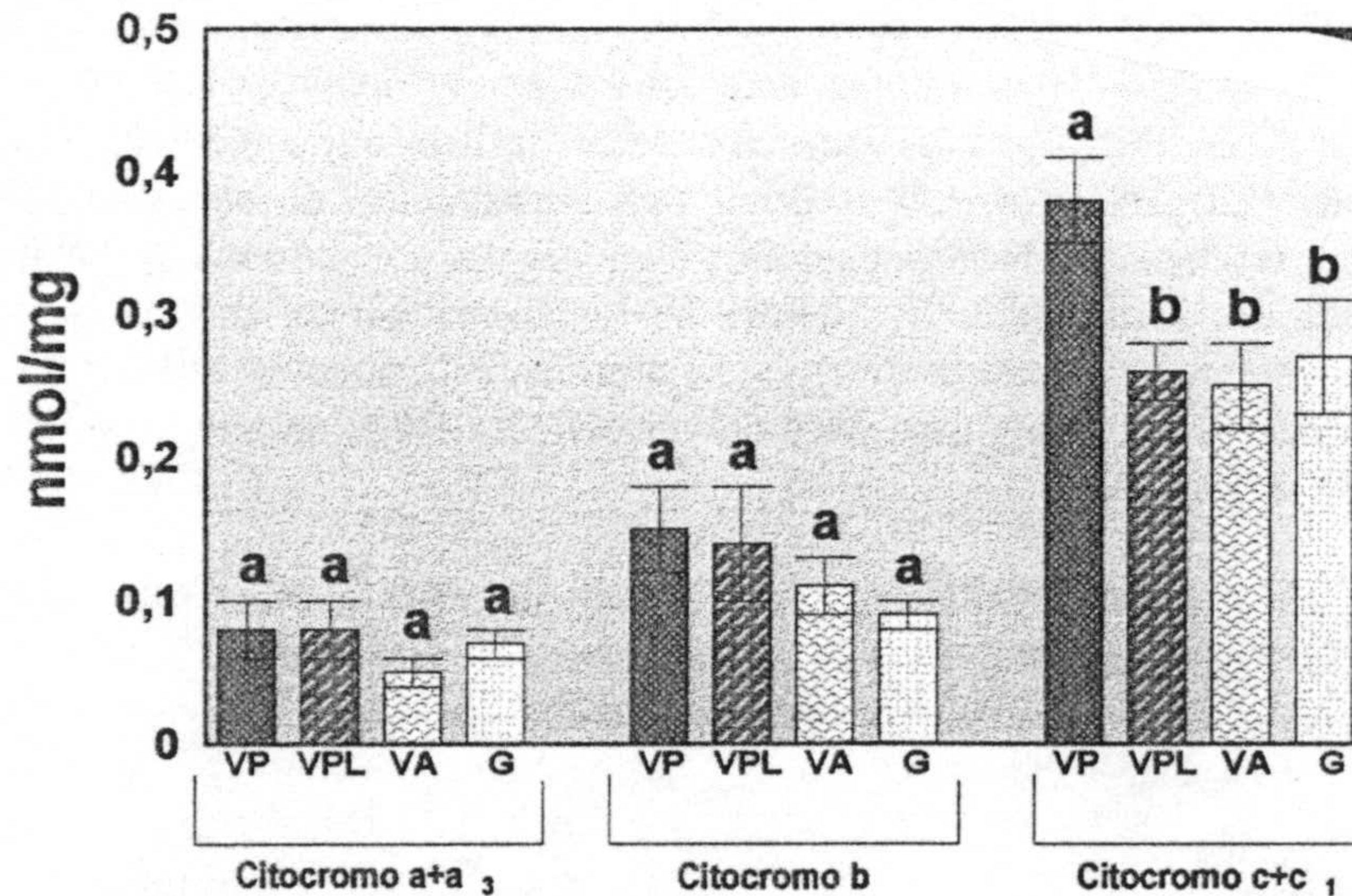


Figura 13.- Contenido en citocromos de la cadena mitocondrial hepática.



importancia en la cadena y cuya disminución implica una menor probabilidad de interacción con el complejo III, limitando por tanto la capacidad para obtener energía, precisamente en dos de los grupos más necesitados de ella al tener incrementada la peroxidación.

Por otro lado, la actividad de la citocromo oxidasa no muestra diferencias entre los grupos de estudio, salvo por un ligero mayor actividad en el grupo girasol, la cual puede ser debida a que igualmente presenta un ligero mayor turnover y sobre todo a que la citocromo oxidasa depende en gran medida de la cardiolipina para desarrollar su actividad máxima, observándose una mayor actividad en situaciones de una mayor cantidad de cardiolipina del tipo C18:2 n-6/C18:2 n-6 (Yamaoka, S. et. al., 1990), situación más idónea en el grupo girasol y un poco menos en el grupo Arbequina, aunque no se observa el descenso que otros autores muestran en situación de estrés oxidativo (Huertas, J., 1992), quizás por la suavidad del estrés con el que trabajamos.

Por último, en lo que se refiere a capacidad antioxidativa en hígado, se ha estudiado la actividad de los enzimas antioxidantes citosólicos, catalasa, superóxido dismutas, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

En líneas generales se observa una menor actividad de la catalasa y glutatión peroxidasa, precisamente en los grupos que mayor índice de lipoperoxidación presentan, siendo especialmente significativa para el grupo girasol rico en oleico, lo que no indica que en estos grupos la capacidad para eliminar  $H_2O_2$  e hidroperóxidos se encuentra limitada y por lo tanto es de esperar una mayor peroxidación lipídica en las membranas, lo que coincide con el mayor contenido en hidroperóxidos. Las otras dos enzimas SOD y glutatión reductasa muestran un ligero menor valor en los grupos Arbequina y girasol rico en oleico, aunque no significativo, aunque en este caso el grupo Picual lavado no muestra ninguna diferencia con respecto al grupo Picual, esto parece indicar que en los grupos Picual lavado, Arbequina y girasol se puede producir una inactivación de catalasa y supuestamente glutatión peroxidasa como consecuencia de una mayor concentración del sustrato sobre el que actúan, de hecho para la catalasa se ha observado en estudios "in vitro" que a determinadas concentraciones de  $H_2O_2$  se produce la formación de numerosos complejos inactivos entre la catalasa y este peróxido (Aebi, H., 1988), lo que da como consecuencia una menor actividad.

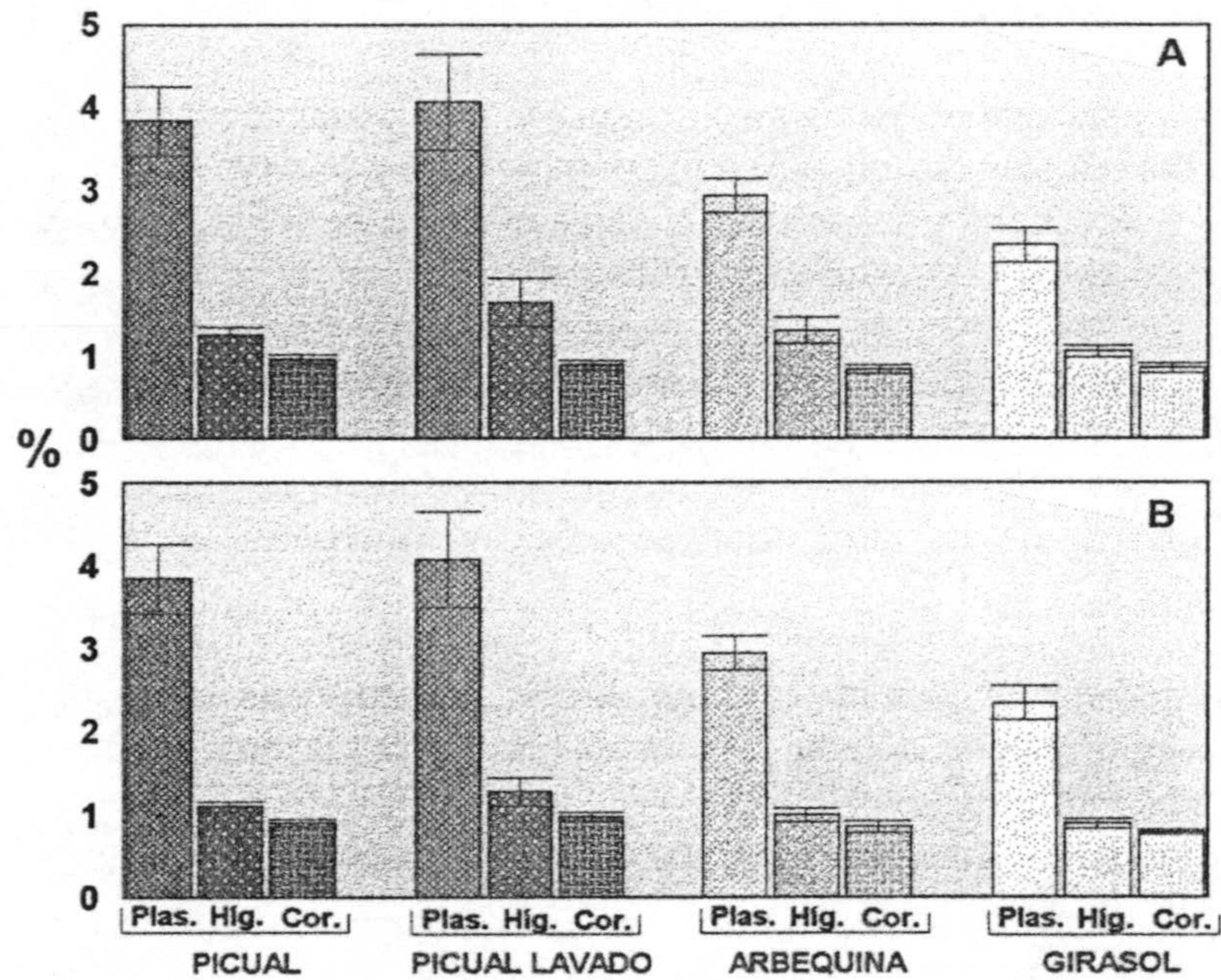
Para nuestro estudio, también hemos recurrido a otro órgano, el corazón, por tratarse de un tejido vital para el funcionamiento del organismo y ser su naturaleza postmitótica. Esto implica que los daños peroxidativos acumulados en el tiempo deberían de ser más marcados.

Estudios previos han observado que el corazón se trata, al igual que el cerebro, de un órgano que presenta una mayor resistencia a reflejar el perfil de ácidos grasos existente en la grasa dietética (Suarez, A., 1992). Así, en estudios llevados a cabo en ratas se ha



encontrado una reducción importante del índice AGM:AGP en corazón, cuando este es comparado con el encontrado en plasma e hígado (Quiles, J.L., 1995).

En nuestro estudio se observa una situación similar, con un descenso en la relación AGM:AGP con respecto al encontrado en plasma e hígado (*figura 14*), aunque no de un modo tan marcado como el observado en otros estudios en los que utilizan fuentes grasas con grandes diferencias en su composición en ácidos grasos (Quiles, J.L., 1995; de Teresa, C., 1995). Una consecuencia de esta situación es la obtención de membranas tanto mitocondriales como microsomales más homogéneas en cuanto a porcentajes de los distintos ácidos grasos, aunque manteniendo las diferencias existentes en las grasas dietéticas.



*Figura 14.*- Relación AGM:AGP en plasma , hígado y corazón. A.- relación plasma y mitocondrias de ambos órganos. B.- plasma y microsomas.



Así, los grupos Picual y Picual lavado son los que mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados presentan, siendo los grupos Arbequina y girasol rico en oleico los poseedores del mayor porcentaje de poliinsaturados, aunque la diferencias no es casi en ningún caso superior al 3%.

En este órgano se observa en general una mayor protección frente a la peroxidación lipídica, ya que si nos fijamos en los resultados obtenidos en el contenido en hidroperóxidos, nos encontramos con unos valores mucho más bajos que los encontrados en hígados, tanto para mitocondrias como para microsomas, aunque presentan un porcentaje de poliinsaturados superior al encontrado en hígado. Esta mayor protección es observada en otros estudios, aunque utilizando a la rata como animal de experimentación (Quiles, J.L., 1995).

Otro indicador de esta mayor protección es el propio grupo Picual lavado, el cual muestra en este órgano un comportamiento muy similar al encontrado en el grupo Picual, lo que nos indica la no presencia de la carga exógena de hidroperóxidos encontrada en todos los otros compartimentos estudiados.

Los hidroperóxidos muestran los valores basales más altos en los grupos girasol rico en oleico y Arbequina, con diferencias significativas tanto para mitocondrias como para microsomas, lo cual concuerda con su mayor contenido en poliinsaturados y con los estudios realizados "in vitro" por Sevanian y Hochstein en 1985 y comentados anteriormente.

Al inducir la oxidación con AAPH, se mantiene la tendencia, aunque las diferencias significativas desaparecen, lo cual nos indica la similitud de sus membranas.

Respecto al contenido en antioxidantes liposolubles ( $\alpha$ -tocoferol y coenzima  $Q_{10}$ ),

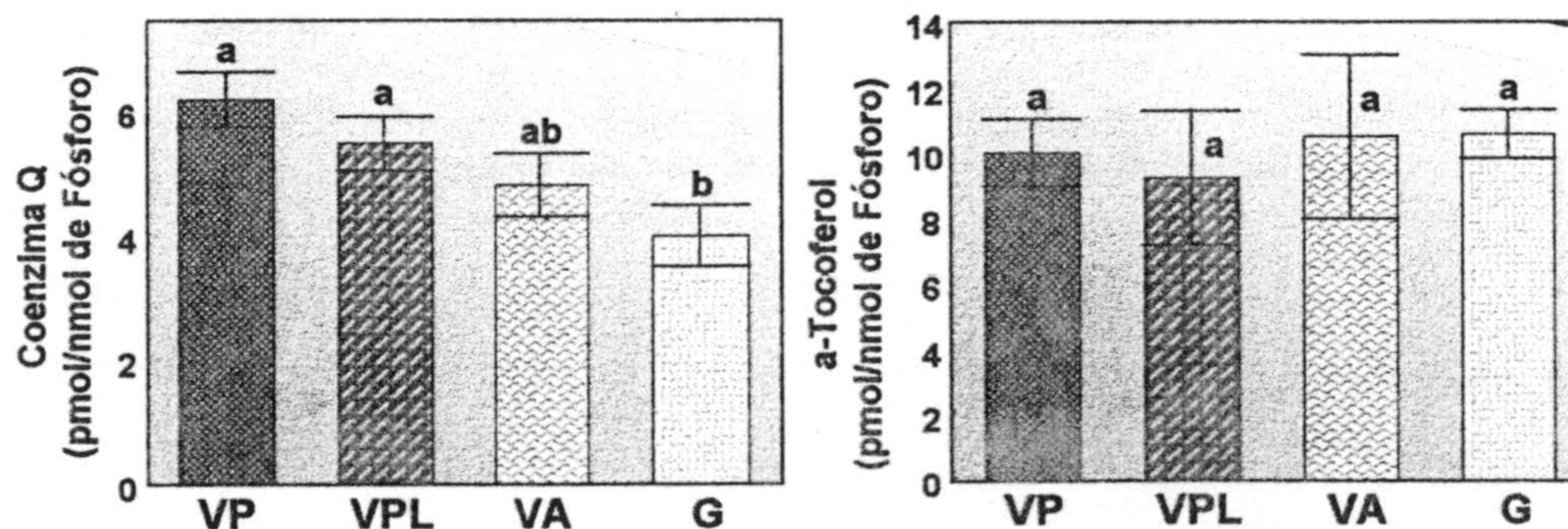


Figura 15.- Contenido en coenzima Q y  $\alpha$ -tocoferol en mitocondrias de corazón.

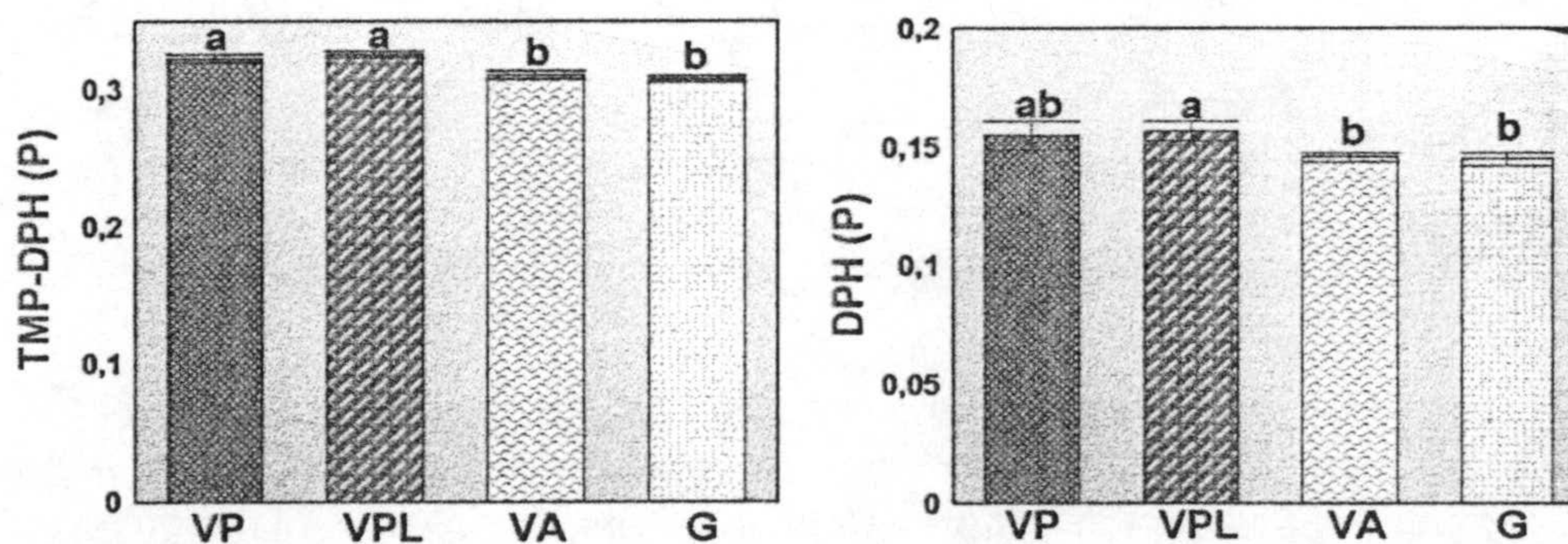


se observa en mitocondrias (*figura 15*) y de manera menos marcada en microsomas, un contenido muy similar para los cuatro grupos de estudio en  $\alpha$ -tocoferol, observándose conjuntamente un menor valor de coenzima Q en los grupos con mayor nivel de hidroperóxidos y por lo tanto mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica. Este menor valor de coenzima y similar en tocoferol, nos muestra un gasto de coenzima con una función antioxidante, para poder regenerar y/o mantener constante el nivel de tocoferol existente en estos grupos, de manera que este pueda actuar sobre la peroxidación lipídica impidiendo que esta se siga propagándose.

Esta misma situación ha sido observada por Huertas y colaboradores (Huertas, J.R., 1991), utilizando a la rata como animal de experimentación y con una fuente grasa con mayor grado de poliinsaturación, estos investigadores encontraron un descenso en los niveles de coenzima Q en el grupo de animales alimentados con maíz tras la inducción de un estrés oxidativo mediante adriamicina.

Ahora bien, aunque este descenso podría tener un efecto antioxidativo beneficioso para la célula, puede ser perjudicial si tenemos en cuenta la función principal de este compuesto, como componente móvil de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Por tanto este descenso puede presentar repercusiones negativas para la obtención de energía a nivel mitocondrial.

Por otra parte, la fluidez de membrana, como uno de los parámetros estructurales estudiados, muestra en general una menor polarización de fluorescencia tanto para la sonda DPH como para la TMP-DPH (*figura 16*), en los grupos Arbequina y girasol rico en oleico, lo cual puede ser debido a su mayor contenido en poliinsaturados, ya que es conocido que aumentan la fluidez de membrana, e incluso por su menor contenido en coenzima, ya que



*Figura 16.*- Polarización de fluorescencia en mitocondrias de corazón.

los otros parámetros que influyen la fluidez, el colesterol y  $\alpha$ -tocoferol, presentan valores



muy similares. Aunque estudios "in vitro" han demostrado que estas ligeras variaciones de fluorescencia implican cambios fisiológicos de fluidez de membrana (Shimitzky, M. e Inbar, M., 1976).

Otro de los parámetros funcionales estudiados, es el contenido en citocromos de los distintos complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (*figura 17*), en estos parámetros no se observa de un modo claro una tendencia general para todos ellos en ninguno de los grupos de estudio. Sin embargo, se observa un ligero menor valor o contenido en el conjunto de ellos para el grupo girasol rico en oleico.

En el grupo girasol rico en oleico, muestra en general un menor valor en prácticamente todos los componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, ya que al menor valor de los citocromo se le une un menor valor en el contenido de coenzima Q y a su vez una menor actividad de la citocromo oxidasa. Esta menor actividad

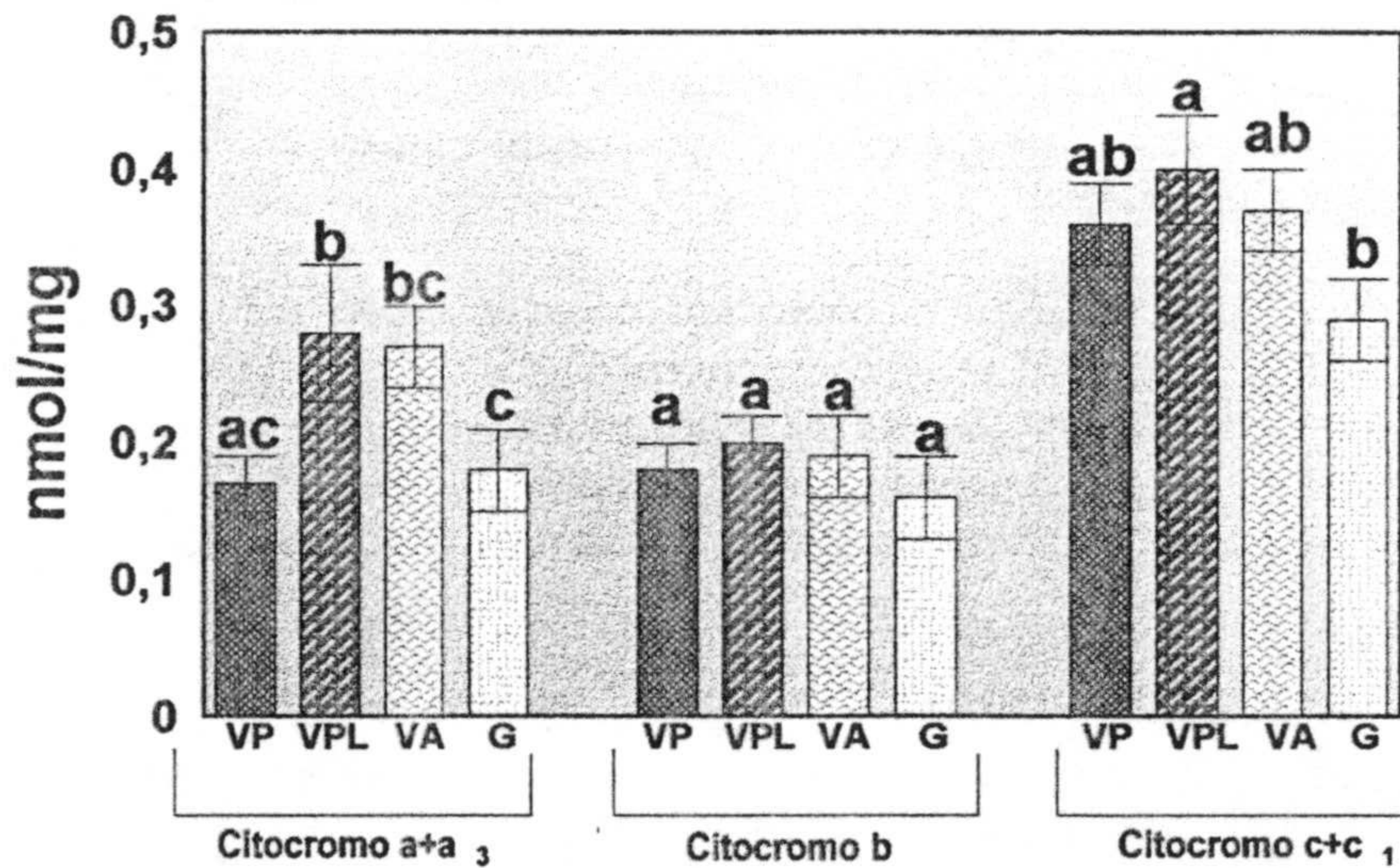


Figura 17.- Contenido en citocromos de la cadena de transporte mitocondrial de corazón.

del complejo IV, es consecuencia de su menor contenido en citocromo a + a<sub>3</sub> y de su menor turnover. Por lo tanto en general se observa una menor capacidad de obtención de energía en este grupo, siendo precisamente el grupo que más energía necesita por presentar mayor grado de peroxidación. Este descenso en la actividad de la citocromo oxidasa en situaciones de estrés oxidativo, también ha sido observado por Huertas y colaboradores (Huertas. J. et. al., 1991), aunque en este caso no se encontró descenso en el contenido en citocromo a+ a<sub>3</sub>.



Por otra parte el grupo Picual presenta una actividad de la citocromo oxidasa similar a la presentada por los grupos Arbequina y Picual, aunque menor contenido en citocromo  $a+a_3$ , la explicación se encuentra en el mayor turnover presentado por este grupo.

En lo que respecta a los enzimas antioxidantes citosólicos, se observa que prácticamente todos los antioxidantes presentan un valor similar, salvo para la glutatión peróxidasa en la cual se observa que el grupo girasol rico en oleico presenta una mayor actividad, seguramente como consecuencia de su mayor contenido en hidroperóxidos, el cual al ser más bajo que el presentado en hígado no parece producir el efecto observado en este órgano. Sin embargo, esta mayor actividad de la glutatión peroxidasa no se ve correspondida con un aumento en la glutatión reductasa, por lo que el sistema antioxidante basado en el glutatión puede no ser todo lo efectivo que debería, al no haber una correlación entre el gasto de glutatión y su correspondiente regeneración.







*CAPITULO VI*

---

CONCLUSIONES







### *CONCLUSIÓN 1ª*

Aunque las cuatro fuentes grasas presentan el mismo contenido en ácido oleico, pequeñas diferencias en su contenido en linoleico, son más que suficientes para variar la relación AGM:AGP. En concreto, la fuente grasa girasol rico en oleico junto a Arbequina, por este motivo, son las que generan membranas más susceptibles a ser peroxidadas.

### *CONCLUSIÓN 2ª*

La fuente grasa Picual, es la más eficiente en la protección de las membranas celulares, observándose un ligero efecto atribuible a su alto contenido en polifenoles, a nivel de lipoproteínas y probablemente, aunque en menor grado, a nivel de mitocondrias hepáticas.

### *CONCLUSIÓN 3ª*

El efecto de la fracción insaponificable de la fuente grasa Picual, podría ser consecuencia de su papel en el mantenimiento del pool de tocoferol reducido.

### *CONCLUSIÓN 4ª*

La fuente grasa Picual lavado es la que genera mayor contenido en hidroperóxidos en mitocondrias y microsomas, aunque pensamos que el origen de los mismos es exógeno, como consecuencia del proceso físico de lavado al que es sometido.

### *CONCLUSIÓN 5ª*

El contenido de  $\alpha$ -tocoferol de las cuatro fuentes grasas estudiadas, es más que suficiente para saturar de esta molécula a las membranas celulares.







*CAPITULO VII*

---

---

BIBLIOGRAFÍA







- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. **150**:121-127.
- Ames, B.N. y Shigenaga, B.N. (1993). Oxidants are a major contributor to cancer and aging. En: DNA and Free Radicals. Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (eds). *Ellis Horwood. New York*, pp 1-15.
- Aniya, Y. y Naito, A. (1993). Oxidative stress induced activation of microsomal glutathione s-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology*. **45(1)**:37-42.
- Arizmendi, J.M.; Runswick, M.J.; Skehel, J.M. y Walker, J.E. (1992). NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. A fourth nuclear encoded subunit with a homologue encoded in chloroplast genomes. *FEBS lett.* **301**:237-242
- Aruoma, O.I.; Halliwell, B.; Gajewski, E. y Dizdaroglu, M. (1991). Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **273**: 601-604.
- Aw, T.Y., Andersson, B.S., Kennedy, F.G. y Jones, D.P. (1986). Intracellular O<sub>2</sub> supply to support mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**:707-716.
- Azzi, A. y Müller, M. (1990). cytochrome c oxidases: polypeptides composition, role of subunits, and location of active-metal centers. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**:242-251
- Babior, B. M., (1978). Oxygen-dependent microbial Killing by phagocytes. *N. Engla. J. Med.* **298**:659-668.
- Babior, B.M. (1984). The respiratory burts of phagocytes. *J. Clin. Invest.* **73**:599-601.
- Band, L. Y Ardaillou, R. (1993). Involvement of reactive oxygen species in Kidney damage. *British Medical Bulletin.* **49(3)**:621-629.
- Barranco, D. (1996). Variedades y patrones. En: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, D. y Rallo, L. (eds). *Mundi-Prensa*.
- Batelli, M.G., Dellacorte, E. y Stirpe, F. (1972). Xanthine oxidase type D (dehidrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochemistry* **126**:747-749.
- Battino, M.; Fato, R.; Parenti-Castelli, G. y Lenaz, G. (1990). Coenzyme Q can control the efficiency of oxidative phosphorylation. *Int. J. Tissue Reactions.* **12(3)**:137-144
- Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J. et. al. (1990), Apparen Hydroxil radical



production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1620-1624.

Benzi, G. y Moretti, A. (1995). Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radical Biology & Medicine.* **19** (1):77-101.

Bersohn, M.M., Philipson, K.D. y F.J. (1982). Sodium calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischaemic rabbit hearts. *Am. J. Physiol.* **242**:C288-C295.

Bielski, B.H.J., Arudi, R.L. y Sutherland M.W., (1983). A study of the activity of HO<sub>2</sub><sup>-</sup> / O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **258**:4759-4761.

Borevis, A. y Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**:707-716.

Borevis, A. y Cadenas, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. *FEBS Lett.* **54**:311-314.

Bowry, V.W., Mohr, D., Clearly, J. y Stocker, R. (1995). Prevention of tocopherol-mediated peroxidation of ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**:5756-5763.

Breimer, L.H. (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.* **3**:188-197.

Brown, L.A.S. y Dean, P.J. (1995). The biology of ascorbic acid. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 117-153.

Bueetner, G.R. (1988). In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals. *J. Biochem. Biophys Meth.* **16**:27-40.

Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., (1995). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 91-115.

Burton, G.W. y Ingold, K.U., (1984).  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* **224**:569-573.

Burton, G.W., Joyce, A. y Ingoldy, K.U. (1982). First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* **11**:327-328.



Calberg, I. y Mannervik, B., (1985). Glutathione reductase. *Methods in enzymology*. **113**:484-490

Capaldi, R.A. (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:569-596

Carp, H., Miller, F., Hoidal, J.R. y Janoff, A. (1982). Potential mechanism of emphysema: alpha-1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidised methionine and has decreased elastase inhibitory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**:2041-2045.

Casey, R.P.; Thelen, M. y Azzi, A. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**:1044-1051

Casinello, M. (1997). Estudio comparativo del consumo de tres fuentes grasas /aceite de oliva virgen, girasol y oliva) crudas y calentadas, sobre procesos oxidativos y funcionalidad de membranas celulares. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

#### CATALASA

Coghlan, J.G., Flitter, W.D. y Ilsley, C.D. (1991). Reperfusion of infarcted tissue and free radicals. *Lancet* **338**:1145-1146.

Corongiu, F.P., Poli, G., Dianzani, M.U., Cheeseman, K.H. y Slater, T.F. (1986). Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. *Chemico-Biological Interactions*. **59**:147-155.

Crane, F.L.; Hatefi, Y.; Lester, R.L. y Widner, C (1957). Isolation of a quinone from beef heart. *Biochim. Biophys. Acta*. **24**:220-221

Chance, B.; Sies, H. y Boveris, A. (1979). *Physiol. Rev.* **59**:577-605.

Cheeseman, K.H. (1993). Lipid peroxidation and cancer. En: DNA and Free Radicals. Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (eds). *Ellis Horwood*. New York, pp 109-144.

Cheeseman, K.H. y Slater T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical Bulletin*. **49**(3): 481-493.

Cheeseman, K.H. y Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. **49**(3):481-493.

Chen, L.; Boissonneault, G.; Hayek, M.G. y Chow, C.K. ( ). Dietary fat effects on



hepatic lipid peroxidation and enzymes of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism and NADPH generation. *LIPIDS*, **28**(7):657-662.

Chomyn, A.; Clester, M.W.J.; Ragan, C.I.; Riley, M.; Doolittle, R.F. y Attardi, G. (1986). URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase unit. *Science* **234**:614-618

Chow, C.K. (1991). Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **11**:215-232.

Davis, K.A. y Hatefi, Y. (1971). Spectra and reconstitution of properties of cytochromes b in complexes II and III. *Biochemistry*.**10**:2509

de Alaniz, M.J.T., de Gómez Dumm, I.N.T. y Brenner, R.R. (1986). Effect of different acids with delta, 9,12-dienoic structures on delta saturation activity in rat liver microsomes. *Lipids* .**21**: 425-429.

de Jong, J.W., van de Meer, P. Nieukoop, A.S., Huizer, T., Stroeve, R.J. y Bos, E. (1990). Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ.Res.* **67**:770-773.

de Teresa, C. (1995). Peroxidación lipídica endógena y funcionalidad mitocondrial en hígado y corazón de ratas alimentadas con distintas fuentes grasas (aceite de oliva virgen , refinado y de maíz). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Deisseroth, A. Y Dounce, A.L. (1970). Catalase:Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews.* **50**(3):319-375.

DellaCorte, E. y Stirpe, F. (1972). The regulation of at liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type I) into oxidasde (type II) and purification of the enzyme. *Biochemistry* **126**:736-745.

Dieber-Rotheneder, M. Phul, H., Waeg, G., Striegl, G. y Esterbauer, H. (1991). Effect of oral supplementation with d-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J. Lipid. Res.* **32**:1325-1332.

Dizdaroglu, M. (1993). Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: DNA and free radicals. Eds. Halliwell, B. Y Aruoma. O.I. *ELLIS HORWORD*. Inglaterra. pp:19-39.

Dreosti, I.E. y Record, I.R. (1978). Superoxide dismutase (Ec 1.15.1.1), zinc status and ethanol consumption in maternal and fetal rat livers.



Duran, N., Farias Furtado, S.T., Faljoni-Alario, A., Campa, A., Brunet, J.E. y Freer, J. (1984). Singlet oxygen generation from the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of an activated CH<sub>2</sub> substrate. *J. Photochem.* **25**:285-289.

Emken, E.A. (1984). *Ann. Rev. Nutr.* **4**:339-376.

Ernster, L., Forsmark, P. y Nordenbrand, K. (1992). The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **548**:41-46.

Esterbauer, H., Zollner, H. y Schaur, R.J. (1990). Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence and determination. En: Membrane Lipid Oxidation. Vigo-Pelfrey, C. (ed.). *CRC Press, Boca Raton, F.L. Volumen I*:239-283.

Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**:779S-786S.

Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. y Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **6**:67-75.

Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. y Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Commun.* **6**:67-75.

Etsuo, N. (1991). Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:1119S-1124S.

Evans, P.H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin.* **49**(3):577-587.

Evans, P.H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin.* **49**(3):577-587.

Fenn, W.O. y Gerschman, R., Gilbert, D.L., Terwibliger, D.E. y Cotharn, F.V. (1957). Mutagenic effects of high oxygen tension on Escherichia Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **43**:1027-1032.

Fielder, E.M., Roverts, P.B., Bray, A.C. y cols. (1974). Mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half active site function in catalysis. *Biochem. J.* **139**:49-52.

Flitter, W.D. (1993). Free radical and myocardial reperfusion injury. *British Medical*



*Bulletin* **49(3)**:545-555.

Frankel, E.N. (1984). Lipid-oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *JAOCS*. **61 (2)**: 1908-1917.

Frei, B. (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Ntr.* **54**:1113S-1118S.

Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.* **44**:147-159.

Fridovich, I., (1989). Superoxide dismutase: an adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **264**:7761-7764.

Fridovich, I. (1976). In:free radicals in Biology. Ed. Pryor. Academic press, New York. Vol. **1**, pp 239.

Friedl, H.P., Till, G.O., Trentz, O. y Ward, P.A. (1989). Roles of histamine complement and xhantine oxidase in thermal injury of skin. *Am. J. Pathol.* **135**:491-495.

Friedl, H.P., Smith, D.J. y Till G.D. (1990). Ischaemia reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.* **136**:491-495.

Friedrich, T.; Hofhaus, G.; Ise, W.; Nehls, W.; Schmitz, B. Y Weiss, H. (1989).A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora Crass*.

García, R., Vall Pallei, C. y Coll, L. (1989). El aceite de oliva y los otros aceites comestibles. Expoliva, Actas de los Simposios Científicos-Técnicos de 1983, 1985 y 1987. Editorial *Soproargra S.A.*

Gillery, P., Monboisse, J.C., Marquat, F.X. y Borel, J.P. (1991). Mecanismos de vieillesement des proteines. *Diabetes Metabolisme.* **17**:1-15.

Girón, M.D., Mataix, J. y Suárez, M.D. (1992). Long-term effects of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the lipid composition of erythrocyte membranes in dogs. *Comparative Biochemistry and Physiology.* **102**:197-201.

Glick, J.M., Adelman, S.J., Phillips, M.C. y Rothblat, G.H. (1983). Cellular cholesteryl ester clearance. Relationships to the physical state of cholesteryl ester inclusions. *J. Biol. Chem.* **258**:13425-13430.

Graham, W.B. y Maret, G.T. (1990). Vitamin E: antioxidant, activity, biokinetics, and



bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* **10**:357-382.

Grandhee, S.K. y Monnier, U.M. (1991). Mechanism of formation of the maillard protein cross-link pentosidine; glucose, fructose and ascorbate as pentosidine precursors. *J. Biol. Chem.* **266**:11649-11653.

Granger, D.N., Rutilio, G. Y McCord, J.M. (1981). Superoxide radicals in feline intestinal ischaemia. *Gastroenterology.* **81**:282-291.

Greenwald, R.A. y Moy, W.W. (1988). Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* **23**:455-463.

Griffiths, H.R. y Lunec, J. (1989). The effects oxygen free radicals on the carbohydrate moiety of IgG. *FEBS Lett.* **245**:95-99.

Groner, Y., Elroy-Stein, O. y Auraham, K.B., (1990). Down syndrome clinical symptoms are manifested in transfected cells and transgenic mice overexpresion the human Cu/Zn-superoxide dismutase gen. *J. Physiol. (Paris).* **84**:53-77.

Grootelvd, M.C., Henderson, E.B., Farrell, A., Blake, D.R., Parkes, H.G. y Haycock, P (1991). Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed joint: Detection of abnormal low molecular weight metabolites by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem. J.* **273**:459-467.

Grootveld, M., Halliwell, B. y Moorhouse, C.P. (1987). Action of uric acid, allopurinol and oxypurinol on the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid. *Free Rad. Res. Commun.* **4**:69-76.

Grum, C.M., Ragsdale, R.A., Ketai, L.H. y Simon, R.H. (1987). Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J. Crit. Care.* **2**:22-26.

Guthenberg, C., Alin, P. y Mannervik, B., (1985). Glutathione transferase from rat testis. *Methods in enzymology.* **186**:448-457.

Gutteridge, J.M.C., Paterson, S.K., Segal, A.W. y Halliwell, B. (1981). Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochemical Journal.* **199**:259-261.

Guyton, K.Z. y Kensler T.W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin* **49** (3):523-544.

Hall, E.D. y Braughler, J.M. (1989). Central nervous system trauma and stroke, II:



physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **6**:303-313.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal.* **184**:469-472.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1989). Free radical in biology and medicine. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1984). Lipid peroxidation. Oxygen radical, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet.* **1**:1396-1398.

Halliwell, G. y Gutteridge, J.M.C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet.* **1**:1396.

Halliwell, B. (1995). Uric acid; an example of antioxidant evaluation. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 243-255.

Halliwell, B.; gutteridge, J.M.C. y Cross, C.E. (1992). Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Labo. Clin. Med.* **119** (6):598-620.

Handelman, G. Y. (1995). Carotenoids as scavenger of active oxygen species. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 259-313.

Hatch, G.M., Vance, D.E. y Wilton, D.C. (1993). Rat liver mitochondrial phospholipase A<sub>2</sub> is an endotoxin-stimulated membrane-associated enzyme of Kupffer cells which is released during liver perfusion. *Biochem. J.* **293**:143-150.

Hatefi, Y.; Haavick, A.G. y Griffiths, D.E. (1963). Electron transport system. XL. Preparations and properties on mitochondrial (NADPH)-coenzyme Q reductase. *J. Biol. Chem.* **237**:1676-1680.

Hatefi, Y. y Stiggal, D.L. (1976). En: Boyer, P.D. (Eds). *The enzymes*. 3<sup>a</sup> edición. Academy Press. Nueva York. Pp 175.

Hatefi, Y. (1985). The enzymes and the enzyme complexes of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Ann Rev. Biochem.* **54**:1015-1069

Hatefi, Y.; Haavick, A.G. y Griffiths, D.E. (1986). Reconstitution of the electron transport system. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **4**:441 - 453



- Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Velasco, R.D., Ooba, S., Kamakura, K. y Mori, A. (1993). Exhaustive exercise affects fluidity and alpha-tocopherol levels in brain symptosomal membranes of normal and vitamin E supplements rats. *Neurochem. Res.* **18**(3):313-316.
- Hirayama, O., Nakamura, K., Hamada, S. y Kobayosi, Y. (1994). Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids.* **29**:149-150.
- Hoban, P.R., Walton, M.I., Robson, C.N., Godden, J., Stratford, I.J., Workman, P., Harris, A.L. y Hichson, I.D. (1990). Decreased NADPH:cytochrome P450 reductase activity and impaired drug activation in a mammalian cell line resistant to mitomycin c under aerobic but not hypoxic conditions. *Cancer Research.* **50**: 4692-4697.
- Huang, Y.S. y Horrobin, D.F. (1987). Effect of dietary cholesterol and polyunsaturated fats on plasma and liver lipids in guinea pigs. *Ann. Nutr. Metab.* **31**:18-28.
- Huertas, J.R., Mataix, J. Mañas, M., bargossi, A.M. y Battino, M. (1994). Dietary polyunsaturated fatty acids and peroxidative risks in sport practice. Alternatives. *J. Sports. Med. Phys. Fit.* **34**: 101-108.
- Huertas, J.R., Battino, M. Barzanti, V., Maranesi, M., Parenti-Castelli, G., Litarru, G.P., Turchetto, C, Mataix, J.y Lenaz, G. (1992). Mitochondrial and microsomal cholesterol mobilizacion after oxidative stress induced by adriamicin in rats fed with dietary olive and corn oil. *Life Sciences.* **50**:2111-2118.
- Huertas, J.R., Battino, M., Lenaz, G. y Mataix, F.J. (1991). Changes in mitochondrial and microsomal rat liver Coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary acid fat and endogenous lipid peroxidation. *Febs letters.* **287** (1,2):89-92.
- Huertas, J.R., Battino, M., Mataix, F.J. y Lenaz, G. (1991). Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oil. *Biochemical and biophysical Research Comunications.* **181** (1): 357-382.
- Huertas. J. R., Battino, M. Barzanti, V., Maranesi, M. Parenti-Castelli, G., Litarru, G.P., Turchetto, E., Mataix, F.J. y Lenaz, G. (1992). Mitochondrial and microsomal cholesterol mobilization after with dietary olive and corn oil. *Life Sciences.* **50**:2111-2118.
- Imlay, J.A. y Fridovich, I. (1991). Assays of metabolic Superoxide production in Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* **266**:6957-6965.
- Jessup, W., Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Hault, J.R.S., Scott, J. Y Leake, D.S. (1990).  $\alpha$ -Tocoferol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem. J.* **265**:399-405.



- Jewett, S.L., Eddy, L. J. y Hochstein, P. (1989). Is the autoxidation of catecholamines involved in ischaemia-reperfusion injury?. *Free Rad. Biol. Med.* **6**:185-188.
- Jialal, I. y Grundy, S.M. (1992). Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **33**:899-906.
- Jiang, Z.Y., Woolard, A.C.S. y Wolff, S.P. (1990). Hydrogen peroxide production during experimental protein glycolation. *FEBS Lett.* **268**:69-71.
- Johnson, W.D., Kayser, K.L., Brenwitz, J.B. y Saedi, S.F. (1991). A randomied controlled trial of allopurinol in coronary bypass sugery. *Am. Heart. J.* **121** (1) :20-24.
- Kadenbach, B.; Jarasch, J.; Hartmann, R. y Merle, P. (1983). Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal Biochem.* **129**:517-521
- Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Koynova, E.A., Kitanova, S.A., Tyurin, V.A., Stoytchev, T.S., Quinn, P.J. y Parcker, L. (1990). Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.* **9**:117-126.
- Kagan, V.E., Nohl, H. y Quim. P.J. (1995). Coenzyme Q: its role in scavenging and generation of radicals in membranes. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York.157-201.
- Kanofsky, J.P. y sima, P. (1991). Singlet oxygen production from reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.* **266**: 9039-9042.
- Kanofsky. J.R., (1990). Quenching of singlet oxygen by human plasma. *Photochem Photobiol.* **51**:299-303.
- Kolb, H. y Kolb-Bachofen, V. (1992). Nitric oxide: A pathogenic factor in autoimmunity. *Immunol. Today.* **13**:157-160.
- Krinsky, N.I., (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* **13**:561-587.
- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free radic. Biol. Med.* **6**: 617-635.
- Kukreja, R.C., Konotos, H.A., Hess, M.L. y Ellis, F.F. (1986). PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.* **59**:612-619.



- Landi, L., Fiorentini, D., Stefanelli, C., Pasquali, P. y Pedulli, G.F. (1990). Inhibition of antioxidation of egg yolk phosphatidylcholine in homogenous solution and in liposomes by oxidized ubiquinone. *Biochim. Biophys. Acta.* **1028**:223-228.
- Landvik, S.V., Diplock, A.T. y Packer, L. (1995). Efficacy of vitamin in human health and disease. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 63-87.
- Laurindo, F.R.M., da Luz, P.L. y Uint, L., (1991). Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation.* **83**:1705-1715.
- Lenaz, G. Battino, M. Castelluccio, C., Fato, R. Cavazzoni, M. Ranchova, H. Bovina, C., Formiggini, G. y Castelli, G. (1990). Studies on the role of ubiquinone in the control of the mitochondrial respiratory chain. *Free Rad. Res. Comms.* **8 (4-6)**:317-327.
- Lenaz, G.; Bovina, C; Castelluccio, C.; Cavazzoni, M.; Estornell, E.; Romano, F.; Huertas, J.R.; Milena, M.P.; Pallotti, F; Castelli, G.P. y Rauchova, H. (1995). Modes of coenzyme Q function in electron transfer. *Protoplasma.* **184**:50-62
- Lenaz, G. (1988). Role of mobility of redox components in the inner mitochondrial membrane. *J. Membrane. Biol.* **104**:193-209
- Liebler, D.C. (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**:147-169.
- Lind, C. Hochstein, P. y Ernester, L. (1982). In: *Oxidase and other redox enzymes*. King, T.E., Mason, H.S. y Morrison, M. (eds). Pergamon Press. Oxford.
- Litarru, G.P. (1994). Energy and defense. Facts and perspective on coenzyme Q<sub>10</sub> in biology and medicine. *Casa editrice Scientifica Internazionale*. Roma
- Litarru, G.P., Battino, M. y Folkers, K. (1995). Clinical aspects of coenzyme Q: Improvement of cellular bioenergetics or antioxidant protection ?. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 203-239.
- Ludwig, B. y Schatz, G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:196-200
- Lunec, J. Brailsford, S., Hewitt, S.D., Morris, C.J. y Blake, D.R. (1987). Free radicals: Are they possible mediators of IgG denaturation and immune complex formation in rheumatoid arthritis. *Int. J. Immunotherapy.* **3**:39-43.



Machlin, L.J. (1991). Vitamin E. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 99-144.

Maestro Durán, R., León Cabello, M<sup>a</sup>. R. y Ruíz Gutiérrez, V. (1993). Los compuestos fenólicos en la defensa de los vegetales. *Grasas y Aceites*. **44**:365-369.

Maestro Durán, R., León Cabello, R. y Gutiérrez Ruíz, V. (1994). Compuestos fenólicos del olivo. *Grasas y Aceites*. **45**(4):265-267.

Maiorino, M., Gregolin, C. y Ursini, F., (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*. **186**:448-457.

Malatesta, F; Georgevich, G.; Capaldi, R.A. (1983). In structure and function of membrane proteins. Ed. E. Quag. Liatiello, F. Palmieri. Pp. 223-235. Amsterdam:Elsevier

Malis, C.D., Weber, P.C., Leaf, A. y Bonventre, J.V. (1990). Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increases susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species. Evidence for enhanced activation of phospholipase A<sub>2</sub> in mitochondria enriched with n-3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**:8845-8849.

Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A. y Zappia, V. (1997). The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-etanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in caco-2 cells.

Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*. **113**:491-495.

Martínez de Victoria, E. y Mañas, M. (1996). El aceite de oliva en la dieta y salud humana. En: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, D. y Rallo, L. (eds). *Mundi-Prensa*.

Massi, I., Giani, E. y Galli, C. (1986). Diets rich in saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids differently plasma lipids, platelets and arterial wall eicosanoids in rabbits. *Ann. Nutr. Metab.* **30**:66-71.

Mataix, J. Mañas, M., Quiles, J., Battino, M., Casinello, M., Lopez-Frias, M. y Huertas, J.R. (1997). Coenzyme Q content depends upon oxidative stress and dietary fat unsaturation. *Molec. Aspects. Med.* **18**:129S-135S.

Mataix, J. y Martínez de Victoria, E. (1989). El aceite de oliva . Bases para el futuro. Dirección General de Investigación y Extensión Agraria. *Centro de Información y Documentación Agraria*. Sevilla.



- Mataix, J. (1994). El aceite de oliva en la dieta y salud humana. En: Olivicultura. Jornadas Técnicas. *Agrolatina S.L.* 129-134.
- Mattson, F.M. y Grundy, S.M. (1985). Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J.Lipid. Res.* **26**:194-202.
- McCord, J.M. (1989). Free radical and heart disease. In: Nutritional Impact of Food Processing. Eds. Somogy, J.C.; Müller, H.R. *Bibli. Nutr. Dieta*, Basel, Karger, **43**:327-337.
- McCord, J.M., Roy, R.S. y Schaffer, S.W. (1985). Free radical and myocardial ischaemia. The role of xanthine oxidase. *Adv. Myocardiol.* **5**:183-189.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry.* **224**(22): 6049-6055.
- McCord, J.M. (1979). In: Reviews in Biochemical Toxicology. Eds. Hodgson, E.; Berd, J.R. y Philpot, R.M. Elsevier, New York. Vol. **1**, pp.109.
- Meier, B.; radeke, H.; Selle, S. et. al. (1990). Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patients suffering from arthritis. *Free Radic. Res. Commun.* **8**:149-160.
- Meister, A. (1994). Glutathione, Ascorbate, and cellular protection. *Cancer Research.* **54**:1969S-1975S.
- Mellors, A. y Tappel, A.L. (1966). Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation. *Lipids.* **1**:282-284.
- Mesa, J.A.G., Linares, P., Luque, M.D. y Valcárcel, M. (1990). Direct automatic determination of polyphenols in olive oils in the aqueous phase of a flow-injection liquid-liquid extraction system without phase separation. *Anal. Chim. Acta.* **235**:441-444.
- Minotti, G. y Aust, S.D. (1992). Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids.* **27**:219-226.
- Minotti, G. y Aust, D. (1987). The role of Iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* **44**: 191-208.
- Mitchell, P. (1976). Protonmotive Q cycle. General formulation. *J. Theor. Biol.* **62**:327-367
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology,



pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**:109-142.

Monstantinov, A.A. (1990). *Biochim. Biophys. Acta.* **1018**:138-141

Monte, M. y Sacerdote de Lustig, E. (1994). Radicales libres del oxígeno y superóxido dismutasas: Aspectos biológicos y médicos. *Medicina (Buenos Aires)*. **54**:61-68.

Montedoro, G.I. (1972). Costituenti fenolici presenti negli oil virgini de oliva. *Sci. Tecnol. Alimenti.* **2**:177-186.

Mosialou, E., Ekström, G. Adang, A.E.P. y Morgenstern, A., (1993). Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology.* **45**(8):1645-1651.

Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S. y Nagaoka, S. (1993). Kinetic study of free radical scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochim. Biophys. Acta.* **1157**:313-317.

Murrell, G.A.C.; Francis M.J.O. y Bromley, L. (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen Free radicals. *Biochem. J.* **265**:659-665.

Nagaoka, S., Okauchi, Y., Urano, S., Nagashima, U. y Mukai, K. (1990). Kinetic and ab initio study of the prooxidant effect of vitamin E. Hydrogen abstraction from fatty acid esters and egg yolk lecithin. *J. Am. Chem. Soc.* **112**:8921-8924.

Nakayama, . (1994). Suppresion of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Research.* **54**:1991 S-1993 S.

Nassi-Caló, L., Mello-Filho, A.C. y Meneghini, R. (1989). O-phenanthroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphological transformation. *Carcinogenesis.* **10**:1055-1057.

Nergiz, C. (1993). The effect of refining processes on the total polyphenol and 1,2-diphenol content of olive oil. *International Journal of Food Science and Technology.* **28**:461-464.

Nichols, D.G. (1982). In: Bioenergetics - An introduction to the chemiosmotic Theory. Academic Press. London.

Nieto, N. (1993). Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia.



- Niki, E. (1995).  $\alpha$ -Tocoferol. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 3-25.
- Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. (1980). Differential aspects of antimycin on semiquinone bound in different environments in isolated succinate-cytochrome c reductase complex. *J. Biol. Chem.* **255**:278
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. y Nicotera, P. (1989). Role of calcium in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Science.* **10**:281-285.
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. Y Nicotera, P. (1989). Role of  $Ca^{2+}$  in toxic cell Killing. *Trends. Pharmacol. Sci.* **10**:281-285.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**:1050 S-1055 S.
- Papadopoulos, G., Tsimidou, M. y Boskoun, D. (1993). Stability of virgin olive oil, assesment of natural antioxidants and other related factors. *Dev. Food. Sci.* **32**:321-326.
- Parenti-Castelli, G.; Fato, R.; Battino, M.; Castelluccio, C. y Lenaz, G. (1987). *Chem. Scripta.* **27**:161-166
- Parks, D.A., Bulkley, G.B., Granger, D.N., Hamilton, S.R. y McCord, J.M. (1982). Ischemic injury in the cat intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* **82**: 9-15.
- Peden, D.B., Swiersz, M., Okkubo, K., Hahn, B., Emery, B. y Kaliner, M.A., (1993). Nasal secretion of the ozone scavenger uric acid. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**:455-461.
- Poli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U. y Slater, T.F. (1981). The role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced damage to liver microsomal enzymes. Comparative studies using microsomes and isolated liver cells. *Chemico-Biological Interactions.* **37**:13-24.
- Poli, G. (1993). Liver damage due to free radicals. *British Medical Bulletin.* **49** (3):604-620.
- Porter, N.A. (1990). Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: initiation, propagation and product distribution (basic chemistry). En: Membrane lipids oxidation. Vigo-Pelfrey, C. (ed.). *CRC Press, Boca Raton, F.L. Volumen I*:33-62.
- Quiles, J.L. (1995). Estudio comparativo del aceite de oliva y girasol sobre la peroxidación lipídica en ratas sometidas a ejercicio físico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada



Quiles, J.L., Huertas, J.R., Mañas, M., Battino, M., Casinello, M., Litarru, G.P., Lenaz, G. Y Mataix, J. (1994). Peroxidative extent and coenzyme Q levels in the ratio influence of physical training and dietary fats. *Molec. Aspects. Med.* **15**:89S-95S.

Radi, R.; Turrens, J.F. y Freeman, B.A. (1991). Cytochrome c-catalized membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **288** (1): 118-125.

Ragan, C.I.; Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1982). Purification of three iron-sulfur-proteins from the iron-protein fragment of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochemistry* **21**:2518-2524

Ragan, C.I. (1990). A structure on function of an archetypal respiratory chain complex: NADH-ubiquinone reductase. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:515-516

Ramasarma T. (1985). Natural occurrence and distribution of CoQ. In: Coenzyme Q. Lenaz, G. (ed.) John Wiley & Sons, Chichester, pp. 67-81

Ramon, R.J. (1993). Protocolos: Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. *Editorial IDEPSA.*

Ramotar, D. y Demple, B. (1993). Enzymes that repair oxidative damage to DNA. En: DNA and Free Radicals. Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (eds). *Ellis Horwood.* New York, pp 165-191.

Redl, H., Gasser, H., Schlag, G. y Marzi, I. (1993). *British Medical Bulletin* **49** (3): 556-565.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganda, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.

Richter, C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *The Chemistry and Physics of Lipids.* **44**:175-189.

Ritcher, C., Park, J.W. y Arnes, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:6465-6467.

Roberfroid, M. Y Buc-Calderón, P. (1995). Free radical and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.

Roche, E. Y Romero-alvira, D. (1996). Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. *Med. Clin.* **106**:144-153.



- Romero Alvira, C. y González Martínez, F. (1992). Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica. *An. Esp. Pediatr.* **36(2)**:85-97.
- Rossi, M.A., Fidale, F., Ganamone, A., Esterbauer, H. y Dianzani, M.U. (1990). Effect of 4-hydroxyalkenals on hepatic phospholipase C. *Biochemical Pharmacology.* **39**:1715-1719.
- Roy, R.S. y McCord, J.M. (1983). Superoxide and ischaemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In *Oxy radicals and their scavenger systems Vol II.* Greenwald y cohen (eds) 145-153. Elsevier Science Publishing.
- Rueda, P., Pharm, B., López-Frías, M., Llopis, J. Mataix, J. y Urbano, G. (1992). Influence of dietary fat on plasma fatty acid composition in rats. *Nutr. Res.* **12**:757-766.
- Ruiz Gutiérrez, V., Muriana, F.J.G., Maestro, R. Y Graciani, E. (1995). Oleuropein on lipid and fatty acid composition of rat heart. *Nutrition Research.* **15(1)**:37-51.
- Ryrfeldt, A., Bammenberg, G. y Moldius, P. (1993). Free radical and lung disease. *British Medical Bulletin.* **49 (3)**:588-603.
- Sanori, B.; Lenaz, G.; Battino, M.; Marconi, G. y Domini, I. (1992). On coenzyme a orientation in membranes: a linear dichroism study of ubiquinones in a model bilayer. *J. Membr. Biol.* **128**:193-203
- Saran, M. y Bors, W. (1990). Radical Reactions in vivo-an overview. *Rad. Env. Biophys.* **29**:249-
- Saran, M.; Michel, C. y Bors, W. (1989). Reactions of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radical Res. Commun.* **10**: 221-226.
- Saraste, M.; Pentilla, T. y Wikstrom, M. (1981). *Eur. J. Biochem.* **115**:261-268
- Sauberlich, H.E. (1994). Pharmacology of vitamin C. *Ann. Rev. Ntr.* **14**:371-391.
- Scott, M.D., Eaton, J.W. y Kuypers, F.A., (1989). Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense. *Blood.* **74**:2542-2549.
- Schroder, I.; Gunsalus, R.P.; Ackrell, B.A.C. y Kashara, M. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**:101-108
- Schwartz, J. y Weiss, S.T. (1990). Dietary factors and their relationships to respiratory symptoms:NHANESII. *Am. J. Epidemiol.* **132**:67-76.



Seiquer, I., Mañas, M., Martínez de Victoria, E., Huertas, J.R., ballesta, M.C., y Mataix, J. (1994). Efecto of adaption to diets enriched with saturated, monounsaturated and polyunsaturated fats on lipid and serum fatty acid levels in miniature swine (*Sus Scrofa*). *Comp. Biochem. Physiol.* **108A**:377-386.

Seiquer, I. (1991). Modificaciones metabólicas lipídicas en mini-cerdos con adaptaciones alimenticias a largo plazo. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Senault, C., Yazbeck, J., Gourbern, M., Portet, R., Vincet, M. y Gallay, J. (1990). Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondrial of rat brown adipose tissue. Effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **1023** (2):283-289.

Sevanian, A., Davies, K.J.A. y Hochstein, P. (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:1129S-1134S.

Sevanian, A., Wratten, M.L., Mcleod, L. y Kim, E. (1988). Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structured basis for enzyme activation. *Biochimica et Biophysica Acta.* **961**:316-327.

Sevanian, A. y Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* **5**:365-390.

Sevanian, A. y Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* **5**:365-390.

Sevanian, A. y Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* **5**: 365-390.

Shaich, K.M. (1992). Metals and lipid oxidation: contemporary issues. *Lipids.* **27**:209-218.

Shinitzky, M. e Inbar, M. (1976). *Biochim. Biophys. Acta.* **433**:133-140.

Sies, H. Ed. (1991). Oxidative stress, oxidants and antioxidants. New York. Academic Press.

Sies, H., Kaiser, S., Di Mascio, P. y Murphy, M.E. (1993). Scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. In: Vitamin E in health and disease. *Marcel Dekker, Inc.* New York. 141-152.



- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**:213-219.
- Simic, M.G. y Jovanovic, S.V., (1989). Antioxidation mechanisms of uric acid. *J. Am. Chem. Soc.* **111**:5778-5782.
- Simpson, K.L. y Chichester, C.O., (1981). Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* **1**:351-374.
- Singal, P.K., Beanish, R.E. y Dhalla, N.S. (1983). Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **161**:391-401.
- Singh, S.V., Iqbal, J. y Krishnam, A. (1990). Cytochrome P450-reductase, antioxidant enzymes and cellular resistance to doxorubicin. *Biochemical Pharmacology.* **40**:385-387.
- Sjodin, B., Hellstern-Westling, Y. y Apple, F.S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* **10**:236-254.
- Slater, T.F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* **222**:1-15.
- Slater, T.F. y Cheeseman, K.H. (1987). Lipid peroxidation. En: Prostaglandins and related substances. Benedetto, R.G., McDonald-Gibson, R.G., Nigam, S. y Slater, T.F. (eds.). *IRL Press, Oxford*, pp 243-258.
- Stadtman, E.R. (1991). Ascorbic Acid and oxidative inactivation of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:1125S-1128S.
- Stradtman, E.R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biol. Med.* **9**:315-325.
- Stubbe, J., (1990). Ribonucleotide reductase; amazing and confusing. *J. Biol. Chem.* **265**:5329-5332.
- Sugano, M.I. e Ishida, I. (1986). Hypocholesterolemic effect of gamma-linoleic acid as evening primrose oil in rats. *Ann. Nutr. Metab.* **30**:289-295.
- Suzukawa, M., Ishikawa, T., Yoshida, H. y Nakamura, H. (1995). Effect of in vivo supplementation with low dose vitamin on susceptibility of low density lipoprotein and high density lipoprotein to oxidative modification. *J. Am. Coll. Nutr.* **14**:46-52.
- Tappel, A. (1968). Will antioxidant nutrients slow aging process?. *Geriatrics.* **23**:97-105.



Turrens, J.F. y Borevis, A. (1990). Generation of superoxide anion by the NADH deshidrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**:421-427.

Tzagoloff, A.; Macino, G. y Sebald, W. (1979). Mitochondrial genes and translation products. *Ann. Rev. Biochem.* **48**:419-441

Uceda, M. y Hermoso, M. (1996). La calidad del aceite de oliva. En: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, D. y Rallo, L. (eds). *Mundi-Prensa*.

Ursini, F., Maiorino, M. y Sevanian, A. (1991). Membrane hidroperoxides. En: Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Sies, H. (ed.). *Academic Press, London*, pp319-336.

Valenzuela, A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences.* **48**:301-309.

Vázquez Roncero, A., Janer del Valle, C. y Janer del Valle, M<sup>a</sup>. L. (1976). Componentes fenólicos de la aceituna III. Polifenoles del aceite. *Grasas y Aceites.* **24**:350-357.

Vázquez Roncero, A., Janer del Valle, C. y Janer del Valle, M<sup>a</sup>. L. (1973). Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y aceites.* **24** (6):350-357.

Visioli, F. y Galli, C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences.* **55**(24)

Von Sonntag, C. (1987). The chemical basis of radiation biology. Eds. Taylor and Francis. London.

Walker, J.E. (1992). The NADH-ubiquinona oxidoreductase (complex I) of respiratory chain. *Q.Rev.Biophys.* **25**:253-324

Warholm, M., Cuthenberg, C., Von Barh, C. y Mannervick, B. (1985). Glutathione transferases from human liver. *Methods in enzymology.* **113**:499-504.

Washko, P. y Levine, M. (1992). Inhibition of ascorbic acid transport in human neutrophils by glucose. *J. Biol. Chem.* **267**:23568-23574.

Weiss, H. y Kolb, H.J. (1979). Isolation of mitochondrial succinato ubiquinone reductase, cytochrome c reductase from "Neurospora Crassa" using nonionic detergent. *Eur. J. Biochem.* **99**:139-149

Werns, S.W., Shea, M.J., Mitsos, S.E., Dysko, R.C. Fantone, J.C., Schork, M.A., Abrams,



G.D., Pitt, B. y Lucchesi, B.R. (1986). Reduction of the size of infarction by allopurinol in the ischemic-reperfused canine heart. *Circulation* **73**:518-524.

Wikstrom, M.; Krab, K. y Saraste, M. (1981). Proton-translocating cytochrome complexes. *Ann. Biochem.* **50**:628-655

Wikstrón, M. y Krab, K. (1979). Generation of electrochemical proton gradient by mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **549**:177-222

Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J. y Blake, D.R. (1993). Free radical in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin.* **49** (3):507-522.

Wiseman, S.A., Mathot, J.N., de Fown, N.J. y Tijburg, L.B. (1996). Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis.* **120**(12):15-23.

Wolff, S.P., (1993). Diabetes Mellitus and free radicals. *British Medical Bulletin.* **49** (3):642-652.

Wolff, S.P., Crabba, M.J.C. y Thornalley, P.J. (1984). The autoxidation of simple monosaccharides. *Experientia.* **40**:244-246.

Wolff, S.P. y Dean, R.T. (1987). Glucose autoxidation and protein oxidation: The role of autoxidative glycosilation in diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J.* **245**:243-250.

Yamaoka, S., Urane, R. y Kit., M. (1990). Cardiolipin molecular species in rat heart mitochondria are sensitive to essential fattyacid-deficient dietary lipids. *J. Nutr.* **120**:415.