



iUNiCS

Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut



Govern
de les Illes Balears

**ESTUDIO DEL ESTADO OXIDATIVO. NIVELES EN
INDIVIDUOS SANOS Y DISTINTOS GRUPOS PATOLÓGICOS**

Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS)

Programa de Doctorado en Ciencias Biosociosanitarias

Tesis doctoral

Rafael Àngel Fernàndez Cabot

Directores

Dr. Félix Grases Freixedas

Dra. Antonia Costa Bauzá

Palma de Mallorca, 2014

Directores de la tesis doctoral

Dr. Félix Grases Freixedas

Catedrático de Química Analítica

Universitat de les Illes Balears

Dra. Antonia Costa Bauzá

Profesora Titular de Toxicología

Universitat de les Illes Balears

Memoria presentada por:

Rafael Àngel Fernàndez Cabot

Licenciado en Farmacia

Para aspirar al grado de Doctor por la Universitat de les Illes Balears

CERTIFICACIÓN DE LOS DIRECTORES

El Dr. Félix Grases Freixedas, Catedrático de Química Analítica de la Universitat de les Illes Balears, y la Dra. Antonia Costa Bauzá, Profesora Titular de Toxicología de la Universitat de les Illes Balears.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado ***“Estudio del estado oxidativo. Niveles en individuos sanos y distintos grupos patológico”***, constituye la memoria presentada por Rafael Àngel Fernàndez Cabot para aspirar al grado de Doctor, habiendo sido realizada bajo nuestra dirección y que reúne, a nuestro juicio, los requisitos exigidos para la obtención del grado mencionado.

Dr. Félix Grases Freixedas
Catedrático de Química Analítica
Universitat de les Illes Balears

Dra. Antonia Costa Bauzá
Profesora Titular de Toxicología
Universitat de les Illes Balears

Palma de Mallorca, 2014

DEDICATORIA

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su ayuda y apoyo incondicional. A mis abuelos, allí donde estén, de los cuales nunca me faltaron palabras de ánimo. También al resto de mi familia por participar en los experimentos.

A mis directores, por aceptarme y haber hecho posible la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, quienes no se negaron a prestarme ayuda cuando la necesité.

Al IES Antoni Maura y al CC Escolapias por permitirme presentar el proyecto a los docentes, y ofrecerse voluntarios para los estudios.

Finalmente, al grupo de Urología de Son Espases y al Centro de Neurología y Psicología (CLONUS) de la Clínica Juaneda, ya que sin su colaboración no habría sido posible llevar a cabo esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES	3
2. DEFENSAS CONTRA LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	5
3. ACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES	7
4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y DAÑO TISULAR	9
4.1. Consecuencias de la peroxidación lipídica en material biológico	11
5. RELACIÓN ENTRE LOS RL Y DISTINTAS PATOLOGÍAS	12
5.1. Enfermedades cardiovasculares	12
5.2. Diabetes	14
5.3. Síndrome metabólico	14
5.4. Enfermedad hepática	15
5.5. Cáncer	16
5.6. Cataratas	17
5.7. Envejecimiento	17
5.8. Afecciones cutáneas	17
5.9. Enfermedades neurológicas	18
5.9.1. Estrés oxidativo y enfermedades neurológicas	18
5.9.1.1. El efecto del estrés oxidativo en la neurodegeneración	18
5.9.1.2. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	22
5.9.1.3. Estrés oxidativo e inflamación	23
5.9.1.4. Inhibición de la neurogénesis por el estrés oxidativo	25
5.9.2. Tipos de enfermedades neurológicas	26
5.9.2.1. Ansiedad	26
5.9.2.2. Depresión	27
5.9.2.3. Epilepsia	30

5.9.2.4. Enfermedad del Alzheimer	31
5.9.2.5. Enfermedad del Parkinson	32
5.9.2.6. Esclerosis múltiple	33
5.9.2.7. Síndrome de Down	33
5.9.2.8. Enfermedad de Huntington	34
5.9.2.9. Psicosis familiar	35
5.10. Lesiones renales	36
5.10.1. Daños en la nefrona	36
5.10.2. Cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) papilar	37
6. TERAPIAS CON ANTIOXIDANTES	41
6.1. Antioxidantes de la dieta	41
6.2. Tratamientos	45
6.2.1. Envejecimiento	46
6.2.2. Enfermedades cardiovasculares	46
6.2.2.1. Síndrome metabólico	46
6.2.2.2. Aterogénesis	48
6.2.2.3. Arritmia	50
6.2.2.4. Función Endotelial	50
6.2.3. Diabetes	51
6.2.4. Inflamación	51
6.2.5. Cáncer	52
6.2.6. Enfermedades respiratorias	55
6.2.7. Afecciones cutáneas	56
6.2.8. Ansiedad y depresión	56
6.2.9. Litiasis Renal	59
7. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE UN FLUIDO BIOLÓGICO	61
7.1. Métodos de detección de antioxidantes	61
7.2. Métodos de detección de oxidantes	64
7.3. Cociente oxidación/reducción	65

OBJETIVOS	67
CAPÍTULO 1: ESTRÉS OXIDATIVO, ANSIEDAD Y DEPRESIÓN	71
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	73
1. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN	73
1.1. MEDIDA DE LA ACCIÓN ANTIOXIDANTE	73
1.1.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO	73
1.1.1.1. Reactivos	73
1.1.1.2. Aparato	73
1.1.1.3. Muestra	73
1.1.1.4. Procedimiento	73
1.1.1.5. Calibrado	74
1.2. MEDIDA DE LA ACCIÓN OXIDANTE	74
1.2.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO	74
1.2.1.1. Reactivos	74
1.2.1.2. Aparato	75
1.2.1.3. Muestra	75
1.2.1.4. Procedimiento	75
1.2.1.5. Calibrado	75
1.3. MEDICIÓN DEL POTENCIAL REDOX DE LA ORINA	76
1.3.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO	76
1.3.1.1. Aparato	76
1.3.1.2. Procedimiento	76
2. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA EN PACIENTES CON ANSIEDAD Y/O DEPRESIÓN	77
2.1. VOLUNTARIOS	77
2.2. CUESTIONARIOS DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN	78
2.3. MEDIDA DEL POTENCIAL REDOX URINARIO	78
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
<u>RESULTADOS</u>	80

1. ADAPTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN	80
1.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	80
1.1.1. ANTECEDENTES	80
1.1.2. FUNDAMENTO	80
1.1.3. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ADECUADAS AL MEDIO ORINA	81
1.1.3.1. Efecto de compuestos antioxidantes	83
1.1.3.2. Efecto de la orina artificial	87
1.1.3.3. Obtención de un nuevo calibrado	90
1.1.3.4. Efecto de la combinación de diversas sustancias	92
1.1.3.5. Estudio con muestras de orina reales	93
1.1.3.6. Adición de más patrones en el calibrado	95
1.1.3.7. Conclusiones del método	98
1.2. MEDIDA DE LA ACCIÓN OXIDANTE	99
1.2.1. ANTECEDENTES	99
1.2.2. FUNDAMENTO	99
1.2.3. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ADECUADAS AL MEDIO ORINA	99
1.2.3.1. Obtención del calibrado	99
1.2.3.2. Efecto de la orina artificial	101
1.2.3.3. Estudio de la estabilidad de la o-dianisidina y del calibrado	101
1.2.3.4. Estudio con orina real	104
1.2.3.5. Optimización del calibrado	105
1.2.3.6. Conclusión del método	107
1.3. MEDICIÓN DEL POTENCIAL REDOX DE LA ORINA	108
1.3.1. FUNDAMENTO	108
1.3.2. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES EN EL MEDIO ORINA	108
1.3.2.1. Estudio con muestras de orina reales	111
1.4. VALORACIÓN GLOBAL DE LA CAPACIDAD REDOX DE UNA ORINA	112
1.4.1. Conservación de la muestra	112
1.4.2. Conclusión	115
1.5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN	115

2. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN EN VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES CON ANSIEDAD Y DEPRESIÓN	120
<u>DISCUSIÓN</u>	129
CAPÍTULO 2. ESTRÉS OXIDATIVO Y LITIASIS RENAL	131
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	133
1. PACIENTES	133
2. MEDIDA DEL POTENCIAL REDOX	133
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	134
<u>RESULTADOS</u>	135
<u>DISCUSIÓN</u>	139
CAPÍTULO 3. ANTIOXIDANTES Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO	141
CAPÍTULO 3.1. PREVENCIÓN DE LA LITIASIS RENAL CON ANTIOXIDANTES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	143
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	145
1. MATERIALES	145
1.1. Animales	145
1.2. Disoluciones	145
1.3. Aparatos	146
1.4. Kit de determinación de ácido oxálico Spinreact, S.A.	146
1.5. Determinación de creatinina por el método de Jaffé	146
1.5.1. Reactivos	146
1.5.2. Patrones	147
1.5.3. Muestras	147
2. TRATAMIENTOS	147
3. MONITORIZACIÓN Y MUESTREO	149
4. DETERMINACIÓN DE CALCIO, MAGNESIO Y FÓSFORO EN LOS RIÑONES	149
4.1. Digestión de los riñones	149
4.2. Determinación de Ca, Mg y P por espectrometría de emisión atómica ICP	151
5. ANÁLISIS DE ORINA	152
5.1. Determinación de Ca, Mg y P por espectrometría de emisión atómica ICP	153

5.2. Determinación de oxalato en orina	153
5.3. Determinación de creatinina	155
5.3.1. Fundamento	155
5.3.2. Procedimiento	155
6. EXAMEN HISTOLÓGICO	156
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	156
<u>RESULTADOS</u>	157
1. CALCIO, MAGNESIO Y FÓSFORO EN RIÑONES	157
2. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO PAPILAR RENAL	159
3. ANÁLISIS DE ORINA	162
<u>DISCUSIÓN</u>	171
CAPÍTULO 3.2. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES EN EL POTENCIAL	
REDOX URINARIO EN HUMANOS	175
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	177
1. PRODUCTOS	177
2. VOLUNTARIOS	179
3. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN DE LOS VOLUNTARIOS	179
4. MEDIDA DEL POTENCIAL REDOX URINARIO	180
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	181
<u>RESULTADOS</u>	182
<u>DISCUSIÓN</u>	185
CONCLUSIONES	187
BIBLIOGRAFÍA	193

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, se llevan a cabo un gran número de reacciones de oxidación-reducción o redox, ya que el aire ambiental es muy rico en oxígeno, que se encarga de oxidarlo prácticamente todo: las vigas arquitectónicas y todo lo que está construido de hierro, el papel que se vuelve de un color amarillento, las gomas elásticas que pierden elasticidad, una manzana que pierde algunos componentes sin su piel lo que se aprecia al aparecer un tono parduzco,... (1).

Por otra parte, los seres vivos tienen unas vías metabólicas que aprovechan estas reacciones para la obtención de energía. Los organismos aeróbicos obtienen más energía que los anaeróbicos al utilizar el oxígeno. Tal es el caso de las plantas en la fotosíntesis. Los seres humanos pertenecen al grupo de organismos aeróbicos, ya que en su metabolismo utilizan el oxígeno para oxidar las moléculas, obteniendo de esta manera la energía necesaria para llevar a cabo las funciones vitales (2).

1. FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES

Aunque la obtención de energía en los organismos aeróbicos sea superior a los organismos anaeróbicos, este sistema también tiene sus desventajas, ya que el oxígeno se reduce en estos procesos, formando intermedios muy reactivos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) o radicales libres (RL). En general, al tener un electrón desapareado, los RL son muy inestables, con una vida media de pocos microsegundos, así que reaccionan de manera rapidísima con otras moléculas. Estos radicales libres pueden dar lugar a reacciones de oxidación, si aceptan un electrón de la molécula con la que reaccionan, o bien pueden dar reacciones de reducción si donan

el electrón (3). Es por este motivo que pueden llegar a inducir una cadena de reacciones, generalmente perjudiciales para el organismo. Estas cadenas de reacciones finalizan cuando dos RL reaccionan entre sí formando una molécula estable.

Normalmente, el oxígeno molecular acepta un electrón, generándose un producto con carga negativa, el anión superóxido, de gran capacidad oxidativa. Siguiendo la cadena, el anión superóxido es capaz de aceptar un segundo electrón, y el producto de esta reacción es el peróxido de hidrógeno, el cual no es un radical libre propiamente dicho, pero es una molécula altamente oxidante (2). Otras ERO que se pueden formar son aldehídos (como el malondialdehído), cetonas, el radical hidroxilo, el radical peroxilo (una molécula de oxígeno y un radical de carbono), además de especies reactivas de nitrógeno, como el óxido nítrico (NO).

Los radicales libres se forman en un gran número de procesos biológicos, especialmente en la cadena respiratoria mitocondrial, en la que existe el paso de electrones a través de dicha cadena, cuyo aceptor final es el oxígeno molecular. En caso de realizar un ejercicio físico intenso, la actividad muscular se ve incrementada, produciéndose la necesidad de un mayor aporte energético a las células musculares, así que aumenta la actividad mitocondrial y con ella la producción de RL (4).

Otro proceso biológico es el catabolismo de los nucleótidos de purina, cuyo producto final es la xantina. Esta molécula es oxidada por la xantina oxidasa formándose ácido úrico como producto de desecho, con la consecuente liberación de peróxido de hidrógeno (5).

La activación leucocitaria, en caso de alguna infección, conlleva la producción de especies ERO, sobretodo anión superóxido, con el fin de eliminar los agentes patógenos (6).

Por otra parte, existen fuentes externas de especies reactivas de oxígeno, como pueden ser los tratamientos farmacológicos, o el contacto con pesticidas, radiaciones ionizantes, reacciones fotoquímicas, humo del tabaco, gases desprendidos por motores, (1,2) etc.

En el organismo existen mecanismos de defensa endógenos contra estas especies reactivas, no obstante, hay la posibilidad de que estos mecanismos defensivos se vean superados por los RL, de forma que se genera una situación que conocemos como estrés oxidativo.

2. DEFENSAS CONTRA LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Los mecanismos de defensa para anular la acción de los radicales libres se dividen en dos grupos: mecanismos enzimáticos o compuestos antioxidantes. Las defensas enzimáticas constan de un conjunto formado por tres enzimas, la superóxido dismutasa (SOD), el sistema glutatión peroxidasa (GPx)/glutatión reductasa (GRd) y la catalasa (CAT). La SOD cataliza una reacción en la que el anión superóxido se transforma en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Por su parte, la GPx utiliza el glutatión reducido para la reducción del peróxido de hidrógeno, transformándolo en agua formándose a su vez glutatión oxidado. La GRd se encarga de regenerar el

glutación a partir de su forma oxidada (7). Finalmente, la CAT también actúa contra el peróxido de hidrógeno, formando agua y oxígeno molecular (8).

En cuanto a los compuestos antioxidantes, cabe resaltar que se obtienen de la dieta, como pueden ser el α -tocoferol, que es la forma más abundante y con mayor poder antioxidante de la vitamina E, el ácido ascórbico o vitamina C, los carotenoides (precursores de la vitamina A), algunos minerales y los polifenoles (como los flavonoides, en especial el trans-resveratrol) (2).

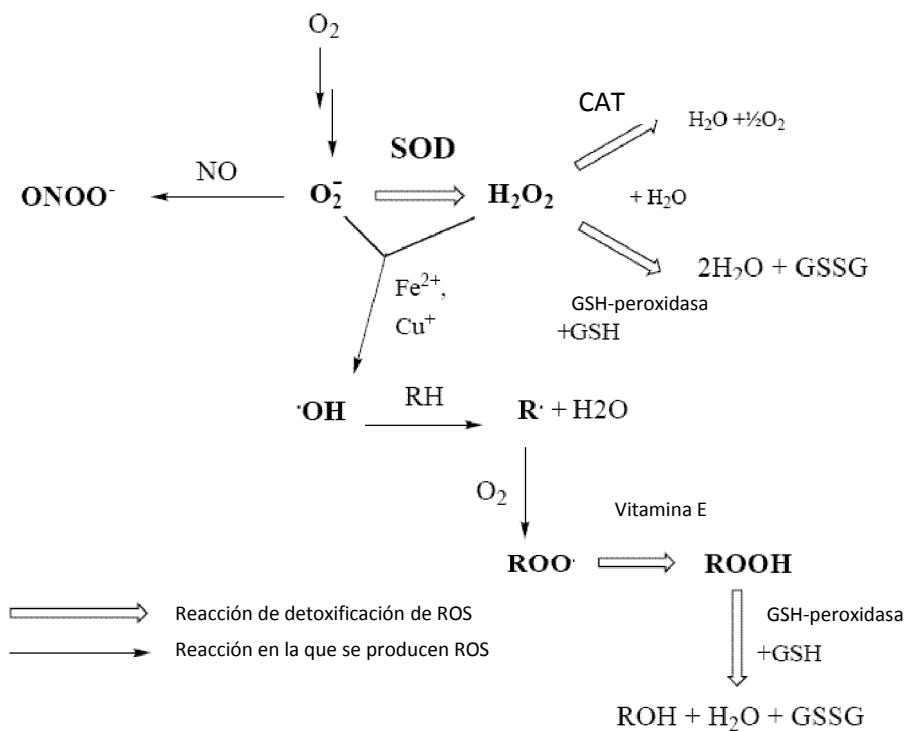


Fig 1. Esquema de las defensas enzimáticas y no enzimáticas (vitamina E) frente a los RL.

Estas sustancias antioxidantes pueden anular a los radicales libres de varias maneras. Los antioxidantes pueden actuar reaccionando directamente con las especies reactivas, como es el caso del ácido ascórbico, o bien interrumpiendo la cadena de

reacciones oxidativas en sus etapas iniciales, siendo el caso de los tocoferoles, carotenoides y polifenoles. Es necesario mencionar que el ácido ascórbico también actúa regenerando el α -tocoferol oxidado, hecho que aumenta la capacidad antioxidante de este último (2). En la figura 1 se puede observar la acción de las defensas enzimáticas y no enzimáticas frente a los RL.

3. ACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES

Si la producción de RL supera las defensas antioxidantes se produce el fenómeno conocido como estrés oxidativo. Este exceso de radicales libres es perjudicial para la salud del individuo, ya que puede llegar a alterar la estructura y función de las células y de las macromoléculas (enzimas, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos) como se indica en la figura 2 (9).

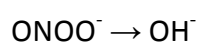
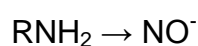
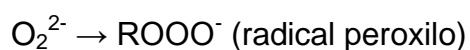
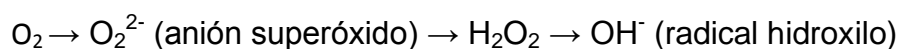


Fig 2. Formación de RL y sus consecuencias a nivel de las macromoléculas.

La reacción de los radicales libres más estudiada actualmente es la peroxidación lipídica, sobre todo de los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran formando los fosfolípidos de las membranas celulares. En este caso, se produce la oxidación de estos ácidos grasos, de manera que la membrana celular pierde su funcionalidad, provocando que la célula carezca de actividad e incluso se active la lisis celular. Esta peroxidación lipídica se produce no solamente en la membrana celular, sino también en los lípidos en circulación, sobre todo los transportados por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que a posteriori pueden provocar enfermedades cardiovasculares. Además, la descomposición de los lípidos puede originar otros compuestos, los cuales también poseen actividad oxidante, como pueden ser ciertos aldehídos (10).

Las lesiones celulares, dependiendo de donde se produzcan y de su intensidad, pueden desencadenar una respuesta inflamatoria. En primer lugar, se activa la síntesis de moléculas proinflamatorias como las citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α , etc.), las cuales sirven como señales quimiotácticas para atraer a los macrófagos hasta el foco inflamatorio. Estos macrófagos también segregan más citoquinas para aumentar el poder quimioatrayente, y a su vez, liberan anión superóxido, con el fin de combatir el foco inflamatorio, creciendo la cantidad de RL e incrementándose el estrés oxidativo (11).

Los RL también actúan sobre los ácidos nucleicos. Al oxidar el ADN existe la posibilidad de activar la muerte celular, pero también es posible la aparición de mutaciones, rotura de las hebras del ADN, efectos genotóxicos y/o carcinógenos, con consecuencias muy graves para el organismo (2).

A nivel de proteínas, los RL son capaces de desnaturalizarlas. De la misma forma se pueden inactivar las enzimas, en el caso de que éstas posean grupos sulfhidrilo, zona en la que reaccionan los RL. Otra posibilidad es que los RL oxiden el centro activo de la enzima, perdiendo ésta su funcionalidad (3).

4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y DAÑO TISULAR

La peroxidación lipídica es la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados en sistemas biológicos. Lo mismo ocurre en el caso de las grasas y los aceites, en los que se aprecia la oxidación mediante cambios de la textura, color y olor al estar en contacto con el aire. La detección y la medida de la peroxidación lipídica es la forma más habitual de demostrar la implicación de las reacciones de los radicales libres en enfermedades (12).

La peroxidación lipídica, al igual que todas las reacciones radicalarias, consta de tres fases: iniciación, propagación y terminación (Figura 3). En la fase de iniciación, los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados que forman la membrana de las células. Estos radicales libres tienen la suficiente reactividad para extraer un átomo de hidrógeno perteneciente a un grupo metileno ($-CH_2-$), dejando un electrón desapareado en el carbono. Este fenómeno ocurre debido a que los dobles enlaces de los ácidos grasos debilitan los enlaces carbono-hidrógeno adyacentes, facilitando la eliminación del hidrógeno por parte de las especies oxidativas. Por este motivo, la cadena de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana lipídica es tan sensible a la peroxidación. Las especies reactivas capaces de extraer el primer átomo de hidrógeno

son los radicales hidroxil, alcoxil y peroxil, ya que el superóxido y el peróxido de hidrógeno no tienen la suficiente reactividad (13).

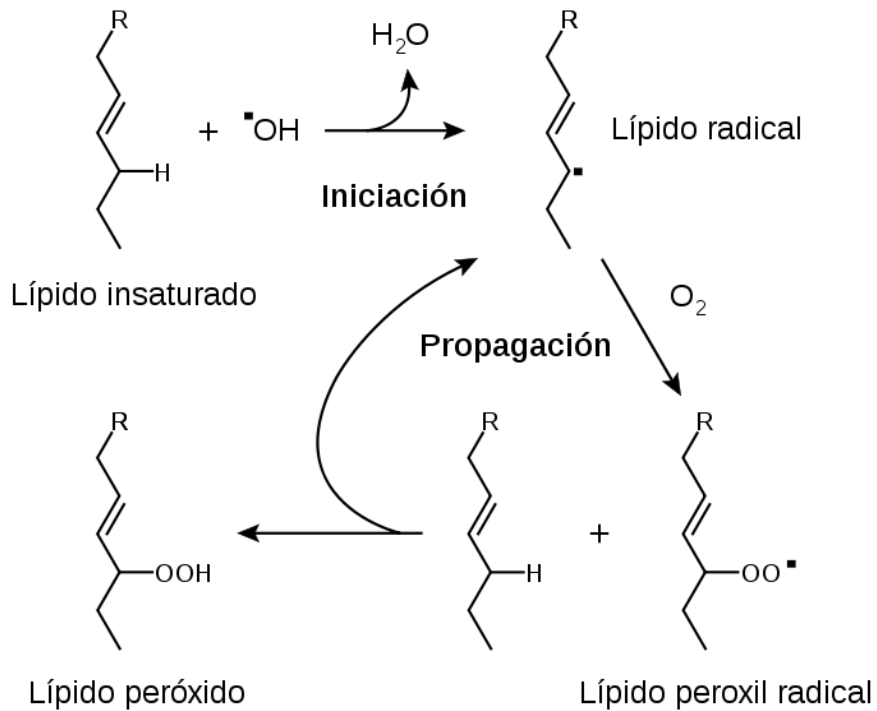


Fig 3. Esquema de la peroxidación lipídica.

A continuación empieza la fase de propagación, en la que se produce un reajuste molecular para formar un dieno conjugado, que posteriormente se combinará con un oxígeno proveniente de las especies reactivas y se formará un radical peroxilo. Para algunos autores, este proceso de reajuste todavía pertenece a la fase de iniciación. Este radical peroxilo es capaz por sí mismo de extraer otro átomo de hidrógeno de otro ácido graso y empezar una reacción en cadena que podría desestabilizar la membrana celular. Este proceso continua hasta que se termina el sustrato o bien hasta que un antioxidante (mencionados anteriormente) corta la

reacción en cadena. En la terminación, los productos finales de la peroxidación lipídica son hidroperóxidos o peróxidos cíclicos, en los que el radical peroxilo recupera un átomo de hidrógeno y pierde su reactividad, o bien dos radicales reaccionan entre sí. En esta fase, existe la fragmentación a aldehídos como el malondialdehído, producto de desecho de la peroxidación lipídica altamente oxidante (13).

Los peróxidos lipídicos son moléculas bastante estables a temperatura fisiológica, pero metales de transición o complejos de metales pueden catalizar su descomposición. Los complejos de metales reducidos (Fe(II) o Cu(I)) reaccionan con los peróxidos lipídicos para generar más radicales alcoxilo, mientras que los complejos de metales oxidados producen radicales peroxilo y alcoxilo pero de una forma más lenta. Tanto los radicales peroxilo como alcoxilo estimulan la continuación de la reacción en cadena de la peroxidación lipídica extrayendo más átomos de hidrógeno.

Todo este proceso resulta en cambios estructurales en la membrana celular que pueden tener implicaciones importantes en las funciones celulares.

4.1. Consecuencias de la peroxidación lipídica en material biológico

La peroxidación lipídica en las membranas celulares causa pérdida de fluidez, fallos en el potencial de membrana, aumento de la permeabilidad a H^+ y otros iones, e incluso la rotura de la membrana, lo que conlleva a la liberación del contenido celular. Otros productos finales derivados de la fragmentación, como el malondialdehído, también son citotóxicos (13).

En el caso de las enfermedades psiquiátricas, se ha demostrado que los peróxidos lipídicos se acumulan en mayor medida en el tejido cerebral de personas con algún trastorno que en el cerebro de las personas sanas. Esto se debe a que un tejido ya dañado incrementa su susceptibilidad a la peroxidación, inactivación de algunos antioxidantes y la liberación de iones metálicos de su lugar de almacenamiento y de metaloproteínas hidrolizadas por enzimas liberadas de lisosomas dañados. El hecho de que la peroxidación vaya acompañada o preceda al daño celular hace pensar que la prevención de dicha peroxidación mediante el uso de antioxidantes pueda evitar el daño celular (13).

5. RELACIÓN ENTRE LOS RL Y DISTINTAS PATOLOGÍAS

Los RL intervienen en el desarrollo de varios procesos patológicos (1), como se expone a continuación.

5.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares, primera causa de mortalidad mundial, pueden tener su origen en el estrés oxidativo. El exceso de RL, sumado a una hipercolesterolemia, provoca la peroxidación lipídica, sobre todo en lo que respecta a las LDL. Las LDL oxidadas estimulan a los macrófagos para acumular colesterol en su interior, incluso en exceso, de forma que los macrófagos se transforman en células espumosas (14, 15). Posteriormente, el endotelio vascular segrega moléculas de

adhesión que captan las células espumosas, que se acumulan en el espacio subendotelial, a las que se añaden células de la musculatura lisa que proliferan induciendo su hipertrofia. A medida que se van acumulando células espumosas y musculares se va formando una placa de ateroma, fenómeno conocido como aterosclerosis, que puede llegar a bloquear el vaso sanguíneo, dando lugar a una trombosis que impide el paso de la sangre.

Otro factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular, como un infarto de miocardio, es la hipertensión. Los RL son citotóxicos para las células endoteliales, con la correspondiente pérdida de su función. La función del endotelio vascular es importante para mantener un flujo sanguíneo adecuado y ejercer el control de las reacciones inflamatorias vasculares. El endotelio se encarga de la producción de NO, una molécula vasodilatadora, que induce la relajación de las paredes arteriales con el fin de mantener controlada la tensión arterial (16). El estrés oxidativo puede conducir a una situación en la que el endotelio reduce su funcionalidad, al disminuir la biodisponibilidad del NO (por inhibición de la óxido nítrico sintasa endotelial) e inducir la formación de peroxinitrito. Dicha situación puede derivar en un aumento de la tensión arterial, ya que el NO es un potente vasodilatador, con propiedades antiinflamatorias e inhibidor de la agregación plaquetaria (17). Si el endotelio pierde la capacidad de sintetizar NO, las paredes arteriales no se relajan, se produce su vasoconstricción, con la consecuente aparición de hipertensión.

La aterogénesis y la hipertensión no son los únicos problemas a nivel cardiovascular relacionados con el estrés oxidativo. Los RL también están implicados

en el desarrollo de fibrilación atrial, un tipo de arritmia que suele aparecer después de someterse a cirugía cardíaca.

5.2. Diabetes

Se ha observado que el estrés oxidativo aumenta considerablemente en las personas que padecen diabetes mellitus tipo II. La evidencia de ello es que los niveles de malondialdehído incrementan significativamente mientras ocurre todo lo contrario en lo que respecta a las defensas antioxidantes. Incluso se ha descrito que el glutatión reducido de los eritrocitos disminuye en los pacientes diabéticos (18).

5.3. Síndrome metabólico

Un problema de salud importante es el síndrome metabólico, que es el resultado de la combinación de diversos trastornos entre los que se encuentran la obesidad (sobretudo central), dislipidemia (elevados niveles de triglicéridos y LDLc y bajos niveles de HDLc), aterogénesis, hipertensión y resistencia a la insulina (19-22). Para confirmar que un paciente padece síndrome metabólico debe cumplir con tres o más de los factores anteriores, y con ello aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y cáncer (19, 20). Esta enfermedad afecta aproximadamente a un 10-25% de la población mundial adulta (20), y es debido a lo que conocemos como estilo de vida occidental, en el que se incluyen situaciones de estrés, balance energético positivo (debido a la mayor ingesta de calorías, y a su vez

de grasas y con pocos micronutrientes) y una alteración de los ritmos y funciones cronobiológicas, y con ello se incrementa el riesgo de padecer un infarto y también el riesgo de morir debido al propio infarto (19, 20).

El estrés oxidativo está relacionado con la aparición del síndrome metabólico y la patología cardiovascular (21). Se ha encontrado que los pacientes con síndrome metabólico ven disminuidos los niveles de los enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) (22, 23). Por esta razón, es posible que la administración de productos antioxidantes sea una buena manera de prevenir este síndrome o al menos de reducir sus efectos.

5.4. Enfermedad hepática

El hígado es otro órgano que puede verse afectado por los RL. Sin embargo, en este caso, los RL y sus mediadores proinflamatorios (concretamente el 8-iso-prostaglandina-F2a) deben combinarse con un exceso de consumo de alcohol u otras enfermedades hepáticas y con un descenso de antioxidantes, hecho que aumenta la peroxidación lipídica, hasta llegar a aumentar la presión sanguínea portal. Esta hipertensión portal puede originar una hemorragia por la formación de varices internas. Todo ello puede acabar en el desarrollo de una cirrosis o insuficiencia hepática (1).

5.5. Cáncer

El desarrollo de un proceso tumoral también se ha relacionado con los RL. El más conocido es el cáncer de pulmón debido al tabaco, en el que además de la nicotina y el alquitrán, también los RL atacan a los tejidos. Otra manera de causar un carcinoma es la reacción de los RL con el ADN, ya que puede ocasionar mutaciones sobre todo por oxidación de la guanina, que es la base con el potencial de oxidación más bajo, lo que facilita el ataque de los RL (24-29). Finalmente, los RL estimulan el crecimiento de la musculatura lisa, induciendo a su vez la angiogénesis de los vasos sanguíneos que transportan la sangre y nutrientes al tumor, de forma que éste empieza a desarrollarse y a crecer (1). Si los mecanismos de reparación del ADN no son suficientes para neutralizar el daño oxidativo, podrían llegar a acumularse mutaciones en el genoma, provocar su inestabilidad, y que las células dañadas se transformaran en células cancerígenas y empezar el desarrollo de un tumor. Por este motivo, se cree que la terapia con antioxidantes podría ser beneficiosa para el tratamiento de los enfermos de cáncer (24-29).

Se ha estimado que el 30-40% de los cánceres están relacionados con los hábitos alimenticios y el estilo de vida. La prevención del cáncer debe empezar por cambios en el estilo de vida, como el consumo de tabaco, de alcohol y la exposición a carcinógenos ya conocidos (30).

5.6. Cataratas

Las radiaciones que reciben los ojos producen RL, que con el tiempo, llegan a dañar el cristalino, sobre todo por degradación y desnaturalización de las proteínas. Este proceso, en los casos más graves, termina con una opacificación del cristalino. (1).

5.7. Envejecimiento

Existe la teoría de que el envejecimiento está relacionado con la acción de los RL que se acumulan con el tiempo, provocando lesiones orgánicas, además de la disminución de compuestos antioxidantes y de la menor actividad de enzimas antioxidantes. Esta hipótesis está relacionada con la teoría del declive mitocondrial, basada en la disminución de la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial, especialmente en las subunidades III y VIb debido al incremento de la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en la propia mitocondria (31). No obstante, no es un proceso claro, ya que hay que considerar los procesos propios del envejecimiento además de los causados por los RL (1).

5.8. Afecciones cutáneas

Las lesiones producidas por los radicales libres formados durante el estrés oxidativo son capaces de afectar a la piel, causando entre otros problemas, dermatitis atópica, que es un trastorno de la función de la barrera epidérmica que cursa con

sequedad en la piel, erupciones y/o una sensibilización a ciertos alimentos y alérgenos ambientales mediada por la Ig E.

Un factor ambiental que daña la piel es la radiación ultravioleta (UV). El estrés oxidativo causado por las radiaciones solares puede provocar eritemas, más o menos severos, arrugas, pigmentaciones moteadas (por hipo o hiperpigmentación) e incluso cáncer de piel, dependiendo de la exposición (32-35).

5.9. Enfermedades neurológicas

5.9.1. Estrés oxidativo y enfermedades neurológicas

5.9.1.1. El efecto del estrés oxidativo en la neurodegeneración

La sobreexcitación es una causa de citotoxicidad en las células nerviosas, hasta el punto de inducir la apoptosis, resultando en uno de los mecanismos de degeneración neuronal. Dicha sobreexcitación tiene lugar cuando la excitación neuronal (vía del glutamato u otros transmisores peptídicos) es superior a la inhibición (principalmente por el sistema GABAérgico) (36).

El cerebro consume grandes cantidades de O₂ debido a la gran necesidad energética, mayor que en otros tejidos, y se necesitan mayores cantidades de ATP para mantener la homeostasis neuronal intracelular al abrir o cerrar los canales de iones asociados con la transmisión de potenciales de acción y con la neurosecreción. El estrés oxidativo, al dañar la membrana, puede evitar la correcta funcionalidad de estos

procesos, a lo que se le podría añadir una falta de aporte de O₂ o sustratos para la producción de energía, siendo la causa de un rápido incremento del daño celular.

El aumento de la permeabilidad de las membranas provoca un incremento de la entrada de Ca²⁺ en las neuronas, que a su vez puede activar la óxido nítrico sintasa neuronal. Dicho incremento de Ca²⁺ también interfiere en la función mitocondrial, formándose un exceso de superóxido. El superóxido puede reaccionar con el NO y formar peroxinitritos, provocando un aumento importante del estrés oxidativo.

Existen otros problemas relacionados que provocan daño neuronal:

1. La presencia de aminoácidos citotóxicos. El glutamato es un aminoácido cuya concentración en los fluidos cerebrales extracelulares es baja, inferior a 1 μM. Se podría producir una liberación masiva de glutamato debido a la muerte celular o a un colapso en el gradiente de iones en las neuronas, que se uniría a los receptores de neuronas adyacentes, promoviendo así la entrada masiva de Ca²⁺ y de Na⁺. Generalmente, estas células mueren por necrosis. El estrés oxidativo, incluyendo los peroxinitritos, contribuye al aumento de glutamato mediante la inactivación de la glutamina sintetasa (evitando la conversión de glutamato en glutamina) y disminuyendo la captación del glutamato por las células gliales (36, 37).

2. La mitocondria neuronal genera superóxido, la mayoría en el complejo I, que contribuye a aumentar mutaciones y deleciones en el ADN mitocondrial, generalmente en edades avanzadas (36, 38).

3. Varios neurotransmisores son autooxidables, como la dopamina, la serotonina y la norepinefrina, que pueden reaccionar con el oxígeno generando no

sólo anión superóxido, sino también quinonas y semiquinonas que pueden agotar el glutatión reducido y unirse a los grupos SH de las proteínas. Los conjugados dopamina-glutatión son degradados por peptidasas para producir conjugados dopamina-cisteína, los cuales se encuentran elevados en algunas regiones cerebrales en la enfermedad del Parkinson (36).

4. El hierro es importante para las funciones cerebrales, ya que existen proteínas que contienen hierro, como los citocromos, ferritina, aconitasas, etc. Sin embargo, el daño cerebral libera el hierro en las formas en las que es capaz de catalizar las reacciones de los RL (36, 39).

5. Las membranas lipídicas neuronales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, de forma que son susceptibles a la peroxidación lipídica. Además, los productos formados en la peroxidación lipídica también son perjudiciales para el tejido cerebral, ya que pueden aumentar los niveles de Ca^{2+} , inactivar los transportadores de glutamato y dañar los neurofilamentos de algunas proteínas y causar inflamación neuronal (36, 40).

6. El metabolismo cerebral genera grandes cantidades de H_2O_2 , no solamente por la vía de la SOD, sino también por otras enzimas, como las monoamina oxidasas A y B, en las que también se generan aldehídos y NH_3 (36, 41).

7. Algunas células gliales son microglía, células tipo macrófago que ayudan a eliminar los desechos celulares (incluyendo células apoptóticas) y permanecen alerta frente a las amenazas a las neuronas. Sin embargo, estas células pueden activarse para producir superóxido, peróxido de hidrógeno y citoquinas. Estas citoquinas pueden

inducir que la microglía genere más especies reactivas, mediante la activación de la óxido nítrico sintasa, produciéndose un exceso de NO. Esto ocurre frecuentemente tras sufrir un traumatismo que produce la lesión (36, 42).

8. En algunas regiones cerebrales se encuentran citocromos P450 (CYP). Concretamente el CYP2E1 pierde electrones durante su ciclo catalítico, y se producen más radicales libres, incrementando el estrés oxidativo. El CYP2E1 se ve incrementado en fumadores y alcohólicos (36, 43).

9. Las especies reactivas, bien directamente o bien por la activación de metaloproteinasas de la matriz, pueden contribuir a “abrir” la barrera que separa la sangre y el cerebro, permitiendo el paso de neurotoxinas, endotoxinas y células inflamatorias al interior del cerebro (36, 44).

10. Las neuronas contienen poliADPribosa polimerasa 1 (PARP-1), enzima que actúa reparando el ADN dañado. Su activación excesiva puede provocar la muerte celular al agotar el NAD^+ de manera que no se genera suficiente energía, además de anular la función neuroprotectora del NAD^+ , ya que enlentece la degeneración de los axones (36, 45).

11. La pérdida de soporte trófico puede llevar al estrés oxidativo y apoptosis neuronal, por activación inapropiada de NADPH oxidasas, que promueven la apoptosis celular (36, 46).

12. La hemoglobina es neurotóxica, si se encuentra expuesta al peróxido de hidrógeno, ya que libera iones de hierro prooxidantes desde el anillo hemo. A su vez, el grupo hemo se libera y es un fuerte promotor de la peroxidación lipídica, al

descomponer el peróxido de hidrógeno en radicales peroxil y alcoxil. Finalmente, la hemoglobina se une al NO provocando vasoconstricción, algunas veces hasta el punto de llegar al sangrado cerebral (36, 47).

5.9.1.2. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

La mitocondria no es solamente el orgánulo en el que se forman más radicales libres, sino que también sufre daños originados por el estrés oxidativo, y por eso tiene un papel importante en el mecanismo oxidativo de las enfermedades psiquiátricas (48, 49). Experimentalmente, se ha demostrado que el daño oxidativo provoca ciertas mutaciones en el ADN_{mt} en ratas, en concreto en el gen de la gamma-polimerasa mitocondrial (POLG), situada en el núcleo de la mitocondria. La acumulación de estas mutaciones en las neuronas provoca que se exprese un trastorno del comportamiento en el fenotipo (48). Entre estos trastornos del comportamiento encontramos ansiedad y depresión. Debido a estas mutaciones, los ratones sufren una atrofia progresiva del hipocampo acompañada de un aumento de la apoptosis, y en consecuencia la reducción de neuronas (48). Se aprecia también una disminución de la densidad postsináptica en las espinas dendríticas de las células piramidales. A nivel del comportamiento, los ratones incrementan su actividad locomotora, pero ven reducida la habilidad cognitiva y desarrollan un estado de ansiedad (48).

En humanos, se asocia el trastorno depresivo con enfermedad somática con el descenso de la producción de ATP mitocondrial y deleciones en el ADN_{mt} (50). Estudios genéticos en pacientes depresivos y en controles revelan que existen diferencias

significativas entre la disfunción mitocondrial y la fosforilación oxidativa, condiciones asociadas a la producción excesiva de RL (48).

La exposición crónica al alcohol es otra causa del incremento del estrés oxidativo, que está relacionado con la disfunción mitocondrial, fosforilación oxidativa y disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa. Además, la dependencia al alcohol conlleva a una reducción en la expresión de genes que codifican proteínas mitocondriales, existiendo la posibilidad de que sea una causa de disfunción mitocondrial, acelerando la producción de RL, afectando a la homeostasis del calcio y aumentando la apoptosis (48, 51).

5.9.1.3. Estrés oxidativo e inflamación

Se conoce que sustancias pro-oxidantes pueden activar los mecanismos de inflamación, como la activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el factor de transcripción nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$), lo que da lugar a la expresión de genes que controlan los procesos inflamatorios, en los que se sintetizan citoquinas y factores de transcripción que provocan la migración de los leucocitos desde los vasos sanguíneos hasta el tejido dañado (48, 52, 53).

Pacientes con trastornos graves de depresión y ansiedad contienen niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas la interleuquina-6 (IL-6) en suero. La degeneración neuronal, causante de estos trastornos emocionales, puede tener lugar debido a los procesos inflamatorios generados por las citoquinas. Dichas

citoquinas, a su vez, se encargan de activar otras moléculas pro-inflamatorias como la fosfolipasa A2 (PLA2) y el ácido araquidónico (AA) (48, 54).

Por otra parte, el aumento de AA puede generar más RL, conjuntamente con otras moléculas pro-inflamatorias como los eicosanoides, que promueven la inflamación y degeneración neuronal en el cerebro. Además, se cree que el AA puede tener efectos apoptóticos directos (48, 55).

Una manera de prevenir la apoptosis neuronal es el consumo de ácido docosahexanoico (DHA), un ácido graso insaturado con propiedades antioxidantes (48, 56, 57).

Otro agente mediador del estrés oxidativo en la neurodegeneración es el ya mencionado factor nuclear κ B (NF κ B), factor de transcripción asociado con la inducción de citoquinas pro-inflamatorias. El NF κ B se activa mediante las ROS, citoquinas y glutamato, y sus niveles se incrementan en neurodegeneración causada por traumas, isquemia y enfermedades del Alzheimer y del Parkinson (48, 58, 59). La activación del NF κ B induce al incremento del estrés oxidativo e inflamación, lo que conlleva al daño neuronal. Por su parte, el consumo de alcohol promueve la unión NF κ B-DNA y se activa la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y se produce un aumento de la síntesis de NO, y en consecuencia un incremento del estrés oxidativo (48, 60).

El elemento de respuesta a la unión del AMPc (CREB) es otro factor de transcripción relacionado con la inflamación. El CREB protege a las neuronas de la excitotoxicidad y la apoptosis a través de la activación de factores de transcripción. El NO inhibe la fosforilación del CREB, y por tanto su activación, de manera que este

elemento no es capaz de ejercer sus funciones protectoras. Existen los receptores 5-HT_{1A} de la serotonina, los cuales poseen efectos ansiolíticos al aumentar la concentración de serotonina, que disminuyen los niveles de NO (aunque se desconoce el mecanismo) y puede mantener la funcionalidad del CREB (48).

Esta activación de los procesos inflamatorios se ha detectado en pacientes con trastornos de ansiedad, depresión y alcoholismo, además de en animales de experimentación.

5.9.1.4. Inhibición de la neurogénesis por el estrés oxidativo

Existen evidencias que la reducción de la neurogénesis está involucrada en los trastornos psiquiátricos. En caso contrario, aumentar la neurogénesis mediante la realización de ejercicio físico o el uso de fármacos inhibidores de la recaptación de la serotonina disminuye los estados de ansiedad y depresión (48).

El estrés oxidativo está implicado en la disminución de la neurogénesis, demostrado en una experiencia con animales en la que se administraba etanol para inducir la unión del NFκB al ADN y activar la óxido nítrico sintasa para incrementar el estrés oxidativo. Este problema se reducía al administrar antioxidantes (12, 48).

El comportamiento se vio modificado al aumentar el estrés oxidativo, ya que aumentaba el estado de ansiedad, mientras que la administración de los antioxidantes reducía la ansiedad de los animales (48).

5.9.2. Tipos de enfermedades neurológicas

5.9.2.1. Ansiedad

La ansiedad es un estado emocional aversivo en el que se experimenta una sensación de miedo frente a una situación de amenaza. Dicha ansiedad viene dada por un estrés emocional en el que tienen lugar cambios fisiológicos, expresivos y de comportamiento (61). Cuando esta emoción es inapropiada, extrema y persistente pasa a clasificarse como un estado patológico.

La ansiedad es el trastorno psiquiátrico más habitual en Europa y Estados Unidos, ya que su prevalencia es del 12% en el primer caso y del 28% en el segundo. Diversos estudios han demostrado que un gran número de casos continúan sin tratamiento (61).

En general, las investigaciones sobre los trastornos de ansiedad se han basado en los sistemas reguladores, por ejemplo el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Sin embargo se ha establecido recientemente que la depresión y la ansiedad están relacionadas con el estrés oxidativo. El cerebro, en particular, es el órgano con mayor consumo de oxígeno, ya que utiliza el 20% del oxígeno a pesar de que es un órgano que constituye solamente el 2% del peso corporal (49, 61). En consecuencia, se produce una cantidad mayor de RL que en otros órganos del cuerpo, llegando así a un índice más elevado de estrés oxidativo. Además, el cerebro es muy rico en lípidos y sus defensas antioxidantes son más modestas que en otros lugares del organismo, y por ese motivo es muy vulnerable al estrés oxidativo (36, 48).

Cuando existe estrés oxidativo en el cerebro, los metabolitos formados son capaces de oxidar ácidos nucleicos, proteínas y sobretodo puede desencadenar la peroxidación lipídica, que reduce la fluidez de las membranas celulares, mientras que la oxidación de proteínas de membrana puede inactivar enzimas, receptores y canales de iones. Las consecuencias de estas alteraciones en la membrana celular debidas al estrés oxidativo son la disfunción neuronal, fallos en la neurotransmisión y otras actividades cerebrales (61).

5.9.2.2. Depresión

La depresión es un trastorno psiquiátrico que se caracteriza por cambios en el estado de ánimo acompañado de baja autoestima y dificultad para dormir y comer (62), y está asociado a una baja calidad de vida y un aumento de la mortalidad y la morbilidad de otros trastornos médicos (63). Como en las otras patologías psiquiátricas, se activa la microglía y se liberan ERO y especies reactivas de nitrógeno, y aumenta la apoptosis de células neuronales, además de inhibir la neurogénesis. El marcador más utilizado para evaluar la neurogénesis es el nivel de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual se encuentra disminuido en los pacientes con depresión (64).

Además de la superproducción de RL, las defensas antioxidantes también se ven afectadas, ya que en algunos estudios se expone un incremento de la actividad de la SOD en casos de depresión aguda pero incapaz de hacer frente al estrés oxidativo y existen otros estudios que afirman que la actividad de esta enzima se ve reducida.

También se ha demostrado el aumento de las actividades de la CAT y de la GRd pero un descenso de la actividad de la GPx. Los tratamientos antidepresivos convencionales han demostrado ser útiles para normalizar la actividad de estas enzimas (65).

Existen varios informes en los que se afirma que se produce un daño oxidativo en los lípidos. Esto indica que la depresión está asociada a la peroxidación lipídica. Es posible observar una disminución de ácidos grasos poliinsaturados de membrana en los eritrocitos en los pacientes depresivos, hecho que indica que existe la degradación de las cadenas de los ácidos grasos. También se puede apreciar un aumento de los productos de desecho de la peroxidación lipídica, como el malondialdehído, más frecuente en los pacientes que han padecido episodios recurrentes de depresión que en los que sufren el primero (65). En episodios agudos de depresión se han detectado marcadores del daño oxidativo en el ADN de las células cerebrales, así como en sangre y orina.

La depresión es un trastorno que se ha asociado con procesos inflamatorios, ya que se detectan elevadas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, como la interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-18 (IL-18) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). La maduración y liberación de la IL-1 β está implicada en el estrés y en la mala regulación del sistema nervioso central y juntamente con la IL-18 actúan en procesos apoptóticos. También se produce la liberación de RL procedentes de la disfunción mitocondrial, debido a la acción de la IL-1 β y el TNF- α .

La IL-6, además de inducir la activación de los linfocitos T del sistema inmunitario y crear una situación de inflamación por autoinmunidad, puede interferir

en el metabolismo de la melatonina y la N-acetilserotonina (NAS). La melatonina y la NAS, además de tener propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras, son capaces de aumentar la neurogénesis. La IL-6 altera la regulación de los procesos inflamatorios de la melatonina y de la NAS, además de inhibir la neurogénesis, de forma que se crea un estado inflamatorio local y de neurodegeneración (66).

Esta asociación de la depresión con los procesos inflamatorios se ve reforzada al relacionarse el estrés oxidativo y la depresión en pacientes con artritis reumatoide. En este estudio, se pudo observar que las defensas antioxidantes se encontraban reducidas en los pacientes que además de artritis presentaban un cuadro de depresión, y los niveles de malondialdehído resultaron ser más elevados en el mismo grupo (67).

La relación entre depresión e inflamación se ve fortalecida al demostrar que los fármacos antidepresivos también son en parte moduladores de la inflamación, ya que la administración de antidepresivos tricíclicos (ATC) normaliza los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias en sangre. Además, las estatinas, que son fármacos utilizados para combatir el exceso de colesterol, tienen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes y se descubrió que mejoraron levemente la sintomatología de algunos pacientes que, además de accidentes cardiovasculares, padecían de depresión (68). En esta relación depresión-inflamación, el problema reside en que no se sabe a ciencia cierta, ya que es una causa bidireccional, si es el estrés oxidativo de la depresión el que causa la inflamación o viceversa (62).

5.9.2.3. Epilepsia

En la patogénesis de la epilepsia existen cambios en los mecanismos de defensa antioxidantes y un incremento de la peroxidación lipídica. De hecho, se ha encontrado que la terapia antiepiléptica modifica el balance oxidantes-antioxidantes, y se descubrió recientemente que la generación de especies reactivas son la causa y la consecuencia de las convulsiones epilépticas. Algunos marcadores que se ven incrementados en la epilepsia son las sustancias reactivas del ácido barbitúrico (TBARs), el hierro como causante de la producción de especies reactivas y también se ha encontrado una relación con los transportadores de glutamato (69).

La causa de este incremento de la peroxidación lipídica se debe a anomalías estructurales, que cursan con la disfunción mitocondrial y la generación de especies reactivas, que provocan daño celular que puede afectar a la excitabilidad neuronal. Existen evidencias de la formación de nitritos, además de la peroxidación lipídica en los ataques epilépticos, que son los causantes del daño neuronal durante la epilepsia (70).

Los pacientes que padecen epilepsia muestran un descenso en la actividad de la SOD y de la GPx, y un aumento de la actividad de la CAT. No obstante, la administración de α -tocoferol resultó en la disminución de las convulsiones y un aumento de la actividad de la SOD (71).

Para mejorar los resultados de la terapia antiepiléptica, además de los fármacos habituales, se deberían administrar suplementos de antioxidantes, ya que la terapia tradicional disminuye la frecuencia de ataques epilépticos, pero no mejoran las lesiones neuronales (69).

5.9.2.4. Enfermedad del Alzheimer

La enfermedad del Alzheimer es otra patología neurodegenerativa que se ha asociado con el estrés oxidativo. La neurodegeneración, en este caso, proviene de anomalías en el metabolismo cerebral y el balance energético en las neuronas, astrocitos, microglía, y en las células microvasculares endoteliales, y se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y las funciones cognitivas (69, 72).

Patológicamente, el Alzheimer se caracteriza por la acumulación de la proteína amiloide extracelular, depositándose placas seniles y formándose enredos neurofibrilares intracelulares a partir de proteína tau anormal e hiperfosforilada, provocando la muerte neuronal en esa región y la pérdida de las conexiones sinápticas (69, 73).

En estudios con ratones transgénicos se probó que la oxidación del ARNm podría estar asociada con el deterioro neuronal (69, 74). Otras pruebas de que el estrés oxidativo está relacionado con el Alzheimer son los marcadores de la oxidación de proteínas que se encuentran en las personas que lo padecen, como los carbonilos proteicos o la 3-nitrotirosina. Las especies reactivas del mal funcionamiento mitocondrial acompañan a la enfermedad del Alzheimer (69, 75). Una disfunción del metabolismo energético mitocondrial implica una disminución de la producción de ATP, problemas con el almacenamiento de calcio y su consiguiente generación de ERO, como anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. Las evidencias muestran que las ERO inducen al daño mitocondrial y la hiperfusión vascular como iniciadores de la enfermedad del Alzheimer, e incluso la oxidación de los canales de

potasio está relacionada con la neurodegeneración (76, 77). También existe la acción de las especies reactivas en los microvasos cerebrales, que promueven la adhesión leucocitaria y aumentan el hipometabolismo endotelial, provocando pequeños accidentes cerebrovasculares. El estrés de las células neuronales, la agregación proteica y los pequeños accidentes cerebrovasculares son el origen de la enfermedad del Alzheimer (69, 78).

5.9.2.5. Enfermedad del Parkinson

La enfermedad del Parkinson es un trastorno neurodegenerativo caracterizado clínicamente por una rigidez progresiva, bradiquinesia y temblores. El estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, factores ambientales y la predisposición genética son factores que pueden llegar a desarrollar la enfermedad del Parkinson (69).

Las evidencias indican que pacientes con enfermedad del Parkinson padecían un defecto en el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en la sustancia nigra, daño oxidativo al ADN, nitración proteica, el producto de la peroxidación lipídica 4-hidroxi-2-nonenal acumulado en el cerebro y oxidación de la ceruloplasmina, una ferroxidasa encargada de regular el transporte de hierro, de forma que su disfunción provoca la acumulación del hierro intracelular (69, 79).

5.9.2.6. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple es una enfermedad, que se cree que es autoinmune y que se caracteriza por una conducción nerviosa deteriorada debido a la desmielinización. Las células inmunitarias activadas generan ERO y posiblemente NO (69, 80).

Esta enfermedad se inicia con la activación de la microglía y los macrófagos, además de la disfunción mitocondrial que generan especies reactivas, las cuales son las mediadoras de la desmielinización y el daño neuronal, dañando las células y reduciendo la actividad de las defensas antioxidantes. Las lesiones en las células se producen vía peroxidación lipídica, oxidación del ADN y nitración proteica. El aumento de la acción de las especies reactivas y el descenso de las defensas antioxidantes conlleva a un estado inflamatorio en el sistema nervioso central (80). Se ha encontrado un aumento de la actividad de la GPx en pacientes con esclerosis múltiple, pero no es suficiente para controlar el estrés oxidativo que causa la enfermedad, ya que la cantidad de citoquinas que induce este estado inflamatorio supera estas defensas. Se han hecho estudios de terapias antioxidantes para mejorar la sintomatología de la enfermedad, con resultados favorables (69).

5.9.2.7. Síndrome de Down

El síndrome de Down es un defecto congénito responsable de un retraso mental. Las especies reactivas, debidas a un fallo mitocondrial, empiezan a actuar ya en el feto, causando el estado neurodegenerativo, ya que las enzimas encargadas del metabolismo del peróxido de hidrógeno ven reducida su actividad, de forma que al no

eliminar el H_2O_2 , las defensas antioxidantes no son suficientes a pesar del aumento de la actividad de la SOD (69). Este aumento del peróxido de hidrógeno induce la apoptosis celular de los individuos con Síndrome de Down. A partir de los cuarenta años, muchas personas con Síndrome de Down desarrollan placas seniles (81). Se ha encontrado una disminución de todas las formas del glutatión en niños con Síndrome de Down (82), una ligera reducción de los niveles de vitaminas C y E y un pequeño aumento en TBARs (69). No obstante, no se han encontrado resultados favorables de terapias antioxidantes en individuos con este síndrome.

5.9.2.8. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington consiste en un trastorno hereditario caracterizado por un desorden psiquiátrico, demencia, contracciones y contorsiones y muerte neuronal. Esta enfermedad degenerativa afecta principalmente a los ganglios basales (69).

Existe una disfunción mitocondrial y un índice elevado de peroxidación lipídica que resulta en una mayor liberación de ERO (83). También se ha encontrado un descenso en los niveles intracelulares de glutatión y de la actividad de la CAT, con acumulación de ERO en las neuronas, también deficientes en otros antioxidantes como la cisteína. El daño oxidativo es un prerrequisito para que se forme una lesión estriatal presente en la enfermedad de Huntington, y por este motivo se cree que una terapia antioxidante podría ser efectiva para aliviar la sintomatología de este trastorno (69).

5.9.2.9. Psicosis familiar

La psicosis es un término genérico utilizado en psiquiatría y psicología para referirse a un estado mental descrito como una escisión o pérdida de contacto con la realidad. Las personas que experimentan psicosis pueden presentar alucinaciones o delirios y pueden exhibir cambios en su personalidad y pensamiento desorganizado. Estos síntomas pueden ir acompañados por un comportamiento inusual o extraño, así como por dificultad para interactuar socialmente e incapacidad para llevar a cabo actividades de la vida diaria. Generalmente, la psicosis se ha asociado con un ambiente familiar negativo y un incremento de la expresión emocional (84).

Se hizo un estudio sobre el estrés oxidativo en adolescentes que poseían antecedentes familiares de psicosis, comparándolo con un grupo control (84). Los resultados demostraron que el estado antioxidante era inferior en los individuos con antecedentes familiares de psicosis. También se evaluaron otros marcadores que reflejaban que el nivel de estrés oxidativo era superior en las personas con antecedentes que en el grupo control, pero en estos casos no encontraron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, este fenómeno hace pensar que el daño oxidativo esté implicado en el desarrollo de un estado psicótico (84).

5.10. Lesiones renales

El estrés oxidativo es muy importante en la producción de ciertas lesiones a nivel renal, las cuales pueden llegar a ocasionar distintas patologías, como la insuficiencia renal o la formación de cálculos renales. Estas patologías empiezan al causar daños en la nefrona, o/y en el tejido conectivo intrapapilar situado en la zona próxima a la punta de la papila renal.

5.10.1. Daños en la nefrona

El estrés oxidativo causa el daño renal a partir de las LDL nativas, aunque también por las LDL oxidadas por células mesangiales, sobretodo en el glomérulo, que es más sensible al estrés oxidativo que cualquier otra parte de la nefrona (3).

La lesión glomerular, a su vez, genera más RL, que inducen la infiltración leucocitaria. Los leucocitos, por una parte, inducen la oxidación de las LDL, y por otro lado, activan los mediadores de la inflamación, empezando por el $\text{NF}\kappa\beta$, que regula la síntesis de las citoquinas proinflamatorias, además de la formación de moléculas de adhesión leucocitaria y activación de enzimas inflamatorias. Todo este mecanismo termina en un proceso inflamatorio agudo que aumenta el daño glomerular. Este proceso se conoce como glomerulopatía lipoproteica, en la cual el daño renal progresa rápidamente. De esta manera, puede llegar a activarse la apoptosis de células mesangiales y endoteliales, inducida por las citoquinas como el $\text{TNF-}\alpha$, mientras que el $\text{TGF-}\beta$ aumenta la permeabilidad del glomérulo a ciertas proteínas como la albúmina. A partir de estos procesos se puede desarrollar una glomeruloesclerosis (3).

Estas lesiones alteran el filtrado glomerular, dejando paso a sustancias y moléculas como las LDL oxidadas, metales de transición, hemoglobina y mioglobina e incluso drogas y fármacos que pueden ser muy tóxicos para el epitelio tubular. Las LDL oxidadas forman un ambiente prooxidante que daña las paredes del túbulo, el hierro provoca radicales hidroxilo y lipoperóxidos, la mioglobina incrementa la producción de peróxido de hidrógeno y un fuerte descenso del glutatión (3).

En el filtrado glomerular, durante una lesión, también pueden penetrar los macrófagos, que producen los mediadores inflamatorios, como citoquinas y quemoquinas, creando un ambiente inflamatorio. Además, los RL activan la expresión de genes de los mediadores inflamatorios que potencian la inflamación ya que se atraen más leucocitos, como monocitos y linfocitos T (3).

El estado proinflamatorio, seguido de una fibrosis tubular puede desencadenar un trastorno por obstrucción ureteral, en el que, por supuesto, se liberarán más RL y mediadores proinflamatorios, mientras que las enzimas antioxidantes como la SOD ven reducida su actividad, hecho que aumenta la vulnerabilidad del riñón al estrés oxidativo (3).

5.10.2. Cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) papilar

Los cálculos de oxalato cálcico son los más frecuentes. Para la formación de un cálculo renal de oxalato cálcico monohidrato papilar es necesario que existan lesiones en el tejido interno de la papila (85).

La peroxidación lipídica de los ésteres de colesterol influye en la lesión renal, ya que se incrementa la concentración de aldehídos (como el malondialdehído, molécula muy oxidante), cetonas, radicales hidroxilo, peroxilo y peróxido de hidrógeno. Por su parte, el aumento de malondialdehído favorece el ataque de esta molécula a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, mientras que el peróxido de hidrógeno produce señales que inducen a la diferenciación celular e incluso a la apoptosis (86).

Los RL, en especial el peróxido de hidrógeno, no solamente provocan las lesiones en el epitelio renal, sino que también reducen la actividad de la SOD. El mecanismo de acción está formado por un conjunto de reacciones oxidativas que inactivan el centro activo de la isoenzima SOD1. La estructura de la SOD1 está formada por Cu, Zn y la cadena de aminoácidos (Cu/Zn-SOD). Los radicales libres actúan liberando los iones Cu^{2+} de la estructura, los cuales reaccionan con el peróxido de hidrógeno pasando a iones Cu^+ . La reacción con el peróxido de hidrógeno continúa formando radicales hidroxilo, los cuales, seguidamente, oxidan a los aminoácidos del centro activo de la SOD, con la consiguiente formación de radicales carbonilo. De esta manera, se aumenta el estrés oxidativo a la vez que se reducen las defensas antioxidantes (86).

Estas lesiones alteran la microestructura de la superficie del epitelio renal y del tejido conectivo interno, ya que en ella se expresan una gran cantidad de moléculas de carga negativa, como son la osteopontina, colágeno alterado y ácido hialurónico. Este aumento de la carga negativa facilita la adhesión de los cristales de fosfato cálcico, en

condiciones favorables para formar posteriormente un cálculo de oxalato cálcico monohidrato (COM) papilar, por un mecanismo de nucleación heterogénea (86).

El mecanismo de formación de un cálculo papilar debido a una lesión papilar se explica en las figuras 4 y 5.

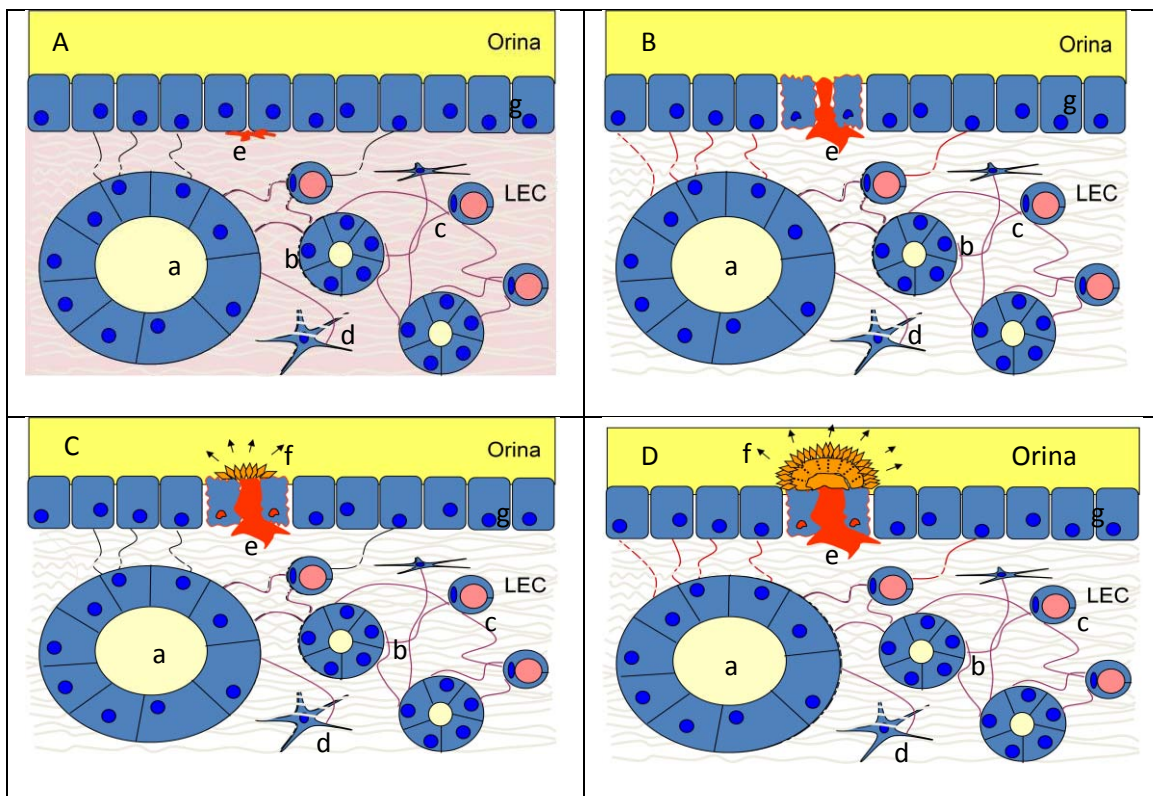


Figura 4. Formación de un cálculo papilar de COM inducido por una lesión del epitelio que cubre la papila. A) Génesis de una lesión que afecta directamente al epitelio cúbico que recubre la punta de la papila. B) La lesión provoca alteraciones del epitelio. C) Sobre el detritus orgánico generado y como consecuencia de la sobresaturación de la orina en oxalato cálcico, se inicia por nucleación heterogénea el crecimiento de los cristales de COM. D) Se inicia la formación del cálculo papilar de COM. LEC) líquido extracelular. a) túbulo colector. b) túbulos proximal y distal asa de Henle. c) capilares. d) células tejido conectivo. e) lesión en las fibras de colágeno. f) cálculo de COM papilar. g) epitelio.

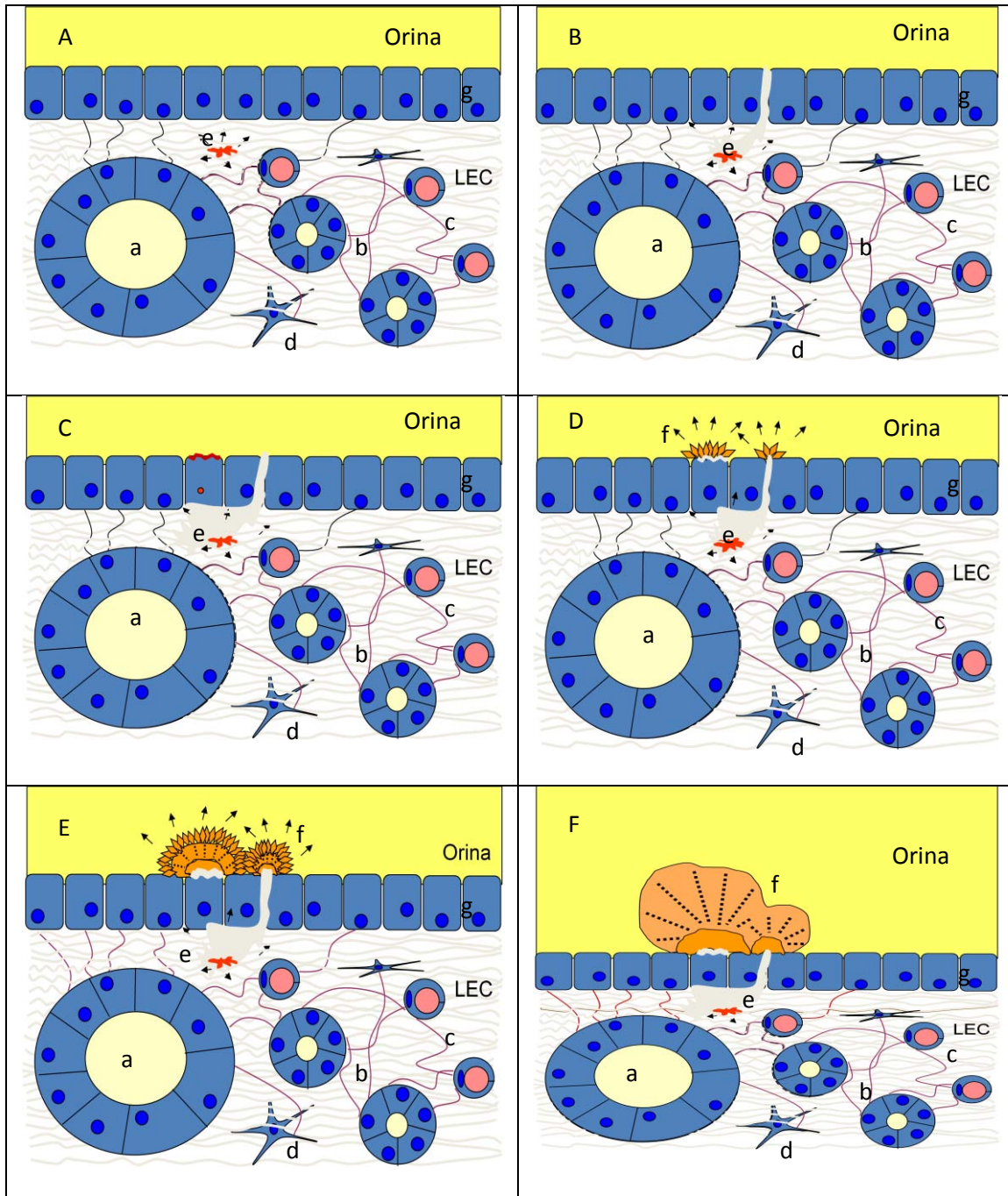


Figura 5. Formación de un cálculo papilar de COM inducido por una lesión interna del extremo de la papila. A) Génesis de la lesión del tejido interno de la papila generada sobre fibras de colágeno. B) La lesión induce la cristalización de hidroxapatita sobre las fibras de colágeno. C) La calcificación interna rompe el epitelio y entra en contacto con la orina. D) Al estar siempre sobresaturada la orina en oxalato cálcico, se inicia el crecimiento de cristales de COM sobre la hidroxapatita. E) Se inicia el desarrollo del cálculo papilar de COM. F) Cálculo de COM generado sobre la punta de la papila. LEC) líquido extracelular. a) túbulo colector. b) túbulos proximal y distal asa de Henle. c) capilares. d) células tejido conectivo. e) lesión en las fibras de colágeno. f) cálculo de COM papilar. g) epitelio.

6. TERAPIAS CON ANTIOXIDANTES

Durante los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar si algunas enfermedades metabólicas se podrían tratar mediante la dieta. Estas enfermedades derivan de la aparición y aumento del estrés oxidativo, de manera que una buena opción para el tratamiento de dichos trastornos sería mediante la mayor ingesta de compuestos antioxidantes.

6.1. Antioxidantes de la dieta

Los antioxidantes pueden relacionarse con las defensas endógenas (mencionado anteriormente), o pueden provenir de la dieta. Los antioxidantes exógenos se encuentran principalmente en las frutas y verduras y entre ellos encontramos (32):

- Ácido ascórbico o vitamina C: la fuente principal de esta vitamina son los cítricos (naranja, limón,...), el tomate, el brócoli,...
- Vitamina E: en este grupo entran los tocoferoles y los tocotrienoles. El más abundante es el α -tocoferol, y se encarga de regenerar el glutatión endógeno. La vitamina E se encuentra sobretodo en los aceites vegetales (oliva, soja, maíz, girasol), frutos secos, espinacas, zanahoria y aguacate.
- Carotenoides: en este grupo se encuentran el α -caroteno en la naranja, mandarina, tomate, y zanahorias; el β -caroteno en zanahorias, espinacas y sandía; el licopeno

sobretudo en el tomate, pero también en la papaya, sandía y pomelo y finalmente están la luteína y la zeaxantina que se encuentran en las espinacas, el brócoli,...

- Polifenoles: éstos pueden ser flavonoides o no flavonoides.
- Compuestos naturales que no entran en ningún grupo de los anteriores, como el coenzima Q10 y la ergotioneína.

Los polifenoles son un grupo de antioxidantes muy abundante en la naturaleza, presentes en un gran número de plantas. Los distintos tipos de polifenoles son (33):

1. Polifenoles flavonoides (Figura 6):

- Antocianinas: las antocianinas y antocianidinas son pigmentos hidrosolubles presentes en muchas frutas, verduras y flores, sobretudo uvas y moras.
- Catequinas o flavanoles: principalmente localizados en las hojas del té. Las más importantes son la catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-galato y epicatequingalato.
- Flavonas: apigenina y luteolina. La camomila contiene mucha apigenina.
- Flavonoles: los más comunes son la quercetina, miricetina y kaempferol. Son frecuentes en la cebolla, manzana, vino tinto, brócoli, té y Ginkgo biloba.
- Isoflavonas: la soja es una fuente de genisteína y daidzeína.

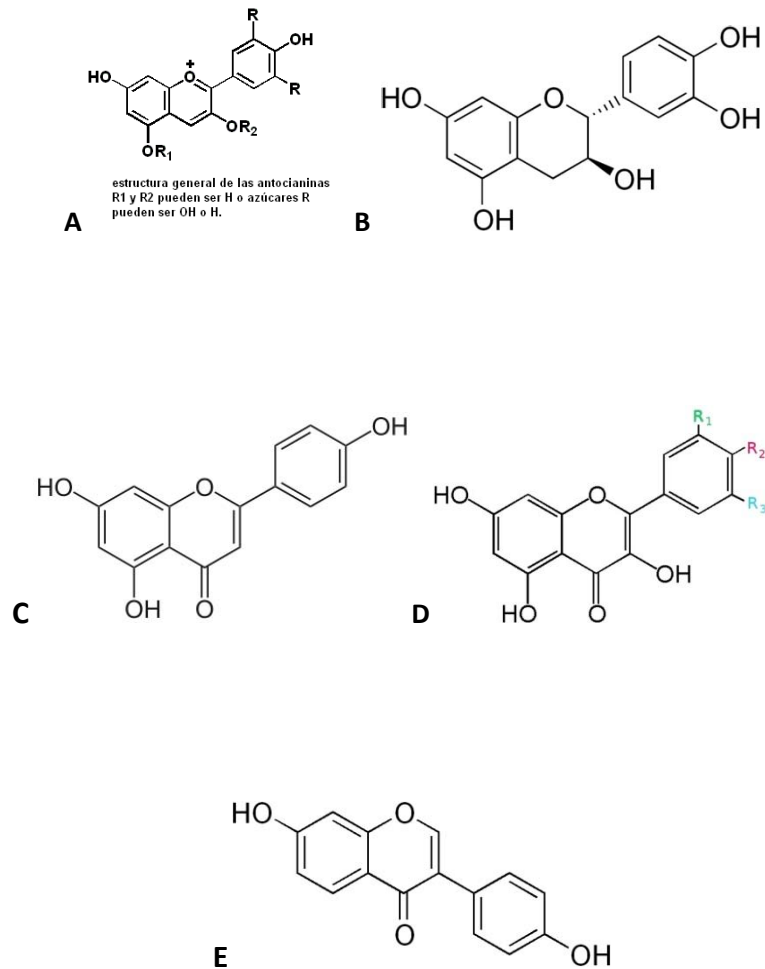


Fig 6. Estructura química de varios tipos de polifenoles flavonoides: (A) antocianidinas, (B) catequina, (C) apigenina, (D) flavonoles y (E) daidzeína.

2. Polifenoles no flavonoides (Figura 7):

- Ácidos fenólicos: el café contiene ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido coumárico y los arándanos ácido gálico, ácido vanílico, además del cafeico y coumárico.
- Lignanós: como el enterodiól. Se encuentran en nueces y cereales.
- Estilbenos: el resveratrol se encuentra en la piel de la uva negra.

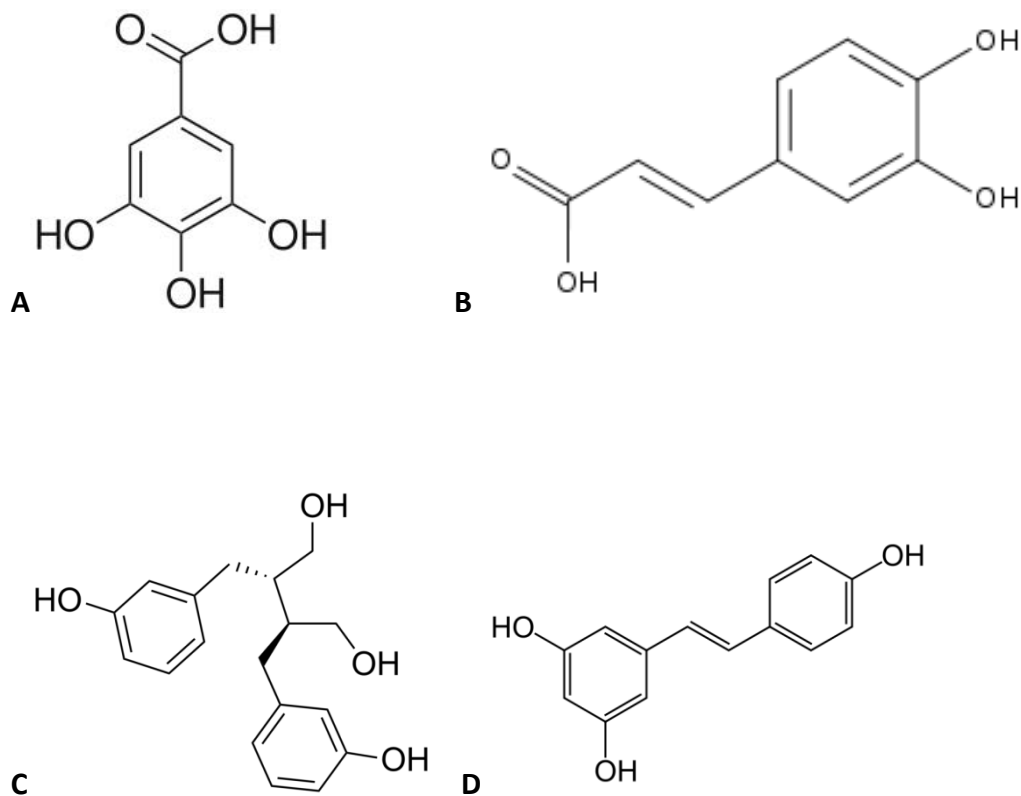


Fig 7. Estructura química de varios polifenoles no flavonoides: (A) ácido gálico, (B) ácido cafeico, (C) enterodiol y (D) resveratrol.

3. Taninos (Figura 8):

- Taninos hidrolizables: son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico, y azúcares simples. Se encuentran en el vino tinto, té y nueces. Son moléculas muy grandes.

- Taninos condensados: también llamados proantocianidinas. Son polímeros de la antocianidina. Se encuentran en uvas, vino tinto, corteza de pino. Las procianidinas son catequinas oligoméricas que se encuentran concentradas en el vino tinto, uvas y

extracto de la uva, cacao, arándano rojo, manzanas y algún suplemento como el picnogenol.

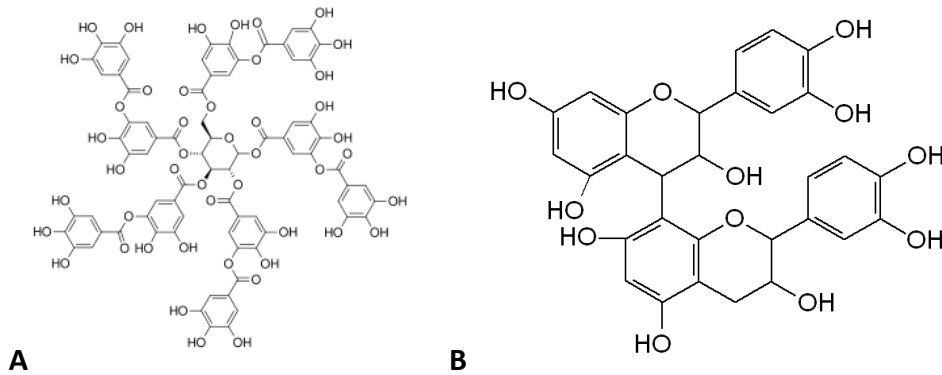


Fig 8. Estructura química de los taninos: (A) tanino hidrolizable y (B) tanino condensado.

6.2. Tratamientos

En los últimos años, la dieta ha pasado de ser hipocalórica a hipercalórica y elevada en grasas, provocando un aumento del índice de enfermedades cardiovasculares, siendo la mayor causa de mortalidad en el mundo. La fuente principal de antioxidantes son las frutas y verduras, las cuales tienen un efecto protector contra las enfermedades derivadas del estrés oxidativo. Las dietas ricas en vegetales están inversamente relacionadas con el riesgo de varias enfermedades, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares, aunque no son las únicas (87).

6.2.1. Envejecimiento

La disminución del aporte energético de la dieta ha demostrado que aumenta la esperanza de vida en algunos organismos como los roedores y moscas del género *Drosophila*, debido a que un exceso de energía contribuye a una mayor producción de RL. Los antioxidantes de la dieta también han demostrado ser eficaces para retrasar el envejecimiento y aumentar la esperanza de vida. Dichos antioxidantes reducen la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN, y se han realizado experimentos con animales a los que se les administraba, en algunos casos, catequinas y teaflavinas del té, las cuales extendían la media de la esperanza de vida entre un 10 y un 16% en *Drosophilas*, y los polifenoles de las manzanas conseguían lo mismo en ratas con dietas hipercolesterolémicas y en moscas de la fruta, encontrándose un incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT (4). La ingesta de isoflavonas de la soja está inversamente relacionada con la hipercolesterolemia, osteoporosis y algunos cánceres. Según la *Food and Drug Administration (FDA)*, 25 gramos de proteína de soja diaria, como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, puede reducir el riesgo de enfermedad cardíaca (31).

6.2.2. Enfermedades cardiovasculares

6.2.2.1. Síndrome metabólico

Dos vitaminas conocidas por sus efectos antioxidantes son la vitamina E y el coenzima Q10. Se ha detectado que los niveles plasmáticos de vitamina E y coenzima Q10 son más elevados en las personas con síndrome metabólico, aunque ese

crecimiento no es significativo. Se cree que este incremento deriva de la protección antioxidante de lipoproteínas ricas en triglicéridos y a que los alimentos de elevado contenido en lípidos (carnes, pescado, frutos secos y aceites) son una buena fuente de coenzima Q10 (22). No está establecida la relación entre el riesgo de síndrome metabólico y el contenido plasmático de vitamina E y coenzima Q10, pero sí que a mayor actividad de las enzimas antioxidantes, menor riesgo de desarrollar el síndrome metabólico (22).

Las vitaminas del grupo B han demostrado ser beneficiosas para la prevención del síndrome metabólico, ya que el consumo de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂) y niacina (vitamina B₃), las cuales no se sintetizan en el organismo, están relacionadas con una disminución de la prevalencia y la incidencia del síndrome metabólico (88). La tiamina es necesaria para que las células β -pancreáticas realicen su función endocrina, de forma que se reduce la posibilidad de resistencia a la insulina, y la niacina posee efectos beneficiosos en el perfil lipídico, ya que reduce los niveles de triglicéridos y LDLc y aumenta los de HDLc (88).

Los polifenoles son un grupo de antioxidantes que también poseen efectos beneficiosos para los pacientes que han desarrollado síndrome metabólico. Un estudio describe que una dieta rica en polifenoles y en ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de cadena larga disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por su parte, un grupo de voluntarios que recibió una dieta rica en polifenoles mejoró significativamente en el perfil lipídico, ya que se redujo la concentración de triglicéridos y VLDLc plasmáticos (89). Existen varias investigaciones que afirman que el té verde es beneficioso debido a las propiedades antioxidantes por su elevado

contenido en polifenoles, sobretodo catequinas. El consumo regular de té verde puede mejorar el gasto energético, la oxidación de grasas, la pérdida de peso y su posterior mantenimiento. Los resultados de la mayoría de estudios con animales han demostrado que las catequinas del té verde regulan los niveles plasmáticos de lípidos y disminuyen la posibilidad de desarrollar resistencia a la insulina, aunque hay que reconocer que los resultados de los estudios en humanos han sido heterogéneos (90).

Por último, se ha confirmado también que el extracto de aceite de palma, con un elevado contenido en polifenoles y vitaminas antioxidantes, posee un claro efecto cardioprotector, ya que con su consumo se logra mejorar el perfil lipídico, se reduce el índice de obesidad, la tensión arterial y la rigidez de las paredes arteriales (91).

6.2.2.2. Aterogénesis

Aunque el síndrome metabólico es una enfermedad a tener en cuenta, cada uno de sus factores por separado también constituye un riesgo para la salud de las personas. Por ejemplo, la aterogénesis eleva el riesgo de sufrir un accidente cardiovascular grave. Los componentes antioxidantes de la dieta ayudan a prevenir el desarrollo y el crecimiento de las placas de ateroma.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado los efectos preventivos de los antioxidantes frente a los efectos del estrés oxidativo. El consumo de cítricos, que además de polifenoles, poseen un alto contenido de vitamina C, que es otro antioxidante con poder antiaterogénico, ha demostrado dicho efecto en un estudio con animales (a los cuales se les administraba zumo de lima) con dieta

hipercolesterolémica (92). La pectina es otro componente antioxidante con propiedades antiaterogénicas, aunque en este caso es por un mecanismo independiente de los niveles de colesterol (92). Existen plantas como las del género *Racemosa*, cuyo extracto alcohólico de elevado contenido en antioxidantes, inhibe la enzima HMG-CoA reductasa en ratas, que es la enzima limitante de la biosíntesis del colesterol (93).

La vitamina E, cuyo isómero más activo en cuanto a capacidad antioxidante es el α -tocoferol, ha demostrado ser capaz de inhibir *in vitro* la oxidación de las LDLc y tener propiedades antiinflamatorias al inhibir la ciclooxigenasa 2, lo que da lugar a la hipótesis de que la administración de vitamina E podría ser beneficiosa para la salud cardiovascular. No obstante, en los estudios *in vivo* ha habido discrepancias respecto a su actividad cardioprotectora, ya que los estudios realizados con vitamina E hasta la fecha no demuestran una disminución de la incidencia de accidentes cardiovasculares (94).

Los polifenoles de la dieta reducen la oxidación de las LDLc, disminuyen la agregación plaquetaria e incrementan el nivel circulatorio de las HDLc, además de presentar propiedades antiinflamatorias, que en conjunto inhiben el crecimiento de las placas de ateroma (95, 96). Se ha demostrado que el vino tinto, cuyo contenido en polifenoles es elevado, aumenta la biodisponibilidad del NO y mejora la función endotelial. Por este motivo, se recomienda el consumo moderado de vino, de forma que, además de la protección de la salud cardiovascular que poseen los antioxidantes, no se produzcan los efectos adversos que se derivan del consumo de alcohol, como la resistencia a la insulina (95).

Como se ha mencionado, los polifenoles son muy importantes para la salud cardiovascular, no obstante, hay que tener en cuenta que por sí solos, no pueden llevar a cabo la función cardioprotectora. La dieta mediterránea se caracteriza por ser la más cardiosaludable, de menor consumo energético, bajo grado de inflamación y sirve para prevenir el síndrome metabólico. Para ello, además de los polifenoles, se debe consumir una cantidad suficiente de fibra y de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 y ω -3 (97).

6.2.2.3. Arritmia

Al aumentar la capacidad antioxidante del organismo se reduce el riesgo de padecer este tipo de patología. Aunque existen diferentes estudios con resultados contradictorios en este sentido, se ha concluido que la N-acetilcisteína (NAC), la vitamina C y los ácidos grasos poliinsaturados tienen un gran potencial antiarrítmico, además del hecho de que la vitamina C y los ácidos grasos poliinsaturados han demostrado ser capaces de acortar la estancia hospitalaria de los pacientes que padecen de una fibrilación atrial (98).

6.2.2.4. Función Endotelial

Estudios en animales han demostrado que el uso de resveratrol y de otros derivados estilbenos puede ser útil en este tipo de situaciones, ya que se encargan de aumentar la biodisponibilidad de NO, así como de disminuir la producción intracelular

de RL y de activar las defensas enzimáticas. Como el balance NO/superóxido regula la función endotelial, la habilidad del resveratrol y la quercetina (flavonoide) para equilibrar el balance redox puede ser beneficiosa para la funcionalidad del endotelio vascular (99).

Sin embargo, las experiencias realizadas en humanos no han sido capaces de lograr los mismos resultados, ya que existen diferencias entre los estudios llevados a cabo hasta el momento, fenómeno que indica que es necesario planificar más investigaciones para obtener resultados concluyentes (17, 87).

6.2.3. Diabetes

Existen trabajos prometedores que indican que el resveratrol (del grupo de los polifenoles) podría mejorar el estado físico de una persona diabética (100).

6.2.4. Inflamación

Los polifenoles de la dieta aumentan las defensas antioxidante/antiinflamatoria interviniendo en los mecanismos inflamatorios anteriores. Esta acción previene el incremento de prostaglandina-2 (PGE2), TNF- α y la IL-6, las cuales son citoquinas pro-inflamatorias. La piel de manzana contiene una cantidad suficiente de polifenoles capaz de ejercer dicha acción (52).

Existe un estudio en el que se evaluó si se puede tratar un cuadro de inflamación con diclofenaco (fármaco antiinflamatorio) conjuntamente con

antioxidantes, y aunque cada uno por separado ejerció su acción antiinflamatoria, en conjunto no lograron aumentar el poder antiinflamatorio (53).

Los procesos inflamatorios pueden llegar a desarrollar enfermedades inflamatorias crónicas, como es el caso de la artritis reumatoide. Se está investigando el uso de antioxidantes como terapia preventiva para evitar el desarrollo de esta patología. El extracto de té verde es rico en polifenoles (como hemos mencionado anteriormente), de los cuales la epigalocatequina-3-galato (EGCG) es el predominante. Existen evidencias de que este polifenol inhibe la actividad de enzimas pro-inflamatorias y vías de transducción de señales implicadas en la inflamación, y por esta razón es un buen inhibidor del desarrollo de artritis en un modelo animal (101).

6.2.5. Cáncer

Se han realizado diversas investigaciones en animales que demuestran que el uso de té verde, de alto contenido en polifenoles, por un lado, aumenta la potencia de la quimioterapia habitual, y por otro lado reduce los efectos secundarios de la misma (24-26, 101). La vitamina C también ayuda a rebajar los efectos secundarios de la quimioterapia, ya que su administración reduce la fatiga y el insomnio, mientras que aumenta la función cognitiva de los pacientes (102).

En los trabajos realizados con animales, se ha descubierto que los polifenoles, además de anular a los RL y sus metabolitos por su acción antioxidante, son capaces de anular la resistencia de algunos tipos de cáncer frente a los agentes quimioterapéuticos. Un ejemplo se describió en un modelo animal con ratones con

cáncer hepático, en el que los polifenoles mejoraban la actividad anticancerígena de la doxorubicina, inhibiendo la bomba de flujo de salida de la P-glicoproteína, permitiendo al fármaco la entrada en la célula cancerígena para posteriormente activar los mecanismos de apoptosis (25). Es importante recalcar que el efecto antiinflamatorio que poseen los polifenoles u otros antioxidantes contribuye a su efecto anticancerígeno, ya que los procesos inflamatorios también pueden desencadenar mutaciones en ADN y con ello ayudar a desarrollar un cáncer (26, 103, 104).

Otras investigaciones con animales han demostrado que los polifenoles del té verde, y en especial la EGCG, tienen la capacidad de inhibir el desarrollo y el crecimiento de cáncer de próstata, vejiga, mama, intestino, colon, estómago, esófago, pulmón, piel, tiroides y cáncer oral, mediante la inhibición de la metilación del ADN (105-107). El mecanismo por el cual pueden actuar para llevar a cabo dicha acción depende del tipo de cáncer y de las señales que éste utilice para su desarrollo y proliferación: inducción de apoptosis, inhibición de la fosforilación de ciertas proteínas en modelos de tumoración pulmonar (27),...

También se ha descubierto que el uso de diferentes polifenoles como la EGCG y la quercetina puede aumentar el efecto anticancerígeno, ya que esta última aumenta la absorción intestinal e impide el rápido metabolismo por metilación de la EGCG, la cual puede ejercer su acción sobre las células cancerígenas. Así se ha demostrado en un estudio en el que se utilizó un modelo animal de cáncer de próstata (28). La quercetina y el resveratrol también tienen efectos sinérgicos para inhibir la proliferación del cáncer de colon (108).

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en las experiencias llevadas a cabo en humanos no son concluyentes (27, 28). Las diferencias en los resultados podrían deberse a que los estudios con animales están diseñados de forma que los animales reciben una dosis de polifenoles muy alta para asegurar su efecto, mientras que el consumo de té verde por parte de las personas es inferior a las dosis administradas a los animales (27). Este fenómeno no ocurre solamente en el caso del té verde, sino también en el consumo de frutas ricas en polifenoles, que han demostrado tener propiedades quimiopreventivas, tanto en la prevención como en el tratamiento del cáncer de páncreas, pero estos estudios son limitados ya que la mayoría se han realizado *in vitro* (109). En cambio, sí que se ha demostrado que los polifenoles y los antioxidantes en general son un refuerzo para combatir los posibles trastornos metabólicos consecuentes del cáncer de páncreas, sobre todo en lo que se refiere a la secreción o resistencia a la insulina (110).

Está descrito que hay casos en los que el consumo moderado de vino puede ejercer una acción protectora frente al cáncer de pulmón. Existe cierto tipo de células del adenocarcinoma de pulmón que son resistentes al tratamiento por quimioterapia. En algunos casos, los polifenoles del vino han conseguido inhibir la proliferación de las células A549 del adenocarcinoma de pulmón, siendo más potente el efecto del vino tinto que del vino blanco (111). No obstante, los factores ambientales también influyen en esta acción, ya que se ha encontrado que este efecto protector no ocurre en los pacientes fumadores (111, 112). En el caso del cáncer de próstata, los polifenoles afectan la metilación del ADN y la expresión del ARN. De hecho, en este tipo de cáncer, del que destaca su asociación con la alimentación, una dieta rica en

polifenoles puede ser de gran utilidad para su prevención (113). Por otro lado, los polifenoles del melocotón inhiben el crecimiento y la metástasis pulmonar del cáncer de mama (114).

Se ha concluido que se deben realizar más estudios clínicos para establecer definitivamente el efecto beneficioso de los antioxidantes en general y de los polifenoles en particular en los pacientes con cáncer debido a las controversias observadas entre las diferentes investigaciones, pero las experiencias llevadas a cabo en animales o *in vitro* demuestran que es una terapia prometedora para reforzar los tratamientos contra el cáncer (115).

6.2.6. Enfermedades respiratorias

El estrés oxidativo puede llegar a afectar a la función respiratoria. Se ha relacionado el consumo de una dieta mediterránea (baja en grasas y de elevado consumo de antioxidantes) con un menor índice de asma y alergias, mientras que una dieta baja en vitaminas A, C y E está asociada con déficits en la función pulmonar y una mayor incidencia de síntomas de alergia y asma (116). Por su parte, el uso de la NAC, precursor del glutatión, implica una significativa reducción de las exacerbaciones producidas por la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (117).

6.2.7. Afecciones cutáneas

El uso de suplementos de vitaminas A, C y E como antioxidantes es útil para tratar la dermatitis atópica. De hecho, muchos preparados farmacéuticos están elaborados a base de retinol, un derivado de la vitamina A (34).

Los antioxidantes en general y los polifenoles en particular son capaces de minimizar los síntomas causados por la radiación UV, al mejorar la tolerancia de la piel a dichas radiaciones, tanto si se administran por vía oral o cutánea (32, 33). La EGCG del té verde y las proantocianidinas del extracto de uva reducen el estrés oxidativo, inhiben la peroxidación lipídica, disminuyen la inflamación mediada por la radiación UV, el daño oxidativo en el ADN y suprimen la respuesta inmune (33). El daño oxidativo en el ADN se produce mediante la formación de dímeros ciclobutano pirimidina de carácter oncogénico. La luteolina es un flavonoide de acción antioxidante muy potente que inhibe la formación de estos dímeros, además de inhibir la ciclooxigenasa-2 y las prostaglandinas que causan un cuadro inflamatorio que puede cursar con un eritema en la piel (35).

6.2.8. Ansiedad y depresión

Se puede seguir una dieta antioxidante para hacer frente a numerosas patologías que se manifiestan debido al estrés oxidativo, entre ellas la ansiedad y la depresión. Este tipo de dieta serviría para equilibrar el balance oxidante-antioxidante del organismo, reforzando las defensas antioxidantes intrínsecas.

El ácido úrico, producto del metabolismo de las purinas, es el mayor antioxidante en la sangre, y se puede estimular su producción con la ingesta de fructosa mediante la fruta (aunque en exceso se ha relacionado con la diabetes) (118). Sin embargo, tampoco se puede abusar de alimentos precursores de la síntesis de ácido úrico (excesivas carnes rojas), porque en exceso puede llegar a cristalizar y provocar problemas renales y en las articulaciones.

Por otro lado, existen antioxidantes hidrosolubles y antioxidantes liposolubles. En el caso de los hidrosolubles, encontramos la vitamina C, glutatión y ácido lipoico, mientras que los carotenoides y los derivados de la vitamina E son liposolubles. Un estudio en pacientes diabéticos con ansiedad y depresión ha probado que la administración de vitamina C disminuye la ansiedad al reducir el daño oxidativo provocado por el exceso de especies reactivas (119).

Las vitaminas liposolubles se encargan de proteger a los lípidos de la membrana de la peroxidación lipídica, incluida la vitamina D, que no solamente depende de la dieta sino también de la exposición al sol. Por su parte, el ubiquinol (forma antioxidante del coenzima Q10) forma parte de la cadena de transporte de electrones y previene su disfunción (120). Se han llevado a cabo estudios que han demostrado resultados prometedores en pacientes con trastornos neuropsiquiátricos si se administran antioxidantes conjuntamente con ácidos grasos poliinsaturados, protegiéndose de esta manera las membranas neuronales y se previene el daño celular (121).

Los polifenoles que contiene la uva pueden ser un suplemento importante para combatir el exceso de RL. Un estudio con ratas ha demostrado que la adición de este tipo de suplemento reduce el estrés oxidativo inducido por la administración de L-butionin-(S,R)-sulfoximina (BSO), de manera que se reducía el comportamiento de ansiedad y la pérdida de memoria causada por el estrés oxidativo (122).

El antioxidante celular más habitual es el glutatión, y por este motivo se podría convertir en una diana para los tratamientos antioxidantes. La síntesis del glutatión depende fundamentalmente de dos factores: la disponibilidad de L-cisteína y la actividad de la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa. De la dieta podemos obtener el precursor acetilado de la L-cisteína, la NAC, que en esta forma está protegido frente a la oxidación en el tracto alimentario, y al absorberse, atraviesa la barrera hematoencefálica y allí se desacetila, obteniéndose el precursor del glutatión. Por esta razón, las neuronas son capaces de sintetizar el glutatión en concentraciones dependientes de la disponibilidad de NAC, consiguiendo efectos neuroprotectores (123).

Otra posibilidad de regular el balance redox del organismo es la realización de actividad física. Si el ejercicio físico se realiza de forma intensa, el gasto energético producido provoca un aumento de los RL y con ello del estrés oxidativo, pero si se lleva a cabo moderadamente y de manera continuada, se activa un mecanismo de adaptación que ayuda a reducir dicho estrés oxidativo y a aumentar las defensas antioxidantes. Una investigación en pacientes depresivos demostró que este tipo de actividad física reducía al menos uno de los marcadores del estrés oxidativo, concretamente los niveles de TBARS, además de aumentar la actividad de las enzimas

antioxidantes. En este estudio también se determinaron los niveles de BDNF con el objetivo de evaluar la neurogénesis, pero no pudieron obtener conclusiones ya que los participantes tomaban fármacos antidepresivos, los cuales tienen la propiedad de incrementar los niveles de BDNF (64).

Finalmente, hay que tener en cuenta que las terapias antioxidantes pueden ser efectivas a largo plazo para el tratamiento de la ansiedad y la depresión, así como de otras enfermedades derivadas del estrés oxidativo, pero no hay que excederse a la hora de consumir suplementos de antioxidantes. Eso se debe a que los RL, en su justa medida, también tienen sus funciones biológicas, como son la inducción de la fagocitosis de microorganismos, la detoxificación por el complejo citocromo P-450 y la inducción de la apoptosis de células no deseadas, y un exceso de antioxidantes impediría la ejecución de estas funciones (121, 122, 124).

6.2.9. Litiasis Renal

Trabajos recientes (125) demuestran que los antioxidantes pueden afectar a la formación de cálculos renales. Así, respaldan el hecho de que las lesiones tisulares, junto con la disminución de antioxidantes, pueden originar un cálculo renal de COM papilar. Además, existe una mayor prevalencia de estos cálculos en pacientes hipertensos, diabéticos y con un índice de masa corporal superior al recomendado (125-129). También afirman que son más frecuentes en el sexo masculino. Este tipo de pacientes, son los que sufren un mayor estrés oxidativo, y unido a una menor cantidad de antioxidantes, serían individuos susceptibles de padecer este tipo de cálculos.

Recientemente, se han realizado varios estudios en animales (126-132), con la finalidad de observar si el uso de antioxidantes resultan útiles a la hora de prevenir cálculos renales.

En el año 2008, un estudio (126) demostró que unos extractos de plantas tradicionales de conocidas propiedades antioxidantes son muy útiles a la hora de prevenir calcificaciones de COM papilares, siendo sus efectos parecidos a los obtenidos al suministrar catequinas o epicatequinas, flavonoides de fuerte acción antioxidante. Eso se debe a que estos componentes reducen el estrés oxidativo, de forma que se evita la producción de lesiones en el epitelio renal y su posterior proceso de calcificación.

Este estudio fue respaldado posteriormente por Chennasamudram y colaboradores (127) que estudiaron los efectos renoprotectores de las catequinas en ratas con diabetes inducida. Las ratas veían disminuidas sus defensas antioxidantes debido a la diabetes, pero la acción de las catequinas, reducían el estrés oxidativo de tal manera que las lesiones renales disminuían, como podía apreciarse a través de la excreción urinaria de albúmina, superior en los individuos no tratados que en los tratados con catequinas. En este artículo se especifica que las catequinas son mejores antioxidantes que otros flavonoides en la reducción in vitro de radicales peroxilo en fase lipofílica, haciendo referencia a Salah y colaboradores en 1995 (128).

7. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE UN FLUIDO BIOLÓGICO

El estudio del estrés oxidativo ha generado gran interés durante los últimos años. Por este motivo, se han desarrollado diversas metodologías de determinación del estrés oxidativo, las cuales se basan en el análisis de los antioxidantes y de los oxidantes, en general, por separado, en fluidos biológicos. En esta memoria se plantea el estudio exclusivamente de la orina, razón por la que no se incluirá un apartado de enzimas antioxidantes, ya que éstas no se encuentran en este medio.

7.1. Métodos de detección de antioxidantes

Una reacción química muy utilizada para la determinación del poder antioxidante en una muestra es el ensayo utilizando una disolución de Fe(III), en la que los antioxidantes de la muestra reducen el Fe(III) a Fe(II), que se detecta y cuantifica formando un complejo coloreado del que se puede medir la absorbancia a una longitud de onda concreta (133). La sustancia patrón es una disolución de Fe(II) de concentración conocida.

Una metodología es la propuesta por Benzie y colaboradores (134), en la que el reactivo cromógeno es la 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Este compuesto, en medio ácido (pH 3,6), forma un complejo con el Fe(II) que se puede cuantificar mediante su absorbancia a 593 nm. Esta reacción ha sido posteriormente utilizada por otros autores (135, 136).

El fundamento de esta técnica es el siguiente:

$\text{Fe(III)-TPTZ (inoloro) + reductores} \rightarrow \text{Fe(II)-TPTZ (azul intenso)}$ (reacción no específica)

Una modificación del método anterior, debido a que la TPTZ es un reactivo poco asequible, consiste en cambiar el compuesto cromógeno (137). En su lugar, se puede utilizar $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ en tampón acetato, que forma un complejo con el Fe(II) de color azul intenso y se puede cuantificar por la absorbancia a 720 nm. Este método se basa en la siguiente reacción química:

$\text{Fe(III) + reductores} \rightarrow \text{Fe(II)}$

$\text{Fe(II) + Fe(CN)}_6^{-3} \rightarrow \text{Fe}_3[\text{Fe(CN)}_6]_2$ (azul de Turnbull)

El $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ tiene el inconveniente que las proteínas de la muestra interfieren en la reacción, y en el caso de utilizar muestras de plasma o suero se deben desnaturalizar previamente las proteínas con ácido tricloroacético (TCA).

Otro sistema para determinar el potencial reductor férrico, es la formación del complejo del Fe(II) con la 1,10-fenantrolina en medio ácido. El producto de la reacción es de color rojo-anaranjado, con una longitud de onda de máxima absorbancia de 510 nm (135).

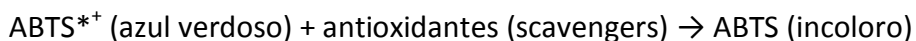
La reacción química utilizada en este método es la siguiente:

$\text{Fe(III) + reductores} \rightarrow \text{Fe(II)}$

$\text{Fe(II) + fenantrolina} \rightarrow \text{Fe(II)-fenantrolina (complejo rojo anaranjado)}$

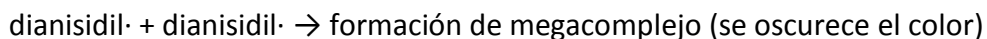
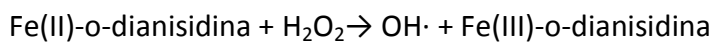
La detección del complejo formado con la fenantrolina ha sido utilizado incluso para la determinación de la actividad reductora de la enzima lipoil deshidrogenasa (138), que reduce los complejos de Fe(III) con el citrato, ATP y ADP.

Existe otro tipo de determinación que se basa en la inhibición de la reacción de oxidación por parte de los RL. En este caso, el patrón usado para el calibrado es el trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E que actúa de inhibidor de la reacción de oxidación. En una de ellas, los antioxidantes de la muestra inhiben la oxidación del ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) por parte del peróxido de hidrógeno, en la que el producto formado es el catión $ABTS^{*+}$, de color azul-verdoso, cuya absorbancia se puede leer a 660 nm (139):



Al contrario de lo que ocurría en la determinación del potencial reductor férrico, en este caso, cuanto más concentrada en antioxidantes sea la muestra, al ser un proceso de inhibición, menor intensidad tendrá el color de la disolución final, y por tanto, su absorbancia será inferior.

Otra metodología posible utiliza la reacción de Fenton, en la que el peróxido de hidrógeno oxida el Fe(II) que está formando un complejo con la o-dianisidina, y a su vez se forma el anión $OH\cdot$ (140). El $OH\cdot$ oxida la o-dianisidina al radical dianisidil \cdot , de color amarillo-marrón brillante, que junto a otro radical dianisidil \cdot forma un complejo que oscurece el color. La lectura de la absorbancia se realiza a 440 nm. Los antioxidantes inhiben la formación de este complejo.

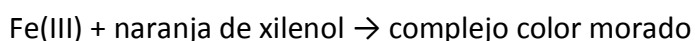
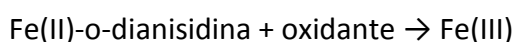


Los antioxidantes (scavengers) inhiben la última reacción.

Hasta el momento, estos métodos de detección del poder antioxidante se han aplicado a muestras de suero, aunque los autores especifican que es posible aprovecharlos para otro tipo de muestras biológicas, como puede ser la orina.

7.2. Métodos de detección de oxidantes

Existe la posibilidad de utilizar la reacción inversa a la usada en la determinación de antioxidantes, es decir, la reacción de oxidación de hierro (II) a hierro (III). Erel (141) propuso un método en el que los componentes oxidantes de la muestra oxidan el Fe(II), que está formando un complejo con la o-dianisidina, a Fe(III). El complejo Fe(III)-o-dianisidina interacciona con naranja de xilenol para formar otro complejo, en este caso de color morado, que se puede cuantificar a 560 nm. El patrón es peróxido de hidrógeno.



Los métodos del ABTS y de la reacción de Fenton también se pueden utilizar para la evaluación del poder oxidante de la muestra, si el fundamento es la reacción por sí misma en lugar de la inhibición (141).

7.3. Cociente oxidación/reducción

Se ha aceptado como parámetro de cuantificación del estrés oxidativo el cociente entre el poder oxidante y el poder antioxidante. Este cociente se llama índice de estrés oxidativo (Oxidative Stress Index OSI). El poder oxidante (Total Oxidant Status TOS) se cuantificó mediante la oxidación de Fe(II) y el complejo formado con naranja de xilenol, mientras que el poder antioxidante (Total Antioxidant Capacity TAC) se cuantificó por el método de inhibición de la formación del radical dianisidil· con el Trolox como patrón (142).

De esta manera, el Índice de Estrés Oxidativo es:

$$\text{OSI} = ((\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}) / (\text{TAC}, \mu\text{mol equivalentes Trolox/L}) * 100).$$

OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta tesis doctoral se enmarcan dentro de los objetivos generales del laboratorio de Investigación en Litiasis Renal de la Universidad de las Islas Baleares (UIB), de establecer las bases moleculares e identificar los factores etiológicos implicados en la formación de los distintos tipos de cálculos renales, con el fin de poder desarrollar medidas adecuadas para evitar su formación.

En esta tesis se estudiarán específicamente aquellos factores que relacionan el estrés oxidativo con la litiasis renal. Así, en el primer capítulo se evalúa el estado oxidativo en pacientes con estado de ansiedad y de depresión elevados mediante la medida del potencial redox de la orina, y se correlacionaron los resultados obtenidos con los resultantes de la aplicación de tests validados encargados de cuantificar dichos estados de ansiedad y depresión. Para ello, se pondrán a punto diferentes metodologías para la detección de los niveles de oxidantes y de antioxidantes en orina, con el fin de utilizarlos como marcadores del estrés oxidativo.

En el segundo capítulo se efectúa un estudio del papel del estrés oxidativo en la formación de cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) papilar. La metodología desarrollada se aplicará en muestras de orina de individuos sanos, de individuos con cálculos de COM papilares y de individuos con cálculos de oxalato cálcico dihidrato (COD), y de esta manera podrán establecerse las diferencias existentes ante los tres grupos, con el fin de determinar la relación entre la capacidad redox de la orina y el desarrollo de este tipo de litiasis.

En la primera parte del tercer capítulo se determina el efecto que puede tener la administración de polifenoles, compuestos antioxidantes, en la formación y

posterior desarrollo de cálculos renales de COM papilares. Dichos antioxidantes podrían combatir el estrés oxidativo que provoca lesiones que se producen en la papila renal, las cuales inducen la cristalización del COM. Por este motivo, se puede plantear el uso de una terapia a base de alimentos antioxidantes para la prevención de este tipo de cálculos renales. Este estudio se realizará con animales, concretamente con ratas de la especie Wistar. Para llevar a cabo esta investigación, se administrarán antioxidantes en el agua de bebida de los animales, y posteriormente se inducirá la cristalización de COM. De esta manera, se podrá determinar si los antioxidantes tienen efecto preventivo sobre este tipo concreto de litiasis renal.

Finalmente, en la segunda parte del tercer capítulo se evalúa el efecto de los polifenoles presentes en un alimento sobre el potencial redox urinario, parámetro utilizado para valorar el estado oxidativo de un individuo a través de la orina. Así se determinará el efecto del consumo de este producto sobre el estrés oxidativo, para establecer si su poder antioxidante podría ser útil en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y sobretodo su posible acción antilitiásica frente a los cálculos de COM papilar.

CAPÍTULO 1:

ESTRÉS OXIDATIVO, ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

1.1. MEDIDA DE LA ACCIÓN ANTIOXIDANTE

1.1.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

1.1.1.1. Reactivos

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (disolución patrón) (M= 278,01 g/mol) (0,2780g en 1 l)

-Glicina 1 M pH 2,7

- o-fenantrolina 1 g/l (5,55 mM)

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M= 270,30 g/mol) 20 mM (0,5406 g en 100 ml)

Reactivo → 2 ml FeCl_3 + 4 ml glicina + 4 ml o-fenantrolina

1.1.1.2. Aparato

- Espectrofotómetro Shimadzu 1800.

1.1.1.3. Muestra

El tipo de muestra a analizar es orina diluida 100 veces y 200 veces.

1.1.1.4. Procedimiento

- Poner 2,5 ml muestra/patrón en cubeta

- Añadir 1 ml de reactivo

- Mezclar y medir la Absorbancia ($\lambda=510$ nm) a los 60 min a T amb.

1.1.1.5. Calibrado

Para la recta patrón, las concentraciones finales de Fe(II) usados serán 0, 50, 100, 150 y 200 μ M. El calibrado es lineal en ese rango.

1.2. MEDIDA DE LA ACCIÓN OXIDANTE

1.2.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

1.2.1.1. Reactivos

- Preparación del Reactivo 1:

Se pesan 114 mg de naranja de xilenol, 8,18 g NaCl y se disuelven en 900 ml H₂SO₄ 25 mM. Finalmente se añaden 100 ml de glicerol. Las concentraciones finales son 150 μ M de naranja de xilenol, 140 μ M de NaCl y 1,35 M de glicerol. Esta disolución es estable 6 meses a 4°C.

- Preparación del Reactivo 2:

Se disuelven 0,1960 g de sulfato amónico ferroso en 50 ml H₂SO₄ 25 mM (10 mM Fe²⁺).

Se disuelven 0,1585 g de o-dianisidina en 25 ml H₂SO₄ 25mM (20 mM o-dianisidina).

Mezclar volúmenes iguales de las dos disoluciones anteriores para obtener una disolución final de o-dianisidina 10 mM y de Fe^{2+} 5 mM (estable 15 días a 4°C)

- Sustancia usada como patrón oxidante para realizar el calibrado:

H_2O_2 10 mM 1,39 ml (35%) en 1 L de agua (estable 1 mes a 4°C)

1.2.1.2. Aparato

- Espectrofotómetro Shimadzu 1800.

1.2.1.3. Muestra

El tipo de muestra a analizar es orina, sin modificar el pH ni diluir.

1.2.1.4. Procedimiento

- Introducir 0,45 ml de muestra/patrón en la cubeta

- Añadir 2,9 ml de R1 y agitar

- Añadir 0,15 ml de R2 y agitar

- Leer la absorbancia a 560 nm a los 40 minutos.

1.2.1.5. Calibrado

Los resultados se expresan como μmol equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{l}$ ($\mu\text{eq H}_2\text{O}_2/\text{l}$). Las disoluciones patrón de H_2O_2 (0, 25, 50, 100, 200 μM) se preparan diariamente. El calibrado es lineal en ese rango.

1.3. MEDICIÓN DEL POTENCIAL REDOX DE LA ORINA

1.3.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

1.3.1.1. Aparato

- Potenciómetro Crison 52-61 con electrodo combinado de platino (Figura 9)

1.3.1.2. Procedimiento

Se recoge la muestra de orina y se deja reposar aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, hasta que alcance una temperatura de 25-26º C. Finalmente se introduce el electrodo en la muestra y se obtiene el valor del potencial redox.



Fig 9. Potenciómetro Crison 52-61 con electrodo combinado de platino utilizado para medir el potencial redox urinario.

2. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA EN PACIENTES CON ANSIEDAD

Y/O DEPRESIÓN

2.1. VOLUNTARIOS

El Centro de Psicología y Neurología (CLONUS) seleccionó a 63 voluntarios (28 hombres y 35 mujeres) de edades comprendidas entre 20 y 65 años, ninguno de los cuales padecía otro tipo de patología o problema de salud significativo. Los criterios de inclusión y exclusión para participar en el estudio fueron los siguientes:

- Se incluyeron pacientes diagnosticados de ansiedad, trastorno depresivo, conflictos maritales o problemas de comportamiento. Pacientes con trastornos mentales severos (ej. esquizofrenia, depresión mayor, trastorno bipolar, trastorno obsesivo compulsivo) fueron excluidos.
- Los participantes que consumían suplementos de antioxidantes o de ácidos grasos polinsaturados omega-3 fueron excluidos.
- Los participantes con problemas de salud graves (ej. cáncer, cardiopatías serias), y que necesitaban tratamiento farmacológico crónico fueron excluidos.
- Los participantes con adicción al alcohol o a las drogas fueron excluidos.

Ninguno de los participantes se encontraba bajo tratamiento farmacológico durante la recogida de la orina y la dieta no era restrictiva en el momento de la recogida de la orina.

Todos ellos entregaron el consentimiento informado por escrito y la institución encargada de revisar y aprobar el estudio fue el Comité Ético de las Islas Baleares (nº IB 1912/12 PI).

2.2. CUESTIONARIOS DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

Se utilizaron dos cuestionarios validados para evaluar el estado de ansiedad y depresión. El cuestionario State-Trait Anxiety Inventory (STAI) se utilizó para evaluar el estado de ansiedad (A/E), en el cual, un valor $A/E < 22,00$ se consideró un valor normal de ansiedad, mientras que valores de $A/E \geq 22,00$ se consideraron de estado elevado de ansiedad. El cuestionario Beck Depression Inventory (BDI) fue el que se utilizó para establecer la depresión, en el cual valores $BDI < 10,00$ se consideraron normales, y para valores de $BDI \geq 10,00$ se consideró que la persona se encontraba en estado de depresión ligera-moderada.

2.3. MEDIDA DEL POTENCIAL REDOX URINARIO

El método utilizado para el análisis del estado oxidativo de los voluntarios incluidos en el estudio fue la determinación del potencial redox urinario.

Todos los sujetos seguían una dieta libre y ninguno de ellos recibió tratamiento farmacológico en el momento de recoger la orina. El tipo de muestra recogida fue la orina de dos horas recogida en ayunas, después de pasar la noche y descartando la primera micción de la mañana. Se seleccionó esta orina porque era la que

representaba mejor el potencial redox urinario basal, ya que era la menos afectada por la dieta. Una vez obtenida la muestra a primera hora de la mañana, se dejó enfriar a 25° C y finalmente se midió el potencial redox de la muestra.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versión 11.0 para Windows, Chicago, IL, EUA). El test de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para evaluar la normalidad de las variables. Las diferencias entre grupos se establecieron utilizando el test de Student paramétrico para variables cuantitativas con distribución normal, el test Mann-Whitney U no paramétrico para variables cuantitativas con distribución no normal y el test Chi-cuadrado para variables cualitativas. En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. ADAPTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN

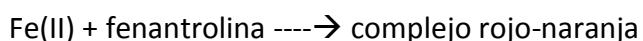
1.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

1.1.1. ANTECEDENTES

Hasta este momento, las reacciones redox se han utilizado normalmente en el reconocimiento de iones, (134). Una de las reacciones más frecuentes es el paso de Fe(III) a Fe(II) y el reconocimiento de este último al formar un complejo con la fenantrolina (135).

1.1.2. FUNDAMENTO

Este método se ha adaptado con la idea de evaluar la capacidad antioxidante de una muestra biológica, en este caso de la orina, basándose en la capacidad de los antioxidantes de reducir el Fe(III) a Fe(II). La formación de un complejo coloreado de Fe(II) permite su cuantificación. La reacción química es la siguiente:



Para ello se necesitan los siguientes reactivos:

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM (disolución patrón) (MW=278,01 g/mol) (0,2780 g en 1 L)
- Acetato sódico 1 M

- o-fenantrolina 1 g/L (5,55 M)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MW=270,30 g/mol) 20 mM (0,5406 g en 100 ml)

El reactivo final se forma al mezclar 2 ml de la disolución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4 ml de acetato y 4 ml de o-fenantrolina, siguiendo este mismo orden.

Para la medición en la cubeta se introduce:

- 2,5 ml de muestra/patrón en cubeta
- 1 ml de reactivo final

Mezclar y medir absorbancia a 510 nm a los 10 min (T amb)

1.1.3. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ADECUADAS AL MEDIO ORINA

El primer paso para una determinación analítica es la elaboración de un calibrado mediante patrones. Para ello se usó como reactivo una mezcla de 2 ml de agua, 4 ml de acetato (utilizado como tampón) y 4 ml de disolución de fenantrolina, para confirmar que la fenantrolina es un indicador adecuado para la detección de Fe(II) en esas condiciones. El resultado obtenido está expuesto en la tabla 1 y la figura 10, donde se aprecia la recta de calibrado con un índice de correlación superior a 0,99.

TABLA 1. Valores de absorbancia ($\lambda=510$ nm) obtenidos para los distintos patrones de Fe(II).

Conc. Fe^{2+} (μM)	Abs.
0	0
50	0,455
100	0,920
150	1,350

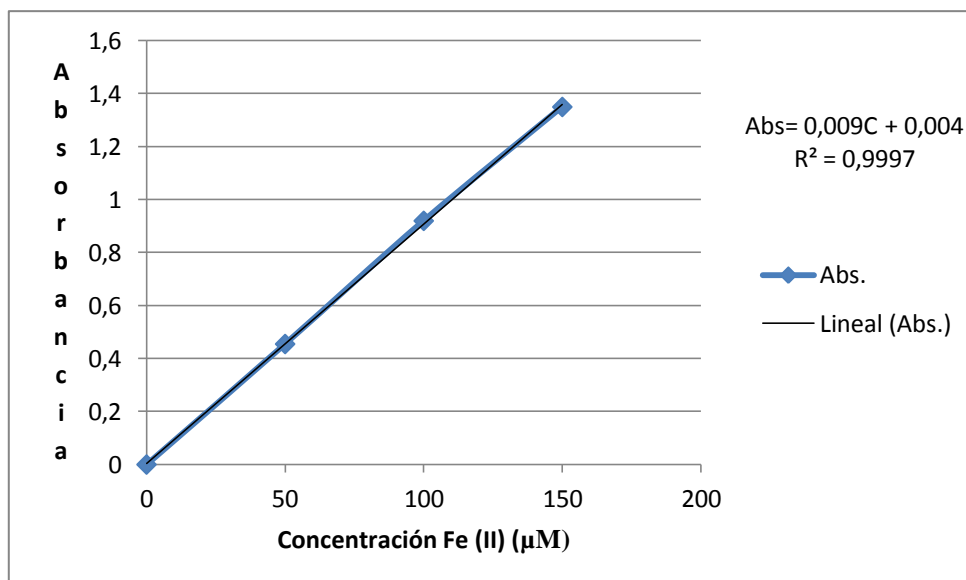


Fig 10. Recta de calibrado obtenida con patrones de Fe(II).

A continuación, se realizó el mismo calibrado pero en lugar de 2 ml de agua se tomaron 2 ml de una disolución de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM, para que existiera un exceso de iones Fe^{3+} en el medio, y así posibilitar la reacción de reducción. Además, se cambió la disolución de Fe^{2+} patrón, ya que el sulfato ferroso heptahidratado era muy inestable, tanto a T_{amb} como a $4^\circ C$, así que se utilizó sulfato amónico ferroso hexahidratado. No obstante, esta otra disolución era igual de inestable que la anterior y al obtener resultados semejantes con ambas, se comprobó que se podía utilizar cualquiera de las dos, teniendo en cuenta su baja estabilidad. El resultado se puede observar en la tabla 2 y en la figura 11. Al contrario de lo que sucedía en la primera experiencia, en este caso, en presencia de Fe^{3+} , la ordenada en el origen no fue 0, debida a la formación espontánea de Fe^{2+} en la disolución de $FeCl_3$ por contacto con el aire.

TABLA 2. Valores de absorbancia ($\lambda= 510 \text{ nm}$) obtenidos para los patrones de Fe(II) en presencia de Fe(III).

Conc. Fe ²⁺ (μM)	Abs.
0	0,238
50	0,555
100	0,976
150	1,329

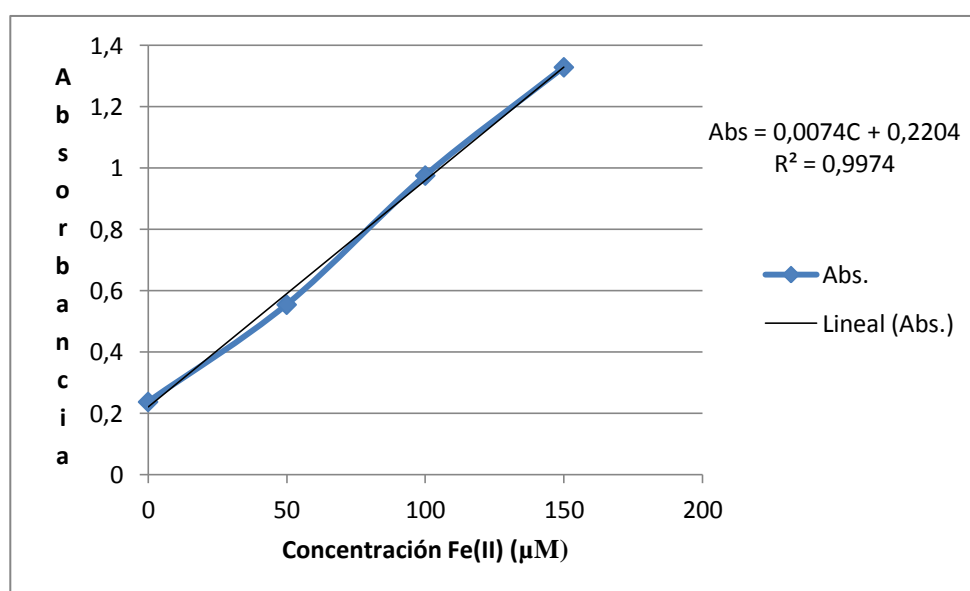


Fig 11. Calibrado de patrones en presencia de Fe³⁺.

1.1.3.1. Efecto de compuestos antioxidantes

En el siguiente paso se estudió el efecto de dos compuestos antioxidantes, como son el ácido ascórbico y el ácido úrico, a distintas concentraciones, exponiéndose los resultados en las tablas 3, 4 y 5 y en las figuras 12, 13 y 14.

TABLA 3. Valores de absorbancia ($\lambda=510$ nm) obtenidos para distintas concentraciones de ácido úrico a $t=10$ min.

Conc. Ácido Úrico (μM)	Abs.
0	0,230
50	0,677
100	1,141
150	1,482
200	1,750

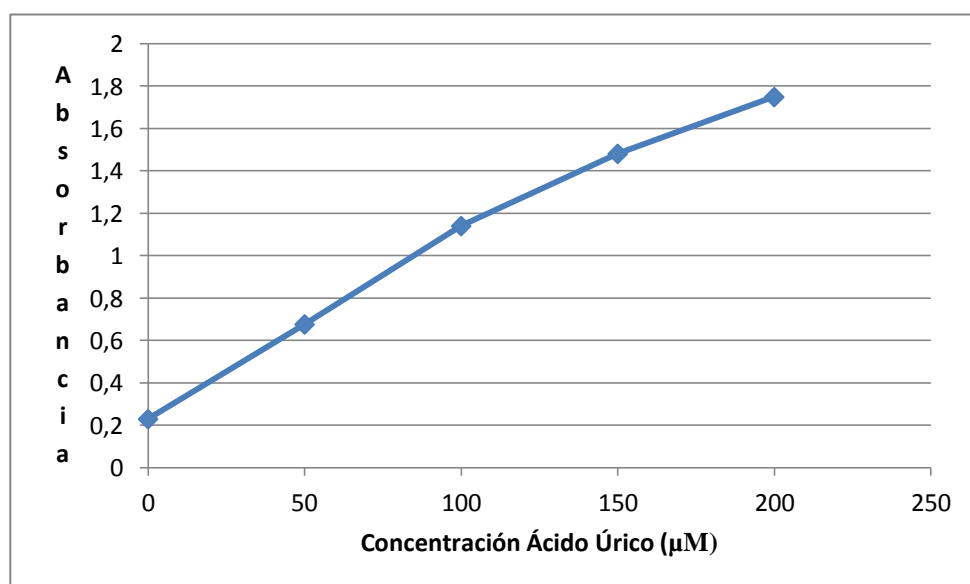


Fig 12. Efecto del ácido úrico a los 10 min.

Hay que resaltar que en presencia de ácido úrico la absorbancia siguió aumentando, y por ese motivo se repitió la lectura pasado un tiempo, reflejado en la tabla 4 y la figura 13. Eso se debe a que la duración de la reacción química era superior a los minutos que se habían propuesto inicialmente.

TABLA 4. Valores de absorbancia ($\lambda=510$ nm) obtenidos para distintas concentraciones de ácido úrico a t=1h 50 min.

Conc. Ácido Úrico (μM)	Abs.
0	0,240
50	0,805
100	1,468
150	2,060
200	2,340

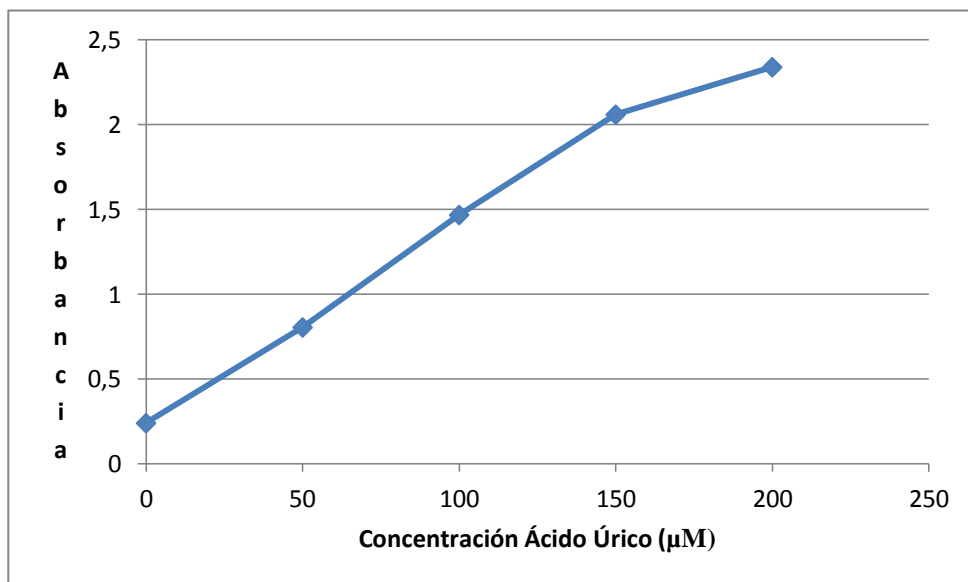


Fig 13. Efecto del ácido úrico al cabo de 1 h 50 min.

Este efecto que tuvo el ácido úrico fue un indicio para pensar que 10 min no era suficiente tiempo de reacción, y que se debería aumentar el tiempo de lectura de absorbancia en la obtención de la recta de calibrado, para confirmar si también aumentarían los valores de absorbancia.

El siguiente antioxidante estudiado fue el ácido ascórbico, el cual aumenta la absorbancia aunque en menor medida que el ácido úrico, como se muestra en la tabla 5 y la figura 14.

TABLA 5. Valores de absorbancia ($\lambda=510$ nm) obtenidos para distintas concentraciones de ácido ascórbico a $t=10$ min.

Conc. Ácido Ascórbico (μM)	Abs.
0	0,234
50	0,550
100	0,880
150	1,358
200	1,680

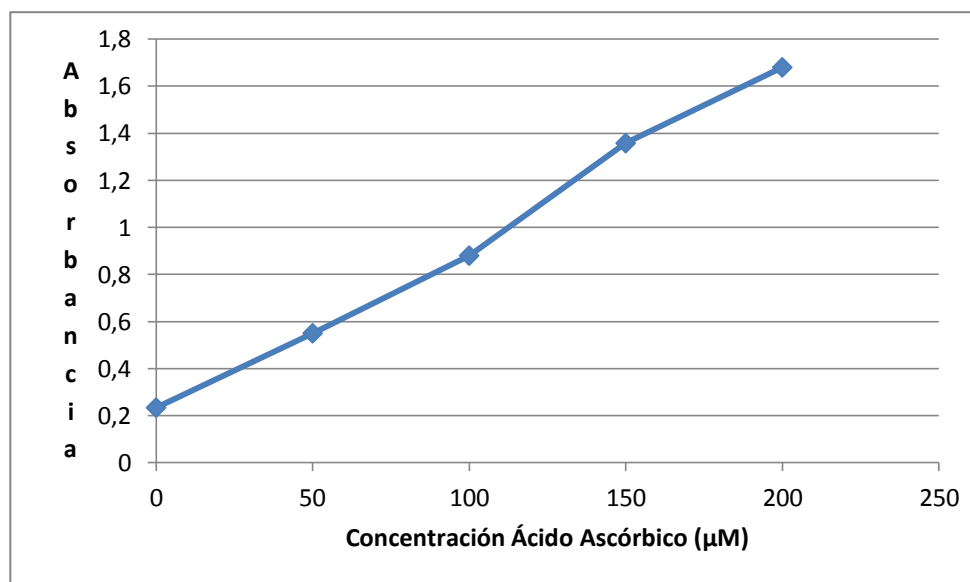


Fig 14. Efecto del ácido ascórbico.

1.1.3.2. Efecto de la orina artificial

En la siguiente etapa se realizaron pruebas con orina artificial (OA). Esta OA se podía preparar con oxalato (compuesto oxidante) o sin él. En este caso, la orina artificial se preparó con oxalato (ver tabla 6), y ajustada a pH 5,5.

TABLA 6. Composición de la orina artificial.

Disolución A	
Sustancia	Concentración (g/L)
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	6,23
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,46
NH ₄ Cl	4,64
KCl	12,13
Disolución B	
Sustancia²	Concentración (g/L)²
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,41
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	5,60
NaCl	13,05
Na ₂ C ₂ O ₄	0,00000122

Para el estudio del efecto de la OA se prepararon varias diluciones: 1; 1/1,25; 1/1,66; 1/2,5; 1/5; 1/10; 1/12,5; 1/16,6; 1/25; 1/50.

A los pocos minutos, las cubetas con OA con diluciones inferiores a 1/2,5 habían precipitado, observando mayor cristalización cuanto menor era la dilución de la OA. En las dos más diluidas no se produjo precipitación, por lo que se pudo medir la absorbancia a 510 nm, y juntamente con el control (solamente agua y el reactivo) dieron una absorbancia aproximada de 0,3 así que quedó descartada la existencia de reacción de reducción debida a los componentes de la OA.

La siguiente etapa consistió en estudiar cuál o cuáles de las sustancias de la OA provocan la precipitación y a qué pH. Al hacerlo, se aprecia que los responsables de formar dicho precipitado eran los fosfatos: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Para ese estudio, la metodología fue la siguiente: utilizar estas dos sustancias ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a la concentración a la que se encuentran en la OA, sin diluir y su dilución 1/10, y ajustando cada una de ellas a distintos pH, empezando desde un pH muy ácido 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5;... y así hasta llegar a pH 12. Se tomaron tres alícuotas de 2,5 ml de cada disolución a cada pH, y se añadió 1 ml del reactivo colorimétrico a cada una de ellas. Dicho reactivo colorimétrico se preparó de tres maneras distintas:

- 2 ml FeCl_3 + 8ml H_2O
- 2 ml FeCl_3 + 4 ml H_2O + 4 ml fenantrolina
- El reactivo completo → 2 ml FeCl_3 + 4 ml acetato + 4 ml fenantrolina.

En el caso del reactivo completo, con el acetato actuando de tampón precipitaron todas las muestras sin diluir a todos los pH estudiados. En cambio, la dilución 1/10 no precipitó en ningún caso, aunque usando OA (con todas las sustancias en disolución), sí lo hizo. De hecho, las otras sustancias de la OA a dilución 1/10 no precipitaron con ninguno de los tres reactivos a cualquier pH.

El $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ precipitó en todos los casos excepto a pH superior a 8,5 y en ausencia de fenantrolina.

Por otro lado, el $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con fenantrolina precipitó a pHs superiores a 6 y en su ausencia lo hizo a $2 < \text{pH} < 7$.

La conclusión que se obtuvo de estos resultados fue que obligatoriamente se debe diluir la orina para el estudio de los antioxidantes, ya que en caso contrario se producirá una precipitación del Fe(III) con fosfatos, dando una absorbancia errónea.

Continuaron las pruebas con OA diluida 1/10 con los tres tipos de reactivos anteriores a distintos pH. Con el reactivo completo y sólo con Fe(III) cristalizó en todos los casos, en cambio con Fe(III) y fenantrolina no precipitó a ningún pH, lo que hacía pensar que se debía cambiar el tampón acetato por otro más adecuado.

A continuación se procedió a añadir a la OA dos compuestos que ya se había comprobado que reducían el Fe (III) a Fe (II) (ácido úrico y ácido ascórbico) en las siguientes concentraciones: OA + ácido ascórbico 100 μ M y OA + ácido úrico 1800 μ M. También se llevó a cabo la dilución 1/10 de cada una.

Los reactivos utilizados fueron FeCl₃, FeCl₃ + fenantrolina y el reactivo completo. Como se esperaba, con el reactivo completo las muestras precipitaron, pero con el FeCl₃ y la fenantrolina pudimos realizar la lectura de la absorbancia a los 10 min de las muestras anteriores (ver tabla 7).

TABLA 7. Valores de absorbancia ($\lambda=510$ nm) obtenidos al mezclar la muestra y el reactivo conteniendo FeCl₃ + fenantrolina.

Muestra	Abs
Agua	0,111
OA (dil 1/10)	0,094
OA + Ác Ascórbico 100 μ M (dil 1/10)	0,142
OA + Ác. Úrico 1800 μ M (dil 1/10)	0,495

Seguidamente se determinó el pH de las mezclas que habían cristalizado y de las que no lo habían hecho, y así poder establecer el pH óptimo para la metodología de antioxidantes. Las mezclas precipitadas estaban a pH 6,14 y las no precipitadas a 2,7. Por esta razón, se decidió que un tampón adecuado sería la glicina 1M a pH 2,7.

1.1.3.3. Obtención de un nuevo calibrado

Al decidir utilizar la glicina 1 M a pH 2,7 como tampón, se obtuvo una nueva recta de calibrado con la que determinar el poder antioxidante de las muestras de orina. Para ello, los nuevos componentes del reactivo fueron:

- 2 ml de FeCl_3 (20 mM)

- 4 ml de glicina (1 M)

-4 ml de fenantrolina (1g/l)

Como en el caso anterior, el volumen de disolución patrón en la cubeta era de 2,5 ml y 1 ml de reactivo. Las concentraciones de los patrones no se modificaron. Las absorbancias se pueden observar en la tabla 8 y la gráfica en la figura 15.

TABLA 8. Valores de absorbancia ($\lambda=510$ nm) obtenidos para los patrones de Fe(II) usando el reactivo con glicina a los 10 min.

Conc. Fe^{2+} (μM)	Abs.
0	0,142
50	0,454
100	0,680
150	0,934

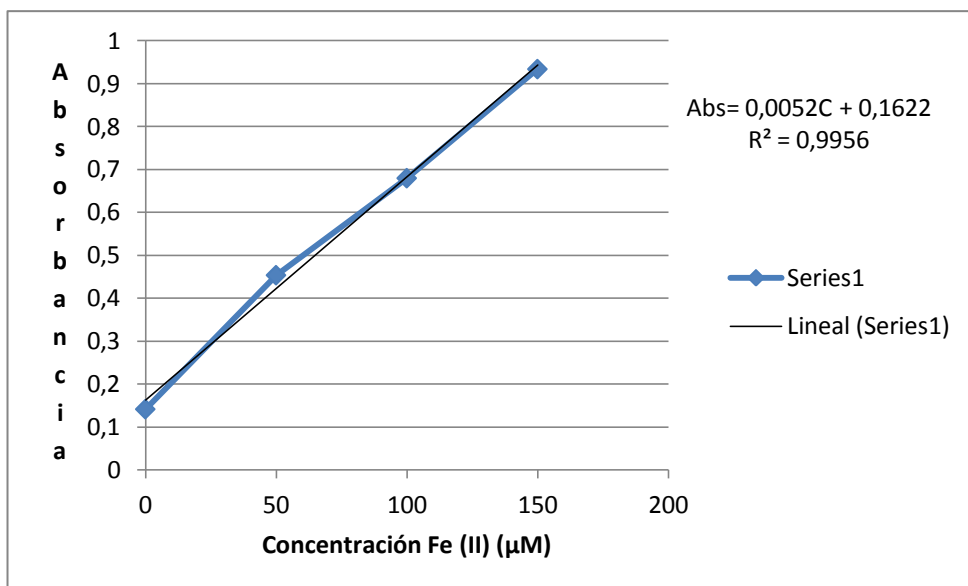


Fig 15. Recta de calibrado de Fe²⁺ usando el reactivo con glicina a los 10 min.

Como ocurrió anteriormente al determinar el efecto del ácido úrico, la absorbancia de los patrones continuó aumentando pasados los 10 min que se habían determinado como tiempo de reacción, así que se continuó con las lecturas de absorbancia hasta su estabilización, cosa que ocurrió a los 60 min. El calibrado final se muestra en la figura 16 y las absorbancias en la tabla 9.

TABLA 9. Valores de absorbancia ($\lambda=510$ nm) obtenidos para los patrones de Fe(II) usando el reactivo con glicina a los 60 min.

Conc. Fe ²⁺ (µM)	Abs.
0	0,16
50	0,529
100	0,843
150	1,198

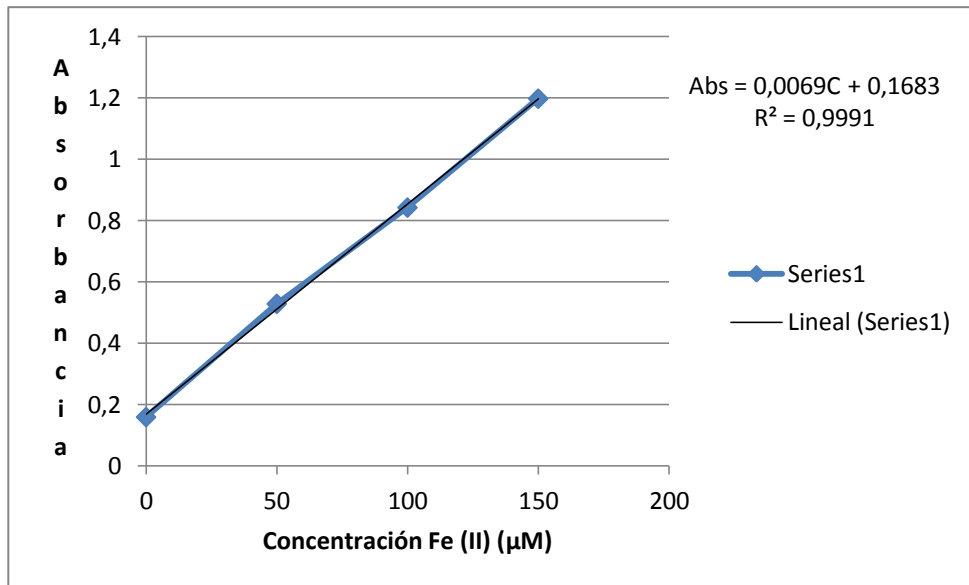


Fig 16. Recta de calibrado de Fe (II) usando el reactivo con glicina a los 60 min.

1.1.3.4. Efecto de la combinación de diversas sustancias

Con el nuevo reactivo, se procedió a estudiar la consecuencia de añadir distintas combinaciones de sustancias para ver cómo afectaba a las absorbancias (ver tabla 10) y por tanto a la reducción de Fe(III). Las mezclas se enumeran a continuación:

- OA sin oxalato
- Ácido Úrico 1800 μM + Ácido Ascórbico 100 μM
- Citrato 1300 μM
- Ácido Úrico 1800 μM + Ácido Ascórbico 100 μM + Oxalato 0,908 μM.

En todos los casos se utilizó la dilución 1/10 y la 1/20.

TABLA 10. Valores de absorbancia obtenidas por la acción de distintas mezclas.

Sustancias	Abs Dil. 1/10	Abs Dil. 1/20
OA	0,137	0,136
AA+AU	0,636	0,616
Citrato	0,265	0,181
AA+ AU+ Ox	0,663	0,617

OA=orina artificial. Ox=oxalato. AA=ác. ascórbico. AU=ác. úrico

Las absorbancias continuaron aumentando hasta 24 h después, pero algunas muestras precipitaban y además el calibrado se estabilizó en 1 hora, así que para mantener las mismas condiciones se estableció que se llevarían a cabo las lecturas de absorbancia en ese tiempo.

1.1.3.5. Estudio con muestras de orina reales

Se analizó el poder antioxidante en distintas condiciones, utilizando orina de personas voluntarias sanas, para determinar cuáles eran las óptimas. Las distintas condiciones estudiadas incluían pH sin modificar y ajustado a 3, diluciones 1/10 hasta 1/80 y en algunos casos 1/100. Se observó que cuando se usaba orina a pH sin modificar, precipitaba muy rápido, especialmente en las muestras menos diluidas, pero a partir de la dilución 1/60 no tenía lugar dicha cristalización. Por este motivo, en este método se decidió usar las muestras más diluidas sin modificar el pH, esto último para no alterar la orina excepto en su concentración.

Las personas que aceptaron proporcionar la muestra presentaban las siguientes características:

Sujeto 1 → Varón 25 años. Dieta proteica.

Sujeto 2 → Varón 29 años

Sujeto 3 → Varón aprox 30 años

Sujeto 4 → Mujer 53 años. Dieta proteica y vegetal equilibrada

Sujeto 5 → Varón 59 años. Dieta proteica

Se registró el tipo de dieta de cada individuo, ya que existen alimentos antioxidantes y oxidantes que pueden afectar de algún modo en la determinación. Las absorbancias obtenidas se muestran en la tabla 11.

TABLA 11. Absorbancias obtenidas usando orinas reales en varias diluciones y siguiendo el protocolo descrito en la sección Material y Métodos.

Sujetos	Dil.1/40	Dil.1/60	Dil.1/80	Dil.1/100
Sujeto 1	1,542	1,172	0,959	
Sujeto 2	1,853	1,708	1,388	
Sujeto 3	1,894	1,498	1,215	
Sujeto 4	1,960	1,946	1,740	1,500
Sujeto 5	1,115	1,123	0,950	0,818

En todos los casos, para las diluciones 1/10 y 1/20 no se pudo leer su absorbancia porque cristalizaron, y para los sujetos 1, 2 y 3 no se realizó la dilución

1/100. Con la ecuación del calibrado $Abs=0,006856C + 0,1683$ se procedió a calcular los $\mu\text{moles Fe (II)/L}$ formados en la reacción de reducción.

TABLA 12. Capacidad antioxidante C.A. (expresada en $\mu\text{mol Fe(II)/L}$) de la orina de los distintos sujetos obtenida a distinta dilución de la orina.

Dilución	C.A. $\mu\text{moles Fe (II)/L}$				
	Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3	Sujeto 4	Sujeto 5
1/40	8014,56	9829,05	10068,26	10453,32	5523,34
1/60	8783,84	13474,62	11636,81	15557,47	8355,02
1/80	9226,37	14232,2	12213,56	18339,56	9121,35
1/100				19423,86	9476,37

En la tabla 12, queda reflejado que los $\mu\text{moles de Fe}$ reducidos son similares aunque no exactamente iguales para las diferentes diluciones excepto la dilución 1/40, y de aquí se pudo deducir que es necesario realizar más de 1 dilución para el estudio de la capacidad antioxidante de la orina.

1.1.3.6. Adición de más patrones en el calibrado

En las muestras anteriores, la mayoría de absorbancias fueron superiores a la absorbancia máxima del calibrado, y por ello se tomó la decisión de utilizar patrones de concentraciones de Fe(II) superiores en el calibrado para mayor seguridad en la obtención de resultados. Las concentraciones utilizadas y sus absorbancias se exponen en la tabla 13 y se representan en la figura 17.

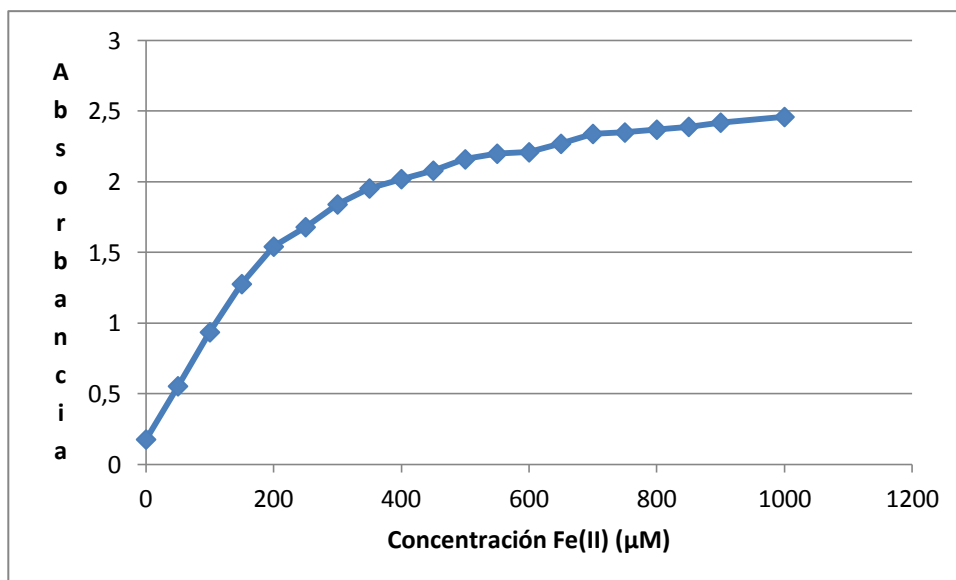


Fig 17. Representación gráfica de la absorbancia obtenida para nuevos patrones de Fe(II) en el rango 0 a 1000 µM.

TABLA 13. Valores de absorbancia obtenidas para patrones de Fe(II) en el rango de 0 a 1000 µM y siguiendo el protocolo descrito en la sección Material y Métodos.

Conc. Fe(II) (µM)	Abs.
0	0,177
50	0,554
100	0,936
150	1,277
200	1,542
250	1,680
300	1,841
350	1,954
400	2,020
450	2,080
500	2,160
550	2,200
600	2,210
650	2,270
700	2,340
750	2,350
800	2,370
850	2,390
900	2,420
1000	2,460

En la gráfica de la figura 17 se observa que el calibrado es lineal hasta 200 μM de Fe^{2+} . Los valores de absorbancia se pueden observar en la tabla 14.

TABLA 14. Nuevos valores de concentración de Fe(II) y su correspondiente absorbancia para el calibrado.

Conc. Fe^{2+} (μM)	Abs
0	0,177
50	0,554
100	0,936
150	1,277
200	1,542

En la figura 18 se observa el calibrado final hasta la concentración 200 μM , con un índice de correlación apropiado, siendo éste el calibrado definitivo.

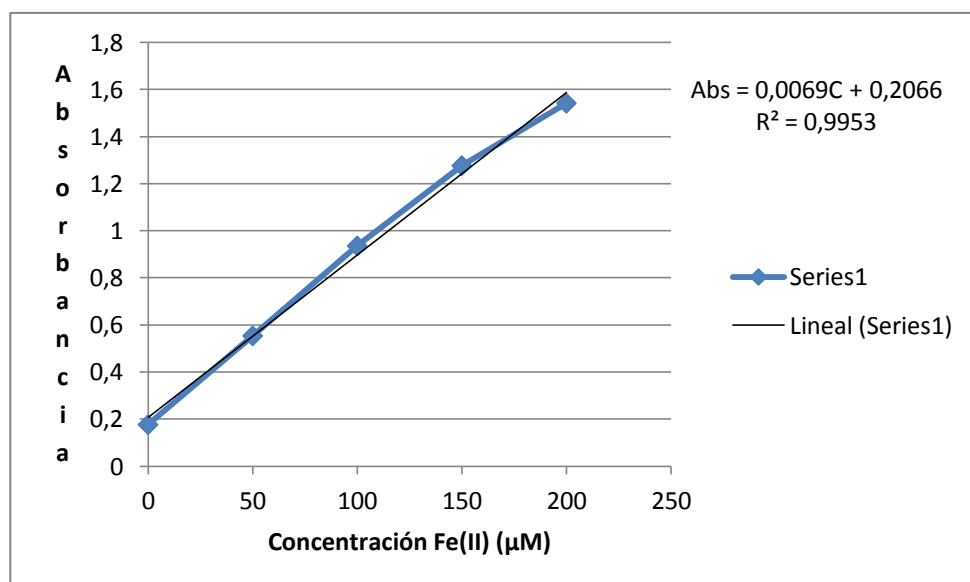


Fig 18. Nueva y definitiva recta de calibrado.

En cuanto al tratamiento de las muestras, a la hora de diluir y basándonos en las absorbancias de la tabla 11, la única dilución que no contenía ninguna muestra cuya absorbancia exceda la máxima del calibrado definitivo (1,542), fue la dilución 1/100, aunque el sujeto 4 estuvo al límite (1,500). Por este motivo, las muestras de orina para la determinación del poder antioxidante se diluirán 100 veces y también se llevará a cabo la dilución 1/200, por si la dilución 1/100 presentara absorbancia superior a la del patrón 200 μM de Fe^{2+} .

1.1.3.7. Conclusiones del método

Las experiencias efectuadas sirvieron para establecer que el método de determinación del poder antioxidante de la orina se llevará a cabo mediante un calibrado con patrones de Fe^{2+} de concentraciones entre 0 y 200 μM (0, 50, 100, 150, 200 μM), mientras que el reactivo contendrá FeCl_3 (20 mM), glicina (1 M) y fenantrolina (1 g/l), en la proporción 1:2:2. Las muestras de orina se diluirán 100 y 200 veces. Tanto de patrones como de muestras se introducirán 2,5 ml en la cubeta y 1 ml de reactivo, se deja reposar 60 minutos a temperatura ambiente para finalmente leer sus absorbancias a 510 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 1800. A partir de la recta de calibrado y la absorbancia de la muestra se calculará el poder antioxidante de la orina, que se expresará en unidades μM de Fe^{2+} .

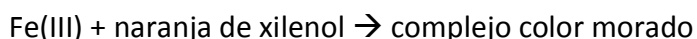
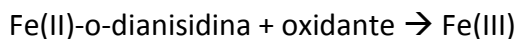
1.2. MEDIDA DE LA ACCIÓN OXIDANTE

1.2.1. ANTECEDENTES

El método para la determinación del poder oxidante fue utilizado anteriormente para el análisis del estrés oxidativo producido por RL en muestras de plasma y suero (141). En su artículo se especifica que su metodología se puede aplicar a otro tipo de muestras como pueden ser las muestras de orina.

1.2.2. FUNDAMENTO

Este test se utilizará para evaluar la capacidad oxidante de la orina, mediante la reacción de oxidación del Fe(II) a Fe(III), de la siguiente manera:



Los reactivos para esta prueba se prepararon como se indica en el apartado de reactivos, excepto el reactivo 2 que se preparó tal y como se indica en la bibliografía (141).

1.2.3. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ADECUADAS AL MEDIO ORINA

1.2.3.1. Obtención del calibrado

El color de los patrones en la cubeta, una vez añadidos los reactivos, va de marrón claro, pasando por marrón oscuro hasta llegar al morado. En la tabla 15 se

muestran las absorbancias de los distintos patrones, y en la figura 19 la representación gráfica, con su ecuación y su índice de correlación (0,9959). Para las muestras reales, la capacidad oxidante (C.O.) se expresará como μmol equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{l}$ ($\mu\text{eq H}_2\text{O}_2/\text{l}$).

TABLA 15. Absorbancias ($\lambda=560$ nm) obtenidas para patrones de distinta concentración de H_2O_2 según la concentración.

Conc. H_2O_2 ($\mu\text{M eq}$)	Abs
0	0,183
25	0,457
50	0,739
100	1,340
200	2,810

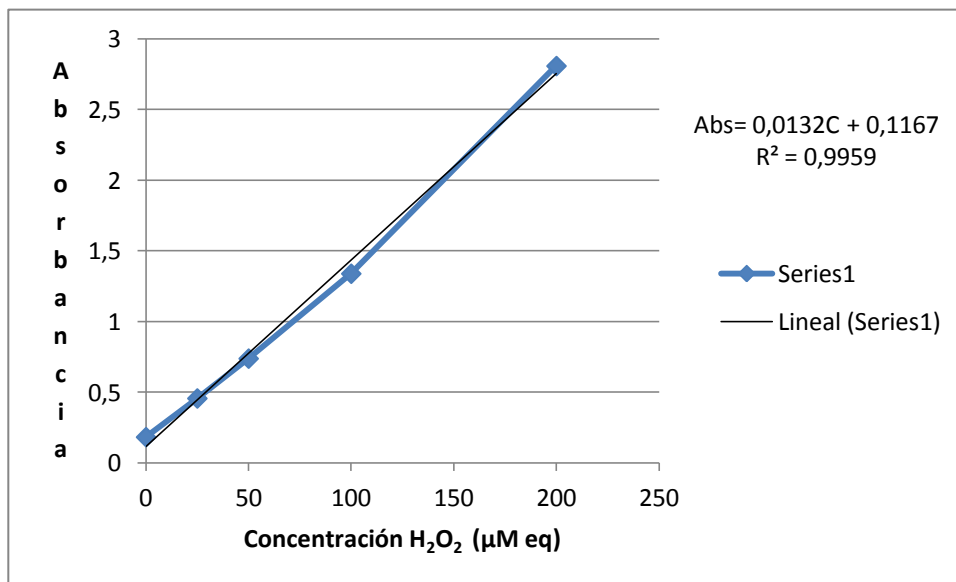


Fig 19. Calibrado para determinar la C.O. usando patrones de H_2O_2 .

1.2.3.2. Efecto de la orina artificial

Se determinó la acción oxidante de la orina artificial (ver tabla 16) sin diluir, y sus diluciones 1/10 y 1/20, para establecer qué efectos podía tener sobre la absorbancia.

TABLA 16. Absorbancias de las distintas diluciones de orina artificial.

OA	Abs
Agua	0,292
OA sin diluir	0,198
Dil. 1/10	0,196
Dil. 1/20	0,197

Como podemos observar en la tabla 16, no existe oxidación por parte de la OA, incluso su absorbancia es inferior a la obtenida con agua. También se evidencia que no es necesaria la dilución de la OA.

1.2.3.3. Estudio de la estabilidad de la o-dianisidina y del calibrado

A pesar de lo que se menciona en la bibliografía (141), la disolución de o-dianisidina y Fe^{2+} no es estable. A los pocos días de su preparación se podía observar que la disolución había precipitado. Al estudiar los dos componentes de la disolución por separado, quedó demostrado que la sustancia causante de dicha cristalización era la o-dianisidina. Por este motivo, se cambió el modo de preparación y conservación de

este reactivo. En primer lugar, se mantendrían los dos reactivos (o-dianisidina y Fe^{2+}) en disoluciones separadas al doble de la concentración inicial (10 mM y 5 mM respectivamente). Así se prepara una disolución de o-dianisidina 20 mM, que debe conservarse a 4º C y una disolución de sulfato amónico ferroso 10 mM, que debe conservarse a temperatura ambiente. Para preparar el reactivo final (R2), se mezclan volúmenes iguales de ambas, y el resultado final es el reactivo 2 con una concentración 10 mM de o-dianisidina y 5 mM de Fe^{2+} , que es el adecuado para el proceso de análisis.

Seguidamente se realizó otro calibrado para comprobar que el nuevo modo de conservación de las disoluciones no afectaba a la recta patrón del método, como se refleja en la tabla 17 y en la figura 20.

TABLA 17. Absorbancias ($\lambda=560$ nm) obtenidas para patrones de H_2O_2 usando R2 recién preparado.

Conc. H_2O_2 ($\mu\text{M eq}$)	Abs
0	0,161
25	0,425
50	0,696
100	1,290
200	2,610

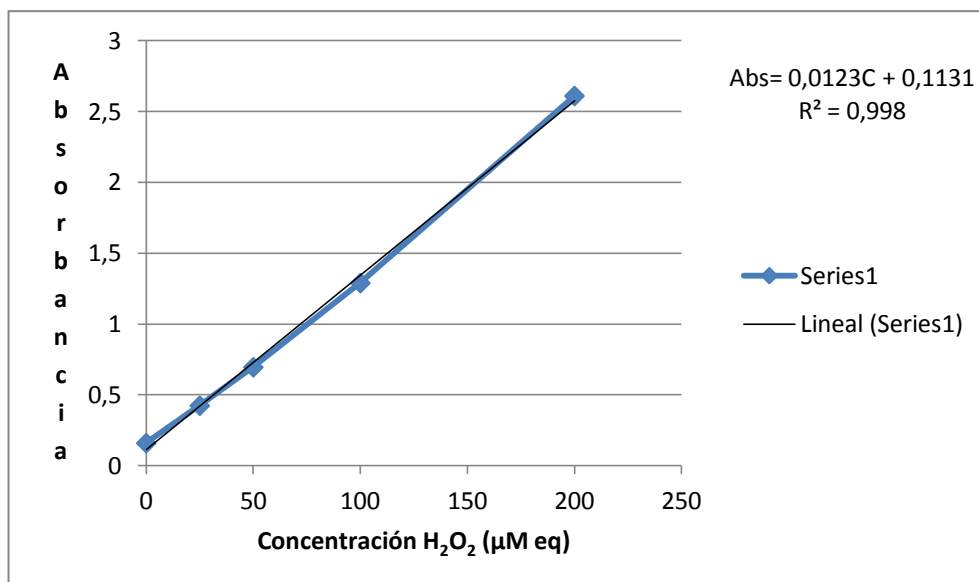


Fig 20. Nueva recta de calibrado obtenida al conservar la dianisidina y el Fe(II).

Con el paso del tiempo, y con el nuevo modo de conservación del reactivo, la disolución de o-dianisidina continuó precipitando. Sin embargo, al agitar la disolución se mantenía el calibrado, como se muestra en la tabla 18 y en la figura 21, hasta pasados 14 días, momento en el que se debía desechar la disolución.

TABLA 18. Absorbancias de las concentraciones de H₂O₂ con la dianisidina redisuelta.

Conc. H ₂ O ₂ (µM eq)	Abs
0	0,174
25	0,457
50	0,751
100	1,362
200	2,720

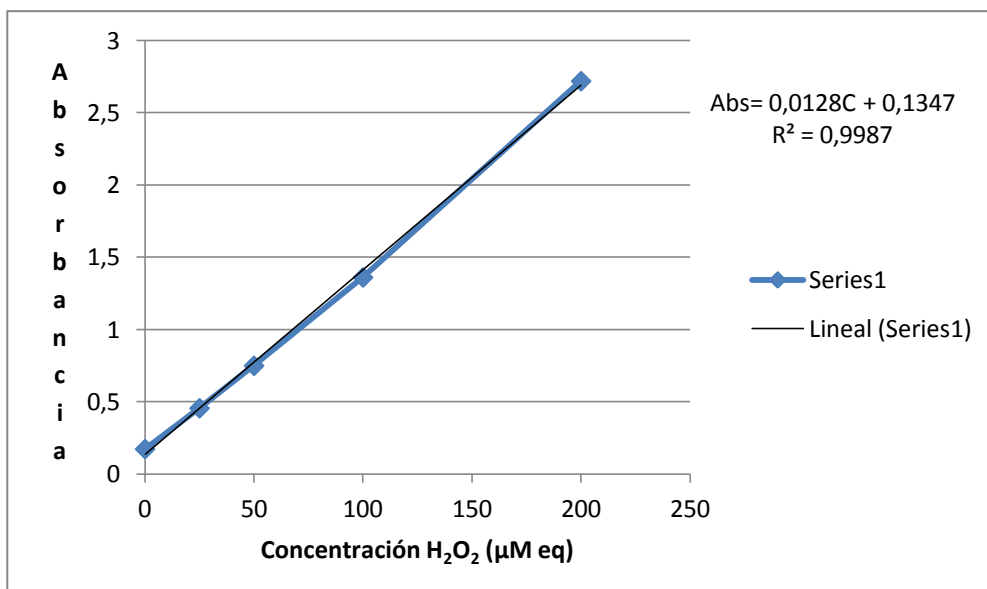


Fig 21. Nuevo calibrado con la dianisidina redisuelta.

1.2.3.4. Estudio con orina real

Una vez conseguido el calibrado se llevaron a cabo pruebas con una muestra de orina real.

Las pruebas se llevaron a cabo con la orina al pH original (6,3) y también ajustado a 3, sin diluir, y con las diluciones 1/10 y 1/20.

TABLA 19. Absorbancias y resultados de las diluciones y distintos pH de una muestra de orina.

Muestras	Abs pH 3	μM eq/L H ₂ O ₂ pH 3	Abs pH 6,3	μM eq/L H ₂ O ₂ pH 6,3
Sin diluir	0,328	16,17	0,406	22,67
Dil. 1/10	0,208	61,67	0,235	84,17
Dil. 1/20	0,178		0,183	

A partir de la ecuación $Abs = 0,0128C + 0,1347$ obtenida en el calibrado, se calcularon los $\mu\text{mol eq H}_2\text{O}_2/\text{L}$. Como podemos apreciar en la tabla 19, los resultados del poder oxidante no coinciden en las diferentes diluciones, lo que indica que el método pierde sensibilidad al diluir la muestra y que se ve alterado al ajustar el pH. Además, no se pudo calcular el resultado de la dilución 1/20 porque su absorbancia era inferior a la ordenada en el origen de la recta patrón. El protocolo ideal es utilizar las muestras de orina sin diluir y a pH sin modificar porque de esta forma la orina no sufre ninguna alteración.

1.2.3.5. Optimización del calibrado

Después de obtener los resultados anteriores, se apreció que el calibrado difería notablemente del que aparecía en la bibliografía, por lo que se determinó mediante absorbancia a 230 nm y usando su coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 81 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), la concentración real del peróxido de hidrógeno usado para preparar los distintos patrones. Se observó que esa concentración era muy inferior a la indicada en el frasco, motivo por el cual se descartó, y se realizó un nuevo calibrado con un frasco de H_2O_2 recientemente adquirido. En la figura 22 y la tabla 20 podemos observar las absorbancias y la representación gráfica. Sin embargo, al ser un peróxido más concentrado, el tiempo se incrementó y pasó a ser necesariamente de 40 minutos.

TABLA 20. Absorbancias ($\lambda=560$ nm) obtenidas para patrones de H_2O_2 usando R2 recién preparado con H_2O_2 reciente.

Conc. H_2O_2 (μM eq)	Abs
0	0,193
25	0,726
50	1,044
100	1,974
200	3,450

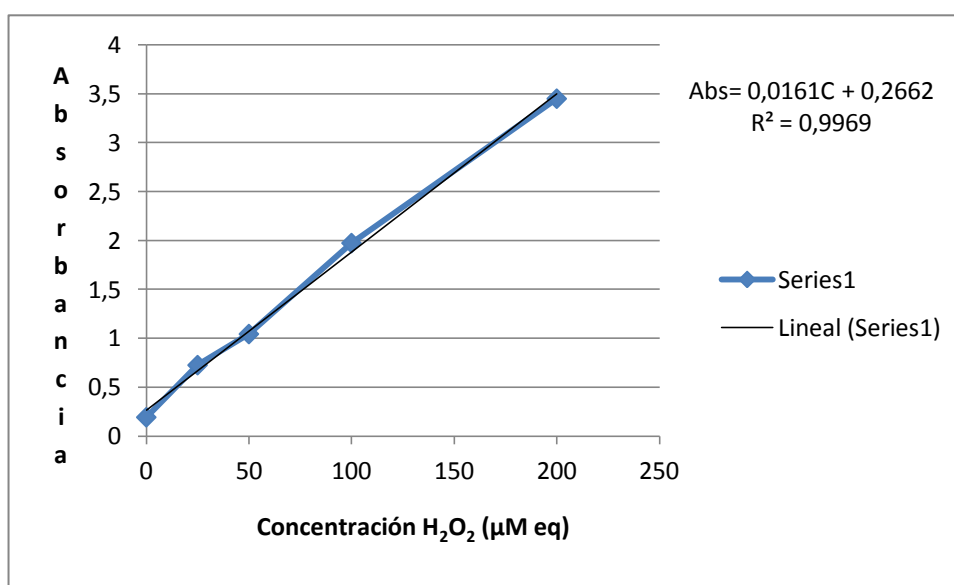


Fig 22. Recta de calibrado obtenida con H_2O_2 reciente.

Con este calibrado hubo que recalcular el resultado de las muestras anteriores (ver tabla 19) a pH 3 y pH sin ajustar. Las absorbancias usadas para el cálculo podían ser las mismas que se habían obtenido anteriormente, ya que las muestras no contienen peróxido de hidrógeno y no se ven modificadas por el hecho de cambiar el patrón de calibrado. Simplemente se debieron recalcular los μmol eq H_2O_2/L con la nueva recta de calibrado. Los nuevos resultados se pueden apreciar en la tabla 21.

TABLA 21. Nuevos resultados de la capacidad oxidante (C.O.) de las muestras con el nuevo calibrado.

Muestras	Abs pH 3	$\mu\text{M eq/L H}_2\text{O}_2$ pH 3	Abs pH 6,3	$\mu\text{M eq/L H}_2\text{O}_2$ pH 6,3
Sin diluir	0,328	3,83	0,406	8,66
Dil. 1/10	0,208		0,235	
Abs= 0,0161C + 0,2662 La absorbancia de la dilución 1/10 es inferior a la ordenada en el origen.				

En este caso, incluso la absorbancia de la dilución 1/10 no llegó a superar la ordenada en el origen, lo que confirmó que las muestras no se deben diluir, y se mantuvo el criterio de no ajustar a pH 3.

1.2.3.6. Conclusión del método

Para la determinación del poder oxidante de la orina, según las experiencias realizadas, se realizará el calibrado usando patrones de peróxido de hidrógeno 0, 25, 50, 100 y 200 μM . Las muestras a determinar no deben sufrir ningún tipo de alteración, ya sea ajustes de pH o dilución, porque el método pierde sensibilidad. El proceso, tanto para patrones como para muestras, consiste en introducir 0,45 ml de muestra o patrón, 2,9 ml de la disolución de naranja de xilenol, 0,15 ml de la disolución combinada de o-dianisidina y Fe(II), dejar reposar 40 minutos a temperatura ambiente, leer la absorbancia a 560 nm y finalmente expresar el resultado en μmol equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{l}$ obtenido a partir de la recta patrón.

1.3. MEDICIÓN DEL POTENCIAL REDOX DE LA ORINA

1.3.1. FUNDAMENTO

Se utilizó un electrodo de platino para la medición directa del potencial redox de disoluciones, en concreto de la orina. Para comprobar que el comportamiento de este electrodo en situaciones parecidas a las de la orina es correcto, se utilizaron algunas disoluciones concretas de oxidantes y reductores y se determinó su potencial redox.

TABLA 22. POTENCIALES DE PRUEBA (mV)

SUSTANCIA	POTENCIAL (mV)
Ácido Úrico 1g/l	88
Ácido Ascórbico 10 mM	220
Peroxidisulfato sódico 1,5 M	954

Se observa en la tabla 22, que a mayor capacidad oxidante, mayor es el potencial redox, y a mayor capacidad reductora, menor es el potencial redox que mide el electrodo

1.3.2. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES EN EL MEDIO ORINA

Para efectuar las lecturas del potencial, lo primero que se debe determinar son las condiciones en las que se deben encontrar las muestras de orina, en este caso la temperatura y la estabilidad de la muestra. Para determinar el tiempo y la

temperatura se obtuvieron muestras de varios sujetos sanos y se procedió a la lectura del potencial en distintos intervalos de tiempo y a distintas temperaturas. Los valores del potencial redox respecto a tiempo y temperatura se muestran en las tablas 23 y 24, y se representan en las figuras 23 y 24.

TABLA 23. PRUEBAS ESTABILIDAD POTENCIAL (mV) EN EL TIEMPO.

Tiempo (min)	Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3
0	-5	0	-5
5	5	5	-4
10	17	7	0
15	20	8	2
20	24	9	4
25	26	10	5
30	26	11	6
35	27	11	7
40	27	11	7
45	28	11	7

TABLA 24. PRUEBAS ESTABILIDAD POTENCIAL (mV) CON LA TEMPERATURA.

Temperatura (°C)	Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3
29,2	17	7	0
27,7	20	8	2
27,0	24	9	4
26,6	26	10	5
26,5	26	11	6
26,2	27	11	7
26,1	27	11	7
26,0	28	11	7

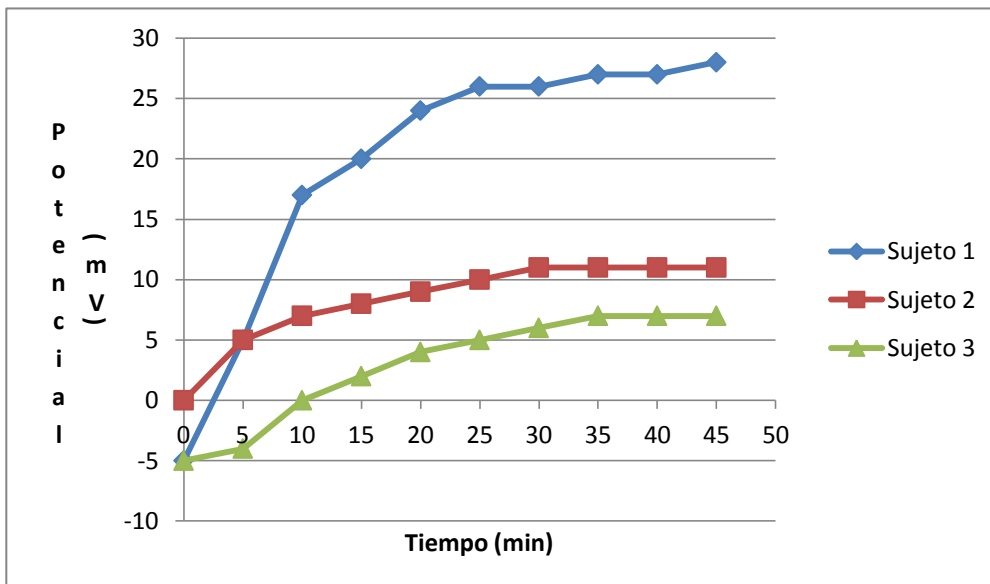


Fig 23. Representación de la variación del potencial redox frente al tiempo.

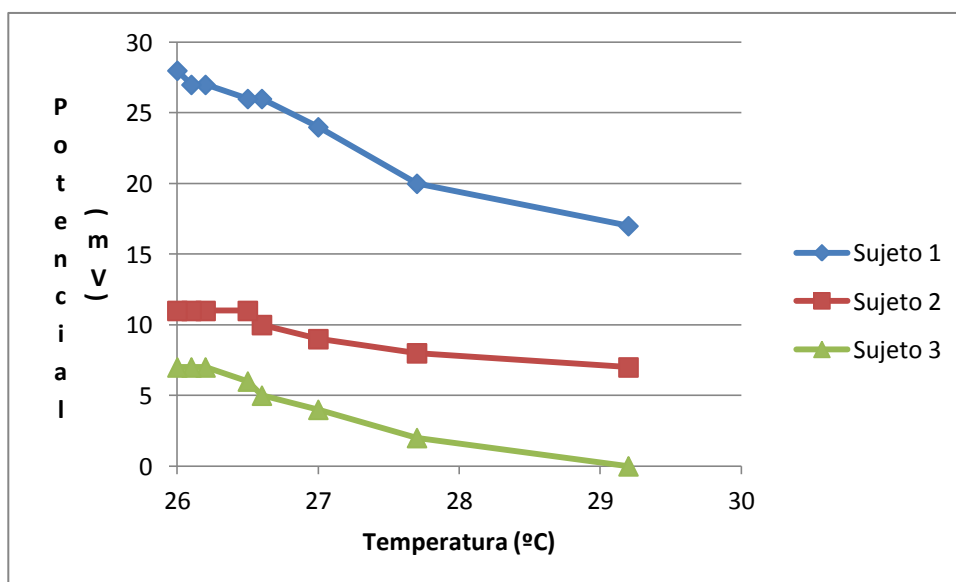


Fig 24. Representación de la variación del potencial redox frente a la temperatura.

La conclusión que se obtuvo es que se debe dejar reposar durante unos treinta minutos como mínimo a temperatura ambiente, mientras que la temperatura de la muestra debe encontrarse entre 25 y 26 ° C, valores que alcanza al reposar los treinta minutos, sin necesidad de refrigerar.

1.3.2.1. Estudio con muestras de orina reales

Una vez establecido el protocolo se realizaron más pruebas con otros individuos, teniendo en cuenta si habían ingerido algún alimento antioxidante o bien alguna medicación unas horas antes, con el fin de observar cómo afectaba al potencial de la orina. También se tomó en distintos momentos del día para ver si también afectaba al potencial. Los resultados se pueden observar en la tabla 25.

TABLA 25. Potencial redox (mV) de la orina para varios individuos, recogida en distintos momentos del día.

Fecha	Momento del día	Sujeto 1		Sujeto 2		Sujeto 3	
		Alimentos especiales	Potencial (mV)	Alimentos especiales	Potencial (mV)	Alimentos especiales	Potencial (mV)
27/12/2011	mañana			Ninguno	56		
27/12/2011	tarde	Ninguno	0	Ninguno	58		
28/12/2011	mañana	Ninguno	25	Ninguno	53		
3/1/2012	mañana	Ninguno	51	Ninguno	50		
3/1/2012	tarde	zumo naranja	-35				
4/1/2012	mañana					Ninguno	47
4/1/2012	tarde	espárragos	-67				

1.4. VALORACIÓN GLOBAL DE LA CAPACIDAD REDOX DE UNA ORINA

El estudio definitivo que se realizó con las muestras al llegar al laboratorio incluyó las tres determinaciones mencionadas anteriormente, de forma que se obtuvo el valor del potencial redox por un lado y las capacidades antioxidante ($\mu\text{M Fe(II)}$) y oxidante ($\mu\text{M eq H}_2\text{O}_2$) por otro.

1.4.1. Conservación de la muestra

Con el fin de averiguar si la muestra se debía analizar en el momento de su obtención o si en cambio se podía conservar a 4°C , se recogieron muestras de algunos voluntarios, se realizaron las tres determinaciones (potencial, poder oxidante y poder antioxidante), y posteriormente se conservaron dichas muestras entre 4 y 8°C . Al cabo de 24 horas se repitieron las mismas determinaciones que el día anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 26 y las figuras 25, 26 y 27, y confirmaron que no es posible conservar la muestra hasta el día siguiente, existiendo grandes diferencias en el potencial redox y también en algunos casos en la capacidad oxidante.

TABLA 26. Comparación de resultados de seis muestras analizadas al momento y después de 24 horas a 4º C.

Sujeto	Medidas a 30 min			Medidas a 24 h		
	Potencial (mV)	C.A. ($\mu\text{M Fe(II)}$)	C.O. ($\mu\text{M eq H}_2\text{O}_2$)	Potencial (mV)	C.A. ($\mu\text{M Fe(II)}$)	C.O. ($\mu\text{M eq H}_2\text{O}_2$)
1	39	11947,58	8,47	71	9247,03	8,29
2	13	15922,39	1,72	45	15343,18	1,66
3	-4	24367,22	0,00	13	23035,04	0,00
4	31	2745,44	0,00	61	2825,08	0,00
5	76	1694,92	0,00	101	1982,19	0,00
6	31	12395,87	1,00	49	10823,04	13,76

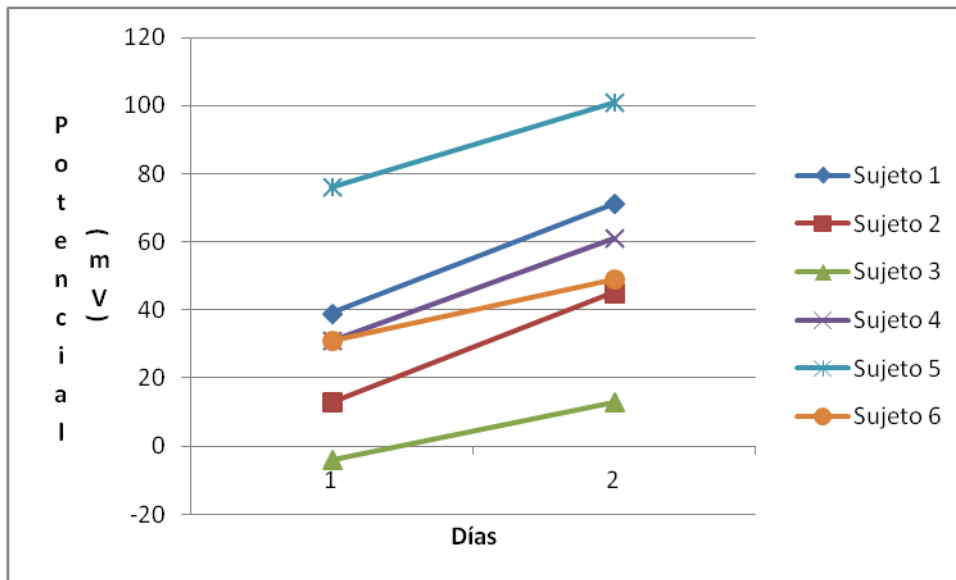


Fig 25. Variación del potencial redox de la orina en voluntarios entre 30 min después de la recogida de la muestra y después de 24 horas a 4º C.

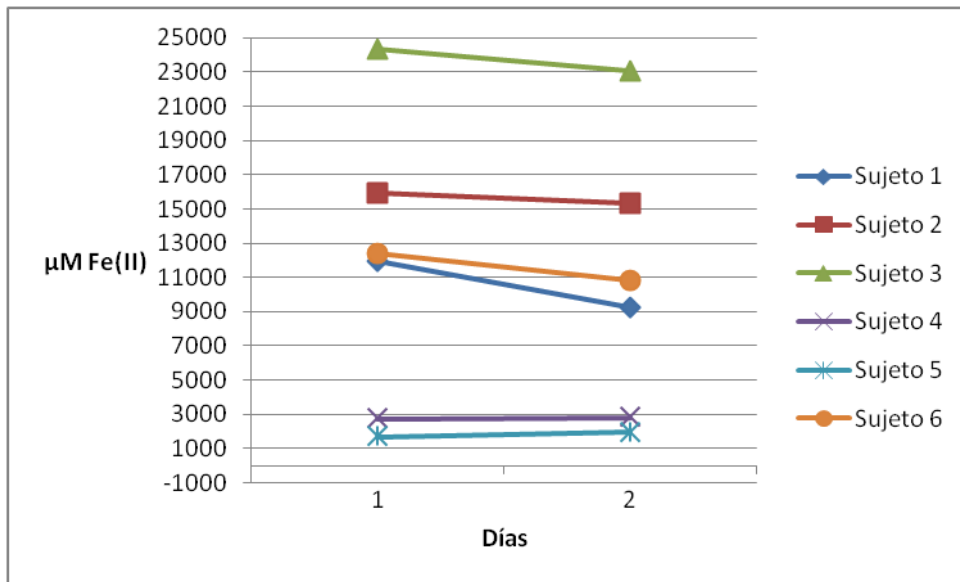


Fig 26. Variación de la capacidad antioxidante de la orina en voluntarios entre 30 min después de la recogida de la muestra y después de 24 horas a 4º C.

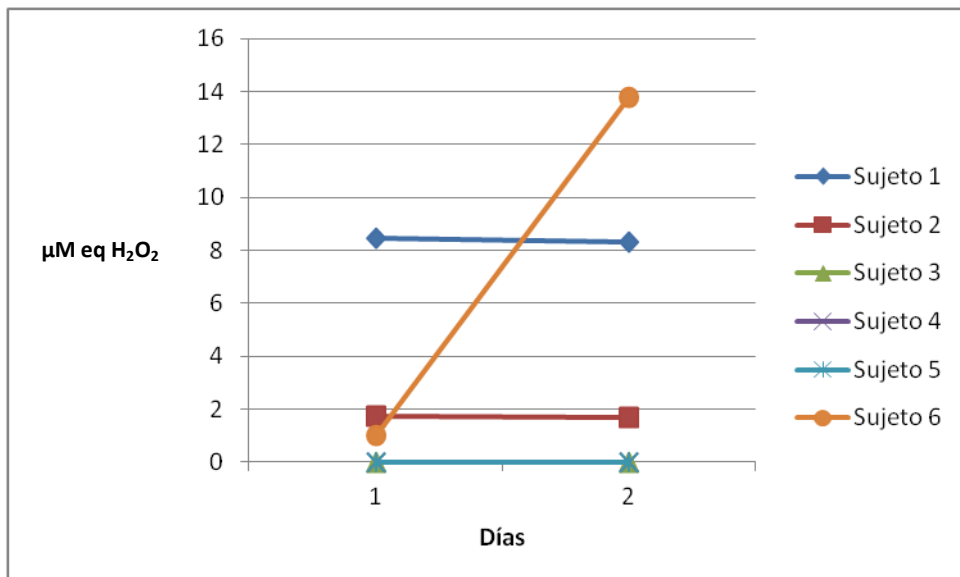


Fig 27. Variación de la capacidad oxidante de la orina en voluntarios entre 30 min después de la recogida de la muestra y después de 24 horas a 4º C.

1.4.2. Conclusión

Las figuras 25-27 reflejan que el potencial redox y la capacidad oxidante experimentaron variaciones respecto al momento de recogida de la muestra al conservar la muestra 24 horas. Ya se sabe por experiencias anteriores que no se puede conservar una muestra de orina durante 24 horas a temperatura ambiente porque es susceptible de sufrir infecciones, sobre todo a pH superior a 6.

Por esta razón, las determinaciones de potencial redox, capacidad oxidante y capacidad antioxidante se deben realizar el mismo día en el que se obtiene la muestra.

1.5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

Para confirmar que un método de determinación es adecuado, es necesario compararlo con otro tipo de metodología validada anteriormente para determinar los mismos parámetros, observar la tendencia que siguen y si existe una correlación entre ambos.

Para ello, se analizaron muestras de orina al azar de personas voluntarias mediante los tres métodos anteriores (tabla 27), sobre todo para determinar la fiabilidad del potencial redox, ya que nunca se había utilizado, mientras que los otros dos simplemente se han adaptado al medio orina.

TABLA 27. RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES EN VOLUNTARIOS.

Muestra	Potencial (mV)	Capacidad Oxidante ($\mu\text{M eq H}_2\text{O}_2$)	Capacidad antioxidante (mM Fe(III))
1	26,0	12,1	14,39473
2	-6,0	11,5	16,86649
3	23,0	0,0	14,98407
4	40,0	7,9	19,79149
5	-9,0	18,4	14,91602
6	-4,0	5,6	10,97017
7	10,0	10,3	17,48625
8	44,0	0,0	12,14307
9	38,0	1,8	13,27975
10	0,0	13,4	18,54329
11	-17,0	8,4	21,21054
12	20,0	10,8	20,63133
13	16,0	11,8	17,42109
14	60,0	22,4	9,68433
15	20,0	9,0	19,27541
16	26,0	9,1	17,85114
17	39,0	8,5	11,94758
18	45,0	1,7	15,92239
19	-4,0	0,0	24,36722
20	-5,0	0,0	11,86441
21	31,0	1,0	12,39587
22	-19,0	5,6	11,6435
23	69,0	6,9	11,51317
24	56,0	0,2	9,35563
25	58,0	19,5	15,35042
26	18,0	4,6	14,95222
27	94,0	22,8	13,7576
28	94,0	7,6	7,89314
29	95,0	0,0	15,77759
30	51,0	1,2	8,56647
31	68,0	7,6	10,94845
32	47,0	3,2	13,48248
33	61,0	33,9	13,26528
34	39,0	2,5	13,34492
35	40,0	0,8	10,30409
36	89,0	8,7	7,67594
37	32,0	6,9	14,00811
38	68,0	2,3	15,33594
39	43,0	7,9	15,15494
40	77,0	13,8	13,91689
41	78,0	6,3	7,01709
42	-1,0	0,0	28,16102
43	39,0	0,0	17,32986
44	54,0	4,1	11,47987
45	37,0	3,2	11,19992
46	59,0	0,4	10,32749
47	22,0	15,3	11,51968
48	2,0	0,0	16,28124
49	42,0	14,7	13,46076

La tendencia que deberían haber seguido los métodos para ser aceptados es a mayor capacidad antioxidante, menor capacidad oxidante y menor potencial redox y viceversa.

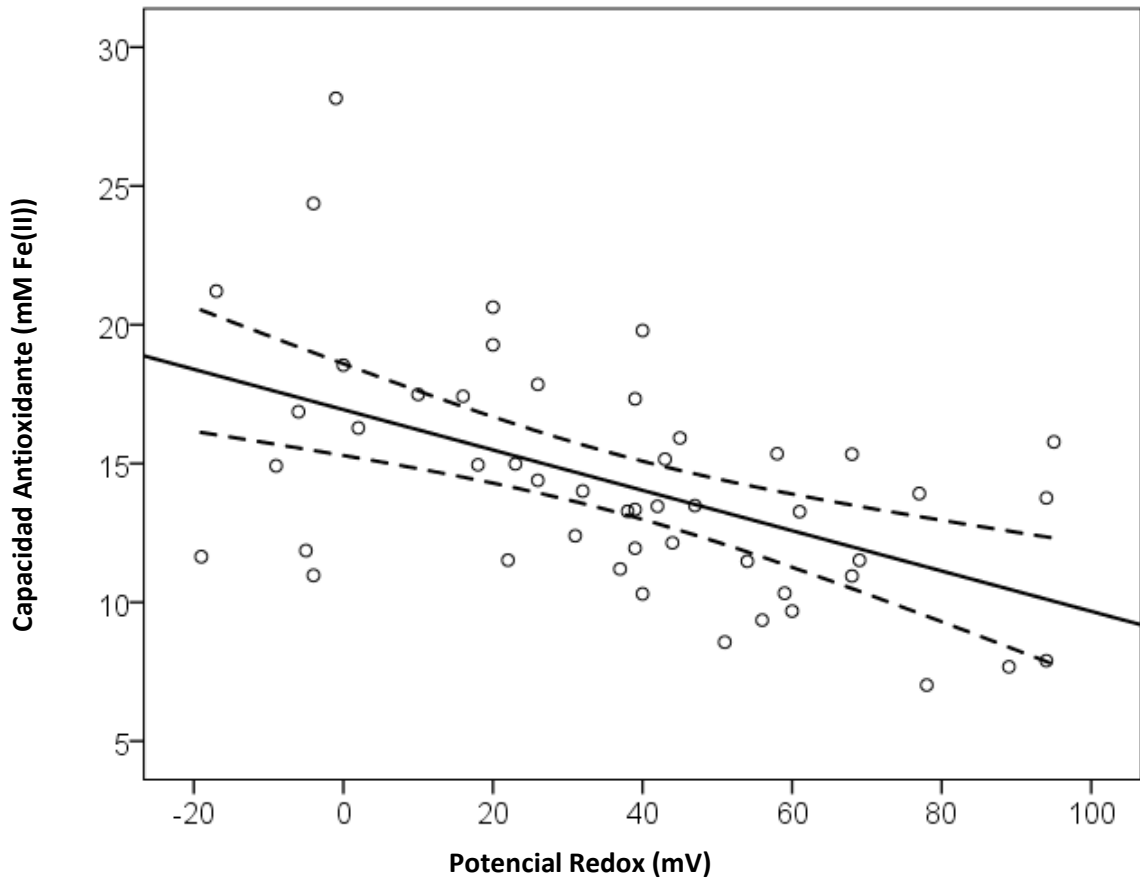


Figura 28. Regresión lineal entre la capacidad antioxidante (mM Fe(II)) frente a los valores de potencial redox. Las líneas de puntos son las líneas de mejor ajuste. Las líneas continuas están en un 95% de las bandas de confianza. Ecuación: $y = -0.073x + 16.941$, $R = 0.522$, $p < 0.001$

Entre estos dos parámetros se pudo observar la tendencia esperada (Fig. 28), a mayor capacidad antioxidante, menor potencial redox, de manera que se aceptó este

último como método de determinación, y el método de reducción del Fe(III) resultó adecuado para el medio orina.

En cambio, no se pudo aceptar el método de la capacidad oxidante al medio orina debido a que la tendencia (Fig. 29 y Fig. 30) seguida no fue la adecuada. Además, se dio el caso en el que algunos voluntarios obtuvieron 0 $\mu\text{M eq H}_2\text{O}_2$ como resultado de su capacidad oxidante, como si no hubieran excretado ninguna sustancia oxidante (entre ellas los RL derivadas del metabolismo), el cual es un fenómeno imposible a pesar de las defensas antioxidantes.

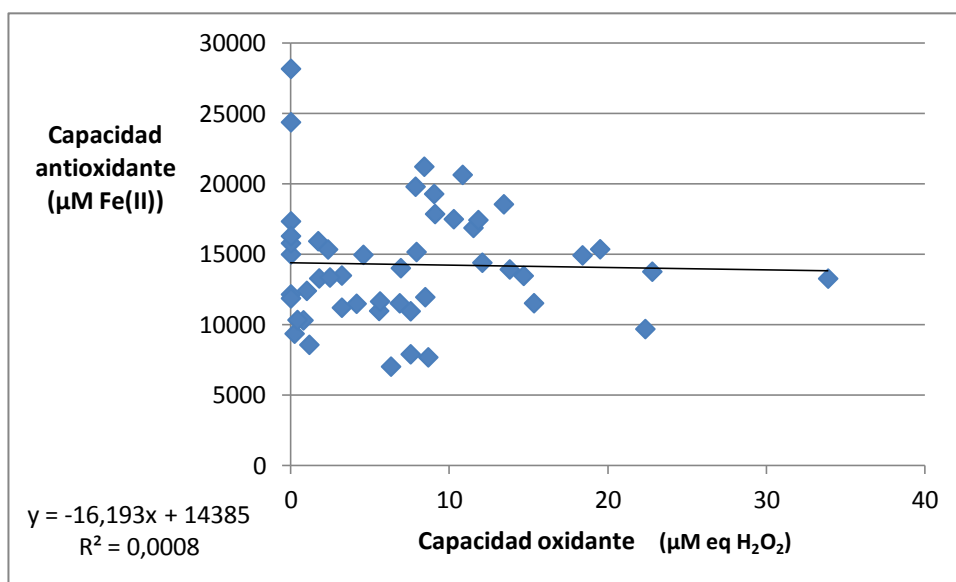


Fig 29. Representación de la línea de tendencia entre la capacidad antioxidante (µM Fe(II)) y la capacidad oxidante (µM eq H₂O₂).

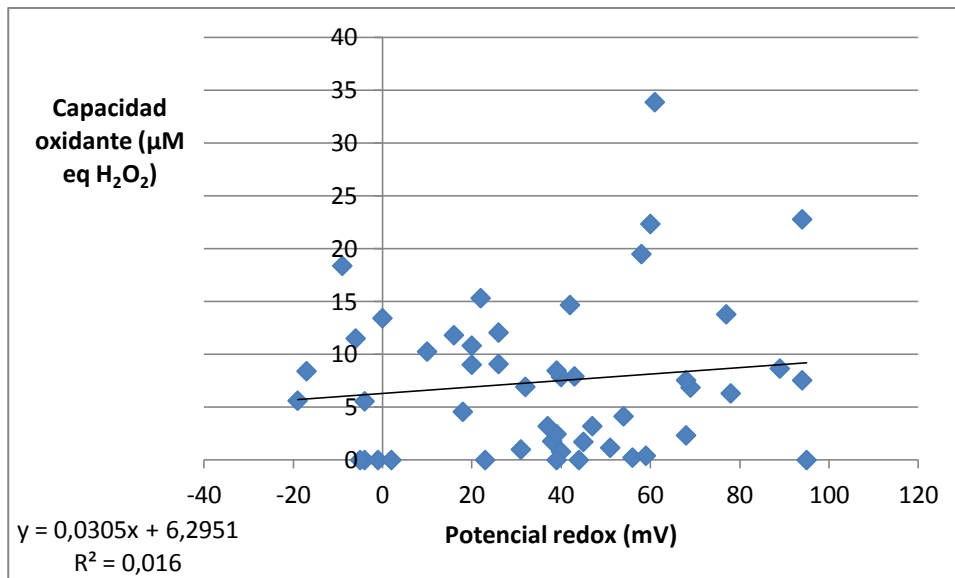


Fig 30. Representación de la línea de tendencia entre la capacidad oxidante (µM eq H₂O₂) y el potencial redox (mV).

Ya que es un método de determinación adecuado para el estrés oxidativo, se decidió utilizar el potencial redox porque es más sencillo y mucho más rápido que el método de la capacidad antioxidante.

Una vez conseguido el método de determinación, se retornó al objetivo principal de este estudio, el análisis del estrés oxidativo en pacientes con enfermedades derivadas del estrés oxidativo, concretamente ansiedad y depresión.

2. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN EN VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES CON ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

Cuando se midieron los potenciales redox urinarios con ansiedad normal y elevada (Figura 31) se encontró que los valores normales del estado de ansiedad ($A/E < 22$) correspondían a una media de potencial redox baja (28,77 mV; DE 35,76), mientras que estados de ansiedad más elevados ($A/E > 22$) estaban asociados con una media de potencial redox urinario de 68,16 mV (DE 34,77). Al realizar el análisis estadístico, se obtuvo que $p < 0,001$, de forma que estas diferencias se pueden considerar estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos de las muestras se pueden observar en las tablas 28 y 29.

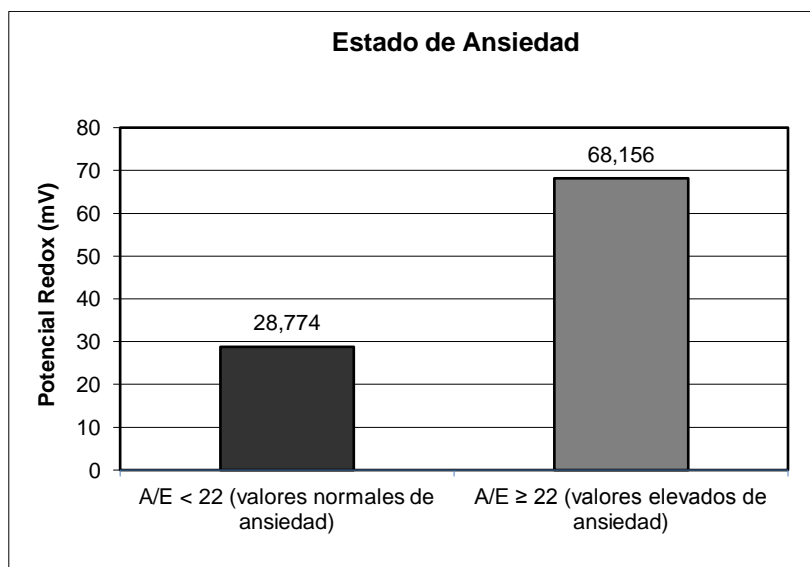


Fig 31. Valor medio del potencial redox urinarios para estados de ansiedad normal y elevado.

TABLA 28. Valores de potencial redox (mV) y valoración de la ansiedad (A/E) en pacientes con estado de ansiedad normal.

Muestra	Potencial (mV)	A/E
1	33	21
2	71	20
3	81	17
4	50	12
5	53	17
6	62	16
7	61	21
8	26	2
9	-6	3
10	23	3
11	40	2
12	-63	14
13	-9	11
14	-4	4
15	10	19
16	44	5
17	0	13
18	-17	14
19	20	3
20	16	7
21	26	5
22	39	4
23	45	3
24	-4	13
25	31	1
26	-5	6
27	31	5
28	-19	16
29	83	22
30	87	22
31	87	22

TABLA 29. Valores de potencial redox (mV) y valoración de la ansiedad (A/E) en pacientes con elevado estado de ansiedad.

Muestra	Potencial (mV)	A/E
1	92	48
2	46	30
3	94	33
4	156	36
5	87	28
6	54	44
7	57	40
8	116	35
9	81	45
10	42	34
11	90	26
12	103	27
13	99	46
14	30	46
15	63	27
16	20	52
17	130	28
18	70	39
19	83	27
20	61	37
21	72	58
22	-9	32
23	95	36
24	47	27
25	56	28
26	39	36
27	39	40
28	41	50
29	75	47
30	94	46
31	38	30
32	20	27

También se analizaron los valores de potencial redox urinario en función de la depresión (Figura 32). Se encontró que los individuos con valores normales de BDI tenían la media del potencial redox urinario más baja (35,60 mV; DE 36,27) que los individuos con valores de BDI altos (71,70 mV; DE 36,87). Se realizó el análisis estadístico y se determinó que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Los resultados obtenidos de las muestras se pueden observar en las tablas 30 y 31.

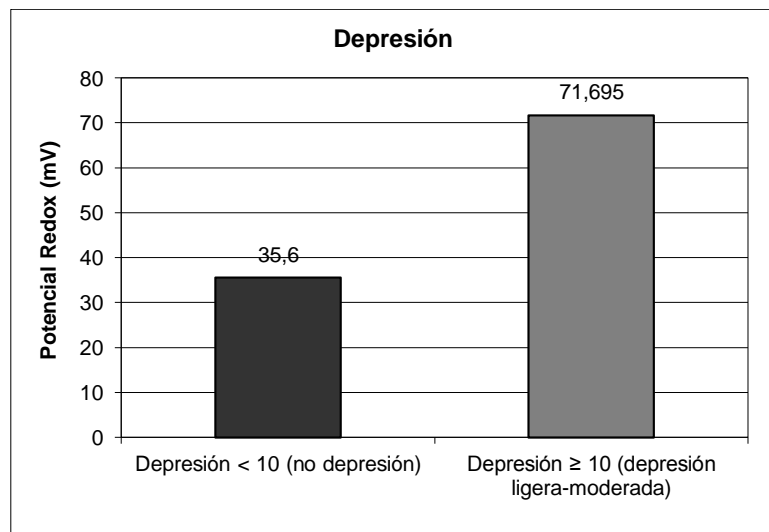


Fig 32. Media del potencial redox urinario para estados de depresión normal y elevado.

TABLA 30. Valores de potencial redox (mV) y valoración de la depresión (BDI) en pacientes sin depresión.

Muestra	Potencial (mV)	BDI
1	46	7
2	94	8
3	57	8
4	42	7
5	90	8
6	33	8
7	103	9
8	81	6
9	50	3
10	63	6
11	83	5
12	87	6
13	47	7
14	87	3
15	56	9
16	62	4
17	61	9
18	26	3
19	-6	2
20	23	3
21	40	2
22	-63	5
23	-9	3
24	-4	2
25	10	3
26	44	3
27	38	8
28	0	2
29	-17	4
30	20	1
31	16	1
32	20	6
33	26	4
34	39	2
35	45	1
36	-4	0
37	31	3
38	-5	7
39	31	1
40	-19	4

TABLA 31. Valores del potencial redox (mV) y valoración de la depresión (BDI) en pacientes con depresión.

Muestra	Potencial (mV)	BDI
1	92	16
2	156	11
3	87	14
4	54	17
5	116	10
6	81	19
7	71	10
8	99	15
9	53	10
10	30	20
11	20	11
12	130	16
13	70	15
14	83	10
15	61	17
16	72	28
17	-9	12
18	95	12
19	39	17
20	39	13
21	41	16
22	75	16
23	94	28

Con referencia a la distribución por edades, no había diferencias entre los grupos de ansiedad normal o elevada o entre los grupos de depresión normal o elevada (tabla 32).

TABLA 32. Distribución de edad (media y desviación estándar) de los diferentes grupos de estado de ansiedad y depresión.

	Edad (años)		
	N	Media	DE
Estado de Ansiedad			
≤ 22,00	31	37,5	13,7
> 22,00	32	41,5	13,1
Depresión			
< 10,00	40	38,9	13,6
≥ 10,00	23	40,6	13,2

En cada caso, se obtuvo la regresión lineal para los valores de ansiedad (A/E) y depresión (BDI) en función del potencial redox. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 33.

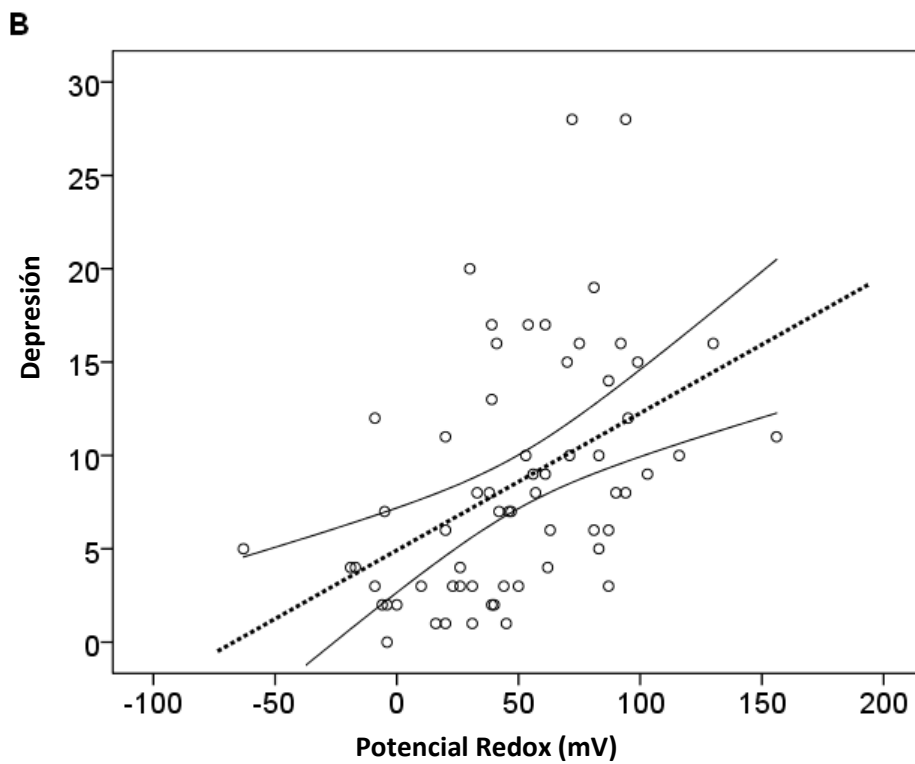
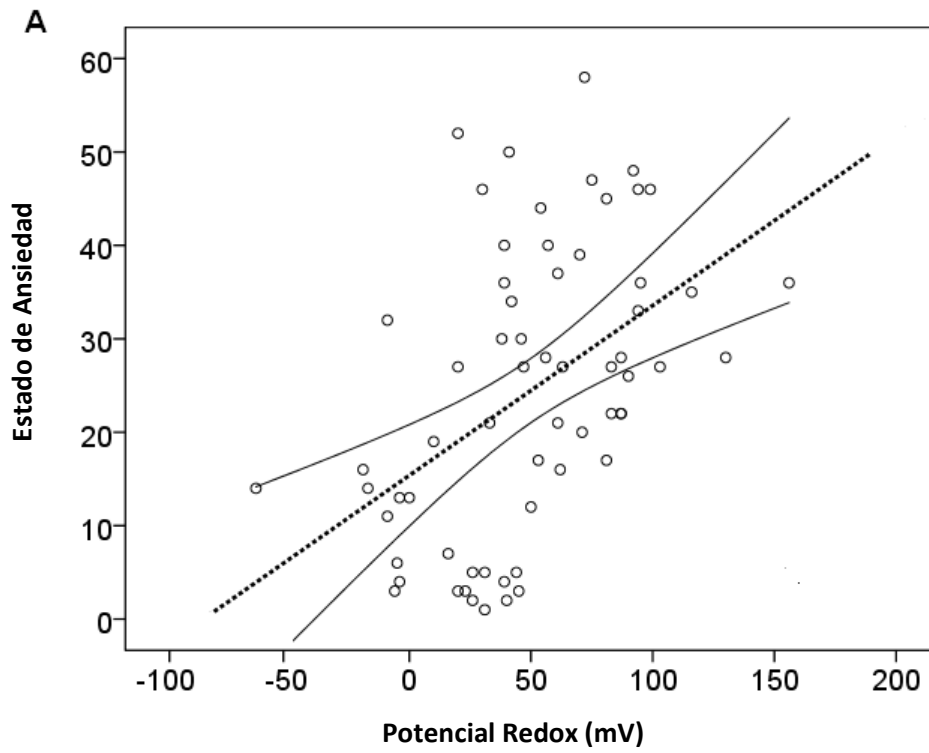


Fig 33. Regresión lineal para los valores de A/E (ansiedad) (A) y de BDI (depresión) (B) en función del potencial redox.

Como se puede observar, en ambos casos se encontró una relación lineal positiva entre ambos parámetros clínicos y los valores de potencial redox (PR).

$$\text{Ansiedad: } A/E = 15,385 + 0,182 \cdot PR$$

$$R = 0,475 \quad p < 0,001$$

$$\text{Depresión: } BDI = 4,926 + 0,073 \cdot PR$$

$$R = 0,463 \quad p < 0,001$$

DISCUSIÓN

La orina es el resultado de la filtración sanguínea por los riñones, y como tal refleja la composición de la sangre, incluyendo moléculas antioxidantes de bajo peso molecular, entre ellas moléculas como las vitaminas, polifenoles, etc. En consecuencia, una deficiencia de antioxidantes debido a la existencia de estrés oxidativo, se verá reflejada en la composición urinaria y por consiguiente en el potencial redox urinario en las personas que por una o varias razones presenten un estrés oxidativo incrementado.

La elección del método del potencial redox frente a los métodos de determinación de la capacidad antioxidante y oxidante se decidió debido a su sencillez y rapidez frente a los otros dos, siendo además el método de la capacidad oxidante inadecuado para el medio orina.

Estas diferencias entre el potencial redox y el método de la capacidad oxidante pudo deberse al hecho de que el electrodo de platino es capaz de detectar todos los componentes en disolución en la orina, tanto oxidantes como antioxidantes, mientras que cabe la posibilidad de que algunos o muchos de estos componentes, no reaccionen en el test de la capacidad oxidante y posiblemente también en el de la capacidad antioxidante, es decir, no provocan la oxidación o la reducción del hierro respectivamente.

Por otro lado hubo que tener en cuenta que existen múltiples factores que pueden afectar a los valores de potencial redox y al índice de estrés oxidativo, como son la dieta, el consumo de tabaco y de alcohol, cierto tipo de medicamentos, el

ejercicio físico, edad, grado de estrés y estabilidad emocional, etc, información no recogida por lo que en este estudio no se ha podido tener en cuenta su influencia.

Los resultados de este estudio demuestran claramente que un estado de ansiedad y/o de depresión elevado está asociado con un potencial redox urinario elevado, y por lo tanto, con un mayor estrés oxidativo.

Este estudio apoya los resultados de otros estudios anteriores, en los que se han determinado los marcadores del estrés oxidativo, tanto en humanos como en animales (143, 144, 145), en los que la ansiedad y la depresión conllevan una elevación de la cantidad de RL en el organismo, consecuencia de un desequilibrio en el balance oxidante-antioxidante, causante de numerosas alteraciones secundarias a las ya mencionadas ansiedad y depresión.

Por tanto estos estudios concuerdan con investigaciones anteriores, en el sentido de proponer terapias antioxidantes para combatir o mitigar los efectos de estos trastornos del comportamiento, siendo necesarios más estudios en este ámbito.

CAPÍTULO 2

ESTRÉS OXIDATIVO Y LITIASIS RENAL

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES

Este estudio incluyó a 60 pacientes con litiasis de oxalato cálcico, 30 que generaron cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilar y 30 con cálculos de oxalato cálcico dihidrato, todos ellos desarrollados durante los últimos meses. También se incluyó un grupo de 30 voluntarios sanos sin ningún tipo de enfermedad crónica.

En todos los casos, se ha obtenido el consentimiento informado de las personas que han participado en este proyecto, que se ha sometido a aprobación del Comité Ético de la Comunidad de Islas Baleares (nº IB1963/12PI).

2. MEDIDA DEL POTENCIAL REDOX

Se recogieron las muestras de orina de 2 horas de los diferentes grupos, descartando la primera micción del día y obteniendo la muestra a las 2 horas. Durante este proceso, ninguno de los participantes había consumido ningún tipo de medicamentos ni habían sido sometidos a una dieta restrictiva. Las muestras de orina obtenidas fueron inmediatamente enfriadas a la temperatura de la habitación (25°C), y se midió el potencial redox utilizando un potenciómetro Crison (mencionado en el capítulo 1).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el test de la t de Student para establecer diferencias entre los grupos según los valores del potencial redox. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Para averiguar la tendencia que siguen los resultados de los tres grupos, es decir, qué valores de potencial redox presentan, por una parte las personas sanas y por otra los enfermos de litiasis, se han calculado las medias, las desviaciones estándar y los errores estándar de la media del potencial redox para cada grupo (ver tablas 33 y Fig 34).

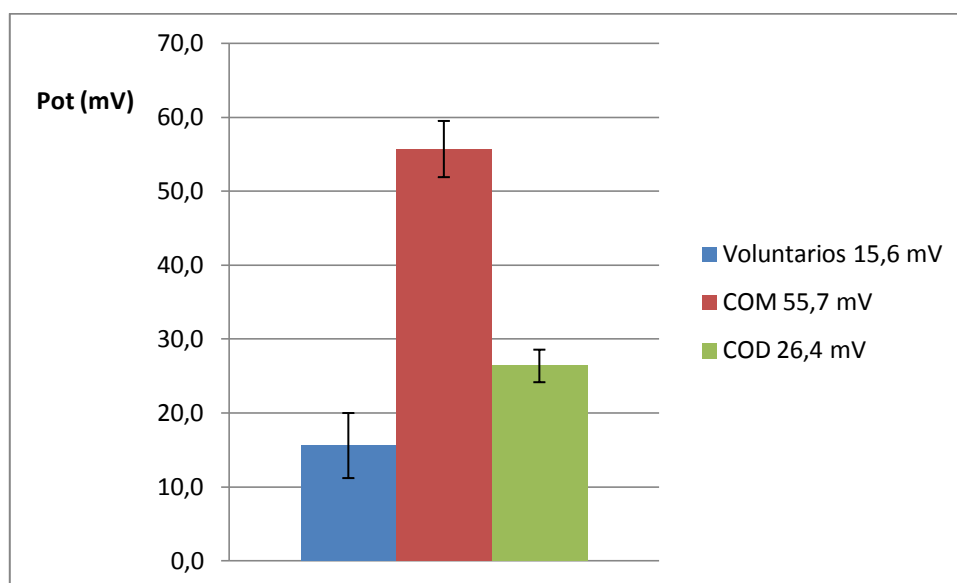


Fig 34. Diferencias entre los valores de potencial redox (mV) entre los distintos grupos

TABLA 33. Valores de potencial redox (mV) de las muestras de los distintos grupos.

MUESTRA	VOLUNTARIOS	COM	COD
1	26	69	34
2	-63	56	27
3	-4	58	36
4	44	18	43
5	38	94	33
6	0	94	36
7	-17	95	50
8	20	51	23
9	16	68	12
10	40	47	17
11	20	61	38
12	26	39	36
13	39	40	12
14	45	89	22
15	-4	32	14
16	-5	68	41
17	31	43	14
18	-19	34	20
19	29	77	25
20	19	78	13
21	35	39	20
22	18	54	23
23	27	57	5
24	30	37	44
25	31	49	10
26	-9	59	11
27	11	22	34
28	4	42	25
29	35	52	33
30	5	49	40
Media	15,6 ± 4,4	55,7 ± 3,8	26,4 ± 2,2

Al tratar los datos obtenidos mediante el test de la t de Student, se obtuvieron diferencias significativas muy importantes en el potencial redox entre los pacientes con cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilar respecto a los otros dos grupos. La

media en los valores de potencial redox fue muy superior en los pacientes de COM ($55,7 \pm 3,8$ mV) que en los voluntarios ($15,6 \pm 4,4$ mV) y que los pacientes de COD ($26,4 \pm 2,2$ mV), confirmándolo así el test de la t de Student, cuya $p < 0,0001$ en ambas comparaciones, dando a entender que existen diferencias significativas en el estrés oxidativo entre estos grupos. En el caso del grupo de voluntarios y el de pacientes de COD, la diferencia entre las medias no es tan elevada como la que existe con la media de COM, sin embargo, el grupo de COD casi duplica el valor del grupo de los voluntarios, y estas diferencias también resultaron ser estadísticamente significativas, con una $p = 0,03$.

En cuanto a la distribución de edad y sexo, todos los grupos eran similares (ver tablas 34 y 35 y Fig 35 y 36).

TABLA 34. Distribución de edad y sexo de los pacientes con litiasis.

Edad	Número
20-29	4
30-39	9
40-49	10
50-59	3
60-69	4

n= 30, 22 hombres y 8 mujeres

TABLA 35. Distribución de edad y sexo de los voluntarios sanos.

Edad	Número
20-29	6
30-39	6
40-49	9
50-59	7
60-69	2

n= 30, 22 hombres y 8 mujeres

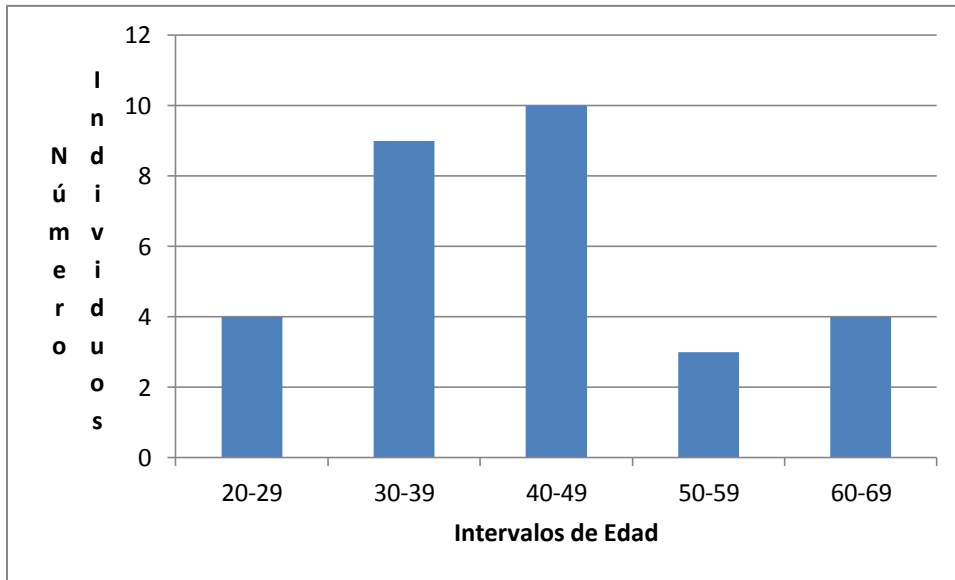


Fig 35. Distribución de edad de los pacientes con litiasis.

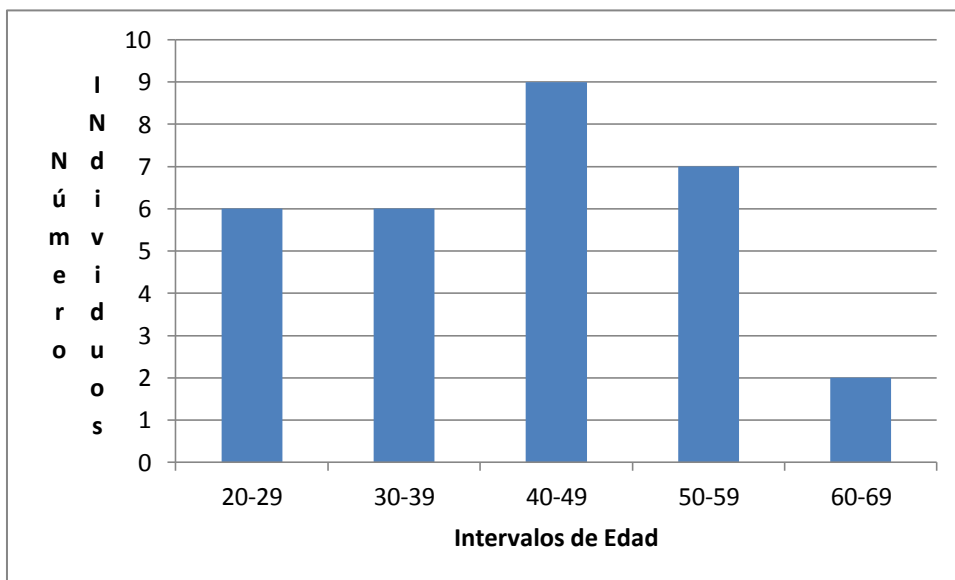


Fig 36. Distribución de edad de los voluntarios sanos.

DISCUSIÓN

El potencial redox en la orina presentó valores claramente más elevados en el grupo de pacientes con litiasis papilar de oxalato cálcico monohidrato, que en el grupo de individuos sanos y el grupo de pacientes con litiasis de oxalato cálcico monohidrato, resultado estadísticamente significativo ($p < 0,0001$). Este fenómeno se debe a que los cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilar se originan por una lesión en la papila causada por el estrés oxidativo.

El potencial redox de la orina también fue superior, aunque en menor medida, en el grupo de pacientes con litiasis de oxalato cálcico dihidrato, que en el grupo de voluntarios, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,03$). Aunque los cálculos de oxalato cálcico dihidrato no se originen debido al estrés oxidativo, una vez formados pueden causar algún tipo de lesión en la papila renal, manifestándose mediante un aumento del estrés oxidativo.

Finalmente, se concluyó que la medida del potencial redox de una orina puede aportar información de gran interés en la evaluación del paciente litiásico que genera cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilares, demostrando que el estrés oxidativo es un factor etiológico muy importante implicado en la formación de este tipo de cálculos.

CAPÍTULO 3

ANTIOXIDANTES Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES RELACIONADAS

CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

**3.1. PREVENCIÓN DE LA LITIASIS RENAL
CON ANTIOXIDANTES EN ANIMALES
DE EXPERIMENTACIÓN**

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Animales

- Sesenta y cuatro ejemplares de rata Wistar macho, divididos en ocho grupos (ocho animales por grupo).

1.2. Disoluciones

- Disolución 0,8% de etilenglicol (v/v) y 1% de NH₄Cl (p/v) en agua mineral.

- Disolución de epicatequina 200 mg/l en agua mineral.

- Disolución de epicatequina 200 mg/l, 0,8% de etilenglicol (v/v) y 1% de NH₄Cl (p/v) en agua mineral.

- Disolución de extracto de uva negra 200 mg/l en agua mineral.

- Disolución de extracto de uva negra 200 mg/l, 0,8% de etilenglicol (v/v) y 1% de NH₄Cl (p/v) en agua mineral.

- Disolución de extracto de uva blanca 200 mg/l en agua mineral.

- Disolución de extracto de uva blanca 200 mg/l, 0,8% de etilenglicol (v/v) y 1% de NH₄Cl (p/v) en agua mineral.

- Formaldehído 4% a pH 7 (Proporcionado por Panreac Quimica S.A., Barcelona, España).

1.3. Aparatos

- pH metro Crison.
- Baño seco Dri-Block® DB-3D (TECHNE).
- Plasma acoplado inductivamente (ICP), para espectrometría de emisión atómica (Espectrómetro PerkinElmer SL, Optima 5300 DV).
- Espectrofotómetro Shimadzu® UV-1800.

1.4. Kit de determinación de ácido oxálico Spinreact, S.A.

- R1: tampón succínico a pH 3,8 y 3-(Dimetilamino) ácido benzoico (DMAB).
- R2: tampón succínico a pH 3,8.
- R3: Oxalato oxidasa y peroxidasa.
- Patrón de ácido oxálico 0,5 mM.
- Diluyente de muestra: tampón EDTA a pH 7.

1.5. Determinación de creatinina por el método de Jaffé

1.5.1. Reactivos

- Ácido pícrico 131 mM.
- NaOH 0,9 M
- Reactivo colorimétrico (RC): mezclar en la proporción 1:1 las disoluciones de ácido pícrico y NaOH.

1.5.2. Patrones

A partir de una disolución stock de creatinina 10 mM, preparar los patrones 0, 50, 100, 150, 200 y 300 μM de creatinina. A partir de estos patrones se debe obtener la recta de calibrado.

1.5.3. Muestras

Las muestras de orina de los animales se pueden conservar 2, 3 días a 4° C o bien congeladas para períodos de conservación más largos (146). Para llevar a cabo la determinación, es necesario diluir la muestra para que su concentración de creatinina no sea superior a 300 μM . En este caso se utilizó la dilución 1:60.

2. TRATAMIENTOS

El estudio se realizó con 64 ratas Wistar, todas ellas de sexo masculino, con un peso aproximado de 300 g cada una, los cuales se aclimataron durante siete días en jaulas, previamente al experimento. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las guías generales aprobadas por el comité de ética institucional y por las regulaciones de la Unión Europea (86/609/CEE y 2003/65/CE). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a comida estándar y a agua mineral bajo un ciclo de luz/oscuridad controlado de 12 h a $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

Los antioxidantes se administraban en el agua de bebida y eran disoluciones de epicatequina (EPI), de extracto de uva negra (RGS) y de extracto de uva blanca (WGS).

Estos animales se dividieron en 8 grupos de ocho individuos cada uno: grupo control sin pre-tratamiento (CTR), grupo control con etilenglicol (CTR-EG), grupo pre-tratado con epicatequina (EPI), grupo con epicatequina y etilenglicol (EPI-EG), grupo pre-tratado con el extracto de uva negra (RGS), grupo con extracto de uva negra y etilenglicol (RGS-EG), grupo pre-tratado con un extracto de uva blanca (WGS) y el grupo con extracto de uva blanca y etilenglicol (WGS-EG).

La (-)-epicatequina >90% (HPLC) fue proporcionada por Sigma-Aldrich (Madrid, España), el extracto de uva negra (exGrape®) por La Gardonnenque-GroupeGrap'Sud® (Cruviers-Lascours, Francia) con un total de polifenoles >95% (equivalente de catequina) y el extracto de la uva blanca por Output Trade S.L., (Vilafranca del Penedés, España), con un total de polifenoles >45% (equivalente a ácido gálico).

El estudio duró 24 días. Durante 16 días, a los grupos CTR y CTR-EG se le administró agua de bebida, a los grupos EPI y EPI-EG se les proporcionó agua de bebida con un suplemento de 200 mg/l de epicatequina, los grupos RGS y RGS-EG recibieron agua de bebida suplementada con el extracto de uva negra 200 mg/l y los grupos WGS y WGS-EG el agua de bebida con un suplemento 200 mg/l de extracto de uva blanca. Después de 16 días, a los grupos CTR, EPI, RGS y WGS se les continuó administrando el mismo tratamiento hasta finalizar los ocho días que restaban para finalizar el estudio, mientras que los grupos CTR-EG, EPI-EG, RGS-EG y WGS-EG recibieron un nuevo tratamiento que incluía (además del correspondiente pre-tratamiento en cada caso) la adición de etilenglicol (EG) 0,8% (v/v) y NH₄Cl 1% (p/v) durante los ocho días restantes.

3. MONITORIZACIÓN Y MUESTREO

El peso de los animales se monitorizó regularmente durante el estudio. Los días 8, 16 y el último día del experimento se recogieron muestras de orina 24 h de cada grupo de ratas, para lo cual se mantuvo cada animal en una jaula metabólica durante 24 horas. El último día, los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂, y se procedió a la extracción de los riñones para análisis químico e histológico.

4. DETERMINACIÓN DE CALCIO, MAGNESIO Y FÓSFORO EN LOS RIÑONES

4.1. Digestión de los riñones

Los riñones izquierdos se digirieron en un baño seco a 180° C utilizando una mezcla 1:1 de HNO₃:HClO₄ hasta que la disolución fue transparente. Los pasos utilizados para la digestión de los riñones fueron los siguientes:

- Liofilización de los riñones seleccionados durante 48 h al vacío a -50° C.
- Primera adición de ácido: introducir cada muestra de riñón liofilizado en un tubo de vidrio alto y añadir 700 µl de HNO₃ concentrado y 700 µl de HClO₄ concentrado.
- Digerir en un bloque de temperatura y mantener las condiciones que se exponen en la tabla 36.

TABLA 36. TEMPERATURA Y TIEMPO DE LAS DISTINTAS FASES DE LA DIGESTIÓN

Rango de Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Ambiente-90	30
90-150	60
150-180	30
180	90

El aumento de temperatura que va de 90 a 150°C es un paso crítico, ya que la muestra genera mucha espuma, fenómeno que podría hacer perder cierta cantidad del órgano a digerir, de manera que se debe eliminar dicha espuma utilizando un agitador de vórtex.

- Sacar los tubos del bloque y fijar la temperatura a 150°C.
- Proceder a la segunda adición de ácido, de la misma manera que la primera.
- Volver a colocar los tubos en el bloque y mantenerlo aproximadamente 30 min a 150°C.
- Aumentar la temperatura a 180°C y mantenerlo durante 2 h.
- La digestión finaliza cuando la muestra queda transparente. En caso contrario, llevar a cabo una tercera adición de ácido y repetir los dos últimos pasos.
- Preparación de la disolución madre: verter el contenido del tubo de vidrio en un matraz aforado de 10 ml y enrasar con H₂O mQ. La disolución madre se debe conservar a 4°C.

- Filtrar una alícuota de la disolución madre con un filtro de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro, y preparar una dilución 1:20 en HNO_3 2% v/v. Esta dilución es la que finalmente se introduce en el espectrómetro de emisión atómica ICP para efectuar las correspondientes determinaciones.

4.2. Determinación de Ca, Mg y P por espectrometría de emisión atómica ICP

Para la determinación de estos parámetros mediante espectrometría de emisión atómica ICP se deben preparar las disoluciones de patrones para el calibrado, todas ellas en HNO_3 2% v/v.

Las sales de Ca, Mg y P utilizadas para preparar las disoluciones son CaCO_3 , MgSO_4 y KH_2PO_4 . A partir de estas sales sólidas, preparamos la cantidad suficiente de disolución madre para a posteriori preparar los patrones. Dicha disolución madre debe ser 2000 mg/l de P y 200 mg/l de Ca y Mg. Partiendo de esta disolución madre, se prepararán los patrones, cuyas concentraciones se muestran en la tabla 37.

Las concentraciones de Ca, Mg y P se expresaron como mg/g de riñón seco.

TABLA 37. CONCENTRACIONES DE CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO DE LOS PATRONES

Patrón	Conc P (mg/l)	Conc Ca (mg/l)	Conc Mg (mg/l)
Blanco (HNO3 2% v/v)	0	0	0
P1	0,25	0,025	0,025
P2	0,5	0,05	0,05
P3	0,75	0,075	0,075
P4	1	0,1	0,1
P5	5	0,5	0,5
P6	10	1	1
P7	50	5	5
P8	100	10	10
P9	200	20	20

Tanto la disolución madre como los patrones deben conservarse a 4°C.

5. ANÁLISIS DE ORINA

El potencial redox, determinación presente en otros capítulos, habría sido una prueba muy interesante en este apartado, ya que es la forma más sencilla de estudiar el estrés oxidativo, pero no se pudo llevar a cabo ya que la orina que se obtenía, al ser de 24 h, estaba mucho tiempo en contacto con el aire, que es un potente agente oxidante, además de la continua contaminación de las muestras, cosa que no afectaba al resto de parámetros pero sí influía en el potencial redox.

El pH de cada muestra se midió utilizando un electrodo de vidrio (pH metro, Crison S.L. Barcelona, España). También se llevó a cabo la determinación de oxalato mediante la utilización de un kit específico de determinación de ácido oxálico Spinreact S.A. y la determinación de la creatinina mediante el método de Jaffé. Finalmente se realizó la determinación de Ca, Mg y P por espectrometría de emisión atómica ICP.

5.1. Determinación de Ca, Mg y P por espectrometría de emisión atómica ICP

Las muestras de orina de 24 h se utilizaron para determinar el calcio, magnesio y fósforo mediante espectrometría de emisión atómica ICP. Las muestras de orina contienen sedimentos que podrían afectar al aparato de ICP hasta el punto de obstruirlo. Por este motivo, se debe filtrar una alícuota de cada muestra con un filtro de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro, para eliminar cualquier partícula que esté en suspensión. Finalmente, se realiza una dilución 1/20 de estas alícuotas en HNO_3 2% v/v. Los patrones utilizados son los mismos que se utilizaron para la determinación de estos parámetros en los riñones, ya que los componentes a analizar fueron los mismos.

5.2. Determinación de oxalato en orina

La determinación de oxalato en las muestras de orina de los animales se llevó a cabo mediante un kit fabricado por el laboratorio SPINREACT, S.A. (proporcionado por Spinreact SAU, St. Esteve de'n Bas, Girona, España). Para poder realizar dichas determinaciones debimos seguir un protocolo que consta de varias etapas.

El método está basado en la detección del peróxido de hidrógeno formado por la acción de la oxalato oxidasa sobre el oxalato de la muestra, determinado cuantitativamente por su reacción con 3-(Dietilamino)ácido benzoico (DMAB) en presencia de peroxidasa. La intensidad del compuesto azulado que se forma es proporcional a la concentración de oxalato en la muestra.

Las muestras de orina se conservaron por congelación, por este motivo, al proceder a su descongelación, queda un sedimento en el tubo de ensayo. Es en este sedimento donde se concentra la mayor parte del oxalato. Por esta razón, el primer paso a realizar es la homogeneización del tubo de ensayo, en caso necesario utilizando un agitador de vórtex.

Una vez homogeneizada la muestra, se toman 5 ml y se añaden 0,2 ml de HCl concentrado para alcanzar un pH inferior a 1, con el fin de redissolver el oxalato precipitado, agitando en vórtex. En este caso, no se consigue la total disolución del sedimento, ya que las proteínas presentes en la muestra no se vuelven a disolver.

Cuando el oxalato se ha disuelto completamente, se ajusta el pH de la muestra a 6 aproximadamente, ya que este es el pH idóneo para que tenga lugar la reacción enzimática de la oxalato oxidasa. Una vez ajustado el pH, es recomendable continuar el proceso rápidamente ya que a pH 6, corremos el riesgo de que el oxalato vuelva a precipitar. El siguiente paso es mezclar 1 ml de la muestra o patrón con 1 ml de diluyente (tampón de EDTA a pH 7), e introducir dicha mezcla en un tubo de purificación con carbón activo, y se agita en vórtex durante 5 min, con el objetivo de eliminar interferencias. Finalmente, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min para separar el carbón activo de la muestra ya purificada.

Para su lectura en el espectrofotómetro, se utilizan cubetas semimicro, a las que hay que añadir 500 µl del reactivo R1 (tampón succínico a pH 3,8 con DMAB), 500 µl del reactivo R2 (tampón succínico a pH 3,8), 50 µl de muestra o patrón y 100 µl del reactivo R3 (que contiene la oxalato oxidasa y la peroxidasa). Se mezcla hasta su

correcta homogeneización, se incuba durante 10 min y se procede a la lectura de la absorbancia a 590 nm. La linealidad del método sólo alcanza hasta una concentración 1 mM, y como el patrón es de una concentración 0,5 mM, si la absorbancia de la muestra es superior a dos veces la concentración del patrón, se debe diluir la muestra nuevamente. Una vez obtenidas las absorbancias, se puede calcular la concentración de oxalato en la muestra.

5.3. Determinación de creatinina

5.3.1. Fundamento

El método utilizado para determinar la creatinina en orina es el método de Jaffé, un método colorimétrico que se basa en la reacción de Jaffé, en la cual la creatinina reacciona con el picrato alcalino para dar un cromógeno rojizo. La cantidad de cromógeno que se forma bajo condiciones controladas, es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra y se mide fotométricamente a 500 nm.

5.3.2. Procedimiento

Para la lectura, se deben introducir en la cubeta 1 ml de muestra o patrón y 2,5 ml de RC, agitar y dejar reposar 15 minutos. Finalmente se debe medir la absorbancia a 500 nm. Las concentraciones de la muestra se obtienen a partir de la recta de calibrado y multiplicar por su dilución (1:60).

6. EXAMEN HISTOLÓGICO

Se examinaron muestras representativas de los tejidos de los riñones de cada grupo. Los riñones derechos se mantuvieron en formaldehído al 4% a pH 7 durante 24 h a temperatura ambiente, incrustados en cera de parafina, seccionados (2-4 μm) y tintados con hematoxilina-eosina (H-E). Los cristales se observaron y localizaron utilizando luz polarizada. El análisis histológico y la localización de los cristales se realizaron por un patólogo experimentado.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan con los valores de la media \pm EEM (Error Estándar de la Media) de ocho animales por grupo. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron mediante el test de la t de Student, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas si el valor de la p era inferior a 0,05. Para las operaciones estadísticas se utilizó el software convencional de Windows.

RESULTADOS

1. CALCIO, MAGNESIO Y FÓSFORO EN RIÑONES

Los resultados de las determinaciones de las concentraciones de calcio, magnesio y fósforo de los riñones izquierdos de las ratas se muestran en la tabla 38 y en las figuras 37, 38 y 39.

TABLA 38. Contenido de Ca, Mg y P de los riñones.

Grupos	Calcio (mg/g)	Magnesio (mg/g)	Fósforo (mg/g)
CTR	0,280±0,005	0,302±0,006	10,6±0,2
EPI	0,284±0,030	0,296±0,014	10,2±0,4
RGS	0,255±0,008*	0,288±0,004	10,1±0,1
WGS	0,261±0,012	0,295±0,004	10,3±0,2
CTR-EG	3,951±0,934*	0,297±0,011	10,4±0,1
EPI-EG	2,274±0,447**	0,302±0,010	9,9±0,4
RGS-EG	1,734±0,564**	0,311±0,005**	10,5±0,1
WGS-EG	1,979±0,196**	0,293±0,010	9,9±0,3

Los valores se representan mediante la media ± error estándar de la media

a CTR grupo control, EPI grupo tratado con epicatequina, RGS grupo tratado con extracto de uva negra, WGS grupo tratado con extracto de uva blanca, EG tratado con etilenglicol.

*: valores significativamente diferentes respecto al grupo control, $p \leq 0,05$.

** : valores significativamente diferentes respecto a su grupo no tratado con etilenglicol, $p \leq 0,05$.

Las concentraciones de Ca fueron significativamente más elevadas en los animales tratados con etilenglicol y NH_4Cl (CTR-EG, EPI-EG, RGS-EG y WGS-EG) que en sus respectivos grupos control (CTR, EPI, RGS y WGS), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). No obstante, a pesar del incremento en la deposición de calcio en los grupos tratados con etilenglicol, también se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la concentración de Ca entre los grupos

tratados (EPI-EG, RGS-EG y WGS-EG) y el grupo CTR-EG, con reducciones del 52%, 56% y del 50% respectivamente.

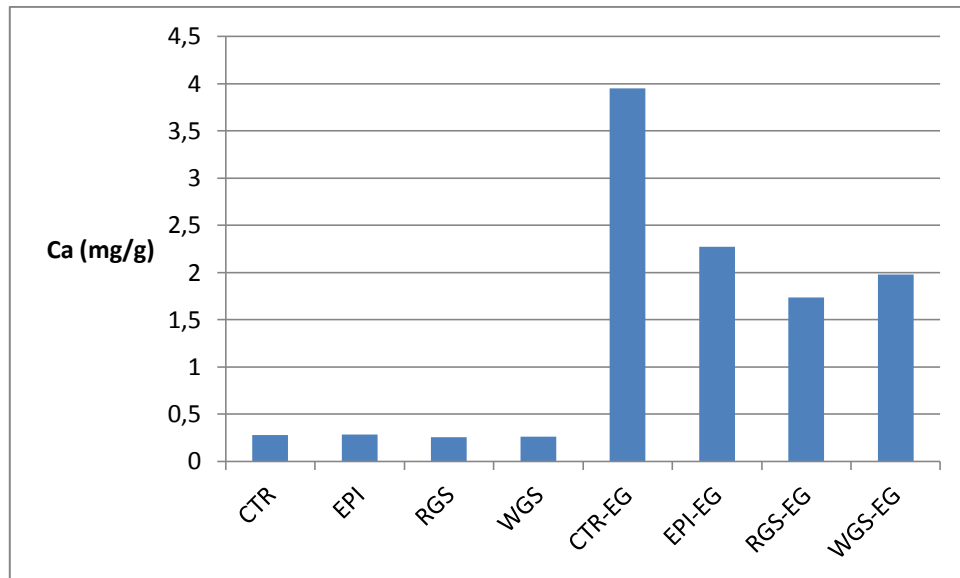


Fig 37. Contenido de calcio en los riñones (mg Ca/g riñón) de los diferentes grupos de ratas.

Por otro lado, no se apreciaron diferencias significativas en los contenidos de magnesio y fósforo (figuras 38 y 39).

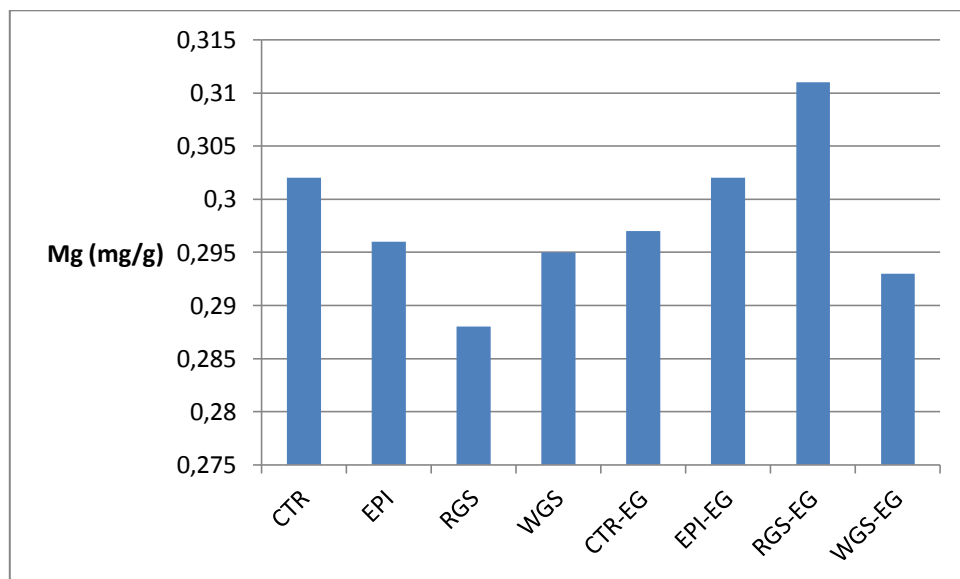


Fig 38. Contenido de magnesio en los riñones (mg Mg/g riñón) de los diferentes grupos de ratas.

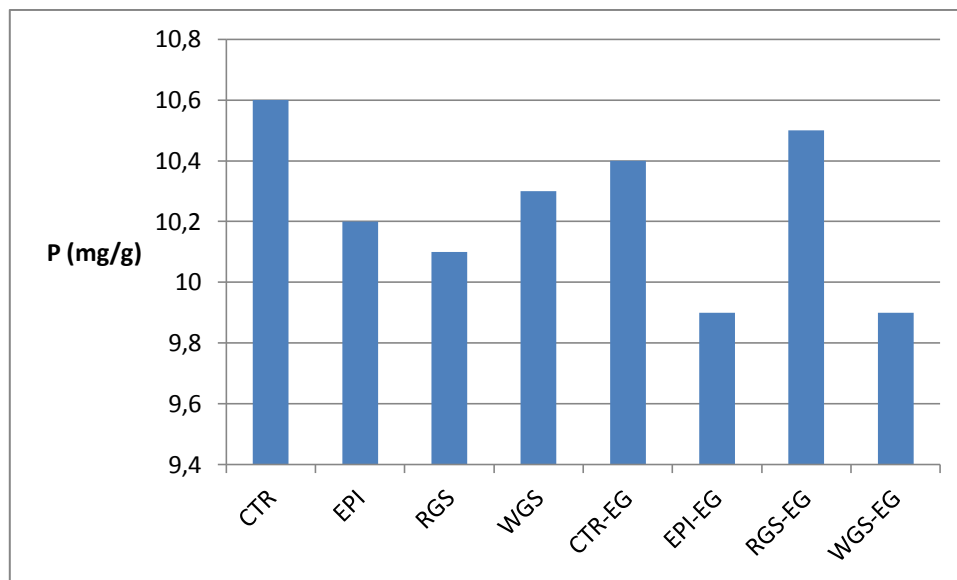


Fig 39. Contenido de fósforo en los riñones (mg P/g riñón) de los diferentes grupos de ratas.

2. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO PAPILAR RENAL

Se examinaron tres muestras de tejido representativas de cada grupo mediante microscopía de luz polarizada. Las secciones de los riñones de las ratas a las que no se les administró etilenglicol/ NH_4Cl no mostraron depósitos de cristales, mientras que los riñones de todas las ratas tratadas con etilenglicol/ NH_4Cl contenían depósitos de cristales intratubulares compatibles con el oxalato cálcico detectado mediante luz polarizada. Se observó la mayor cantidad de cristales en el grupo CTR-EG, cantidades similares en el grupo EPI-EG y la menor cristalización en el grupo WGS-EG. En el caso del grupo RGS-EG, se pudieron apreciar depósitos de cristales pequeños que no fueron detectados con luz polarizada, compatibles con cristales de hidroxiapatita. Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla 39 y en las figuras 40 y 41.

TABLA 39. Datos de la histología del tejido renal papilar (n=3)

Grupos	Cristalización
CTR	-
EPI	-
RGS	-
WGS	-
CTR-EG	+++
EPI-EG	+++
RGS-EG	+
WGS-EG	++

a + poca cristalización

++ más cristalización

+++ mucha cristalización

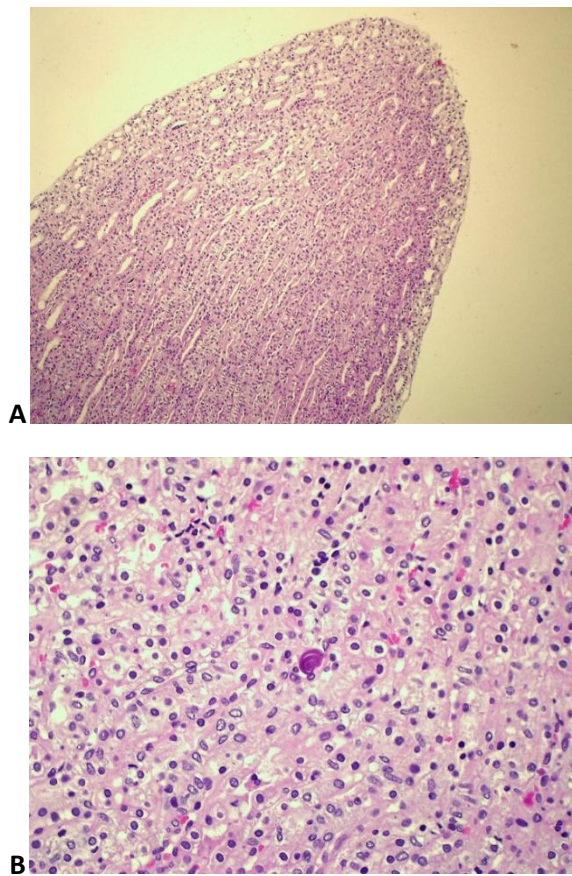


Fig 40. Imagen de un corte histológico a 100 aumentos (A) y a 400 aumentos (B) de un riñón de una rata del grupo CTR.

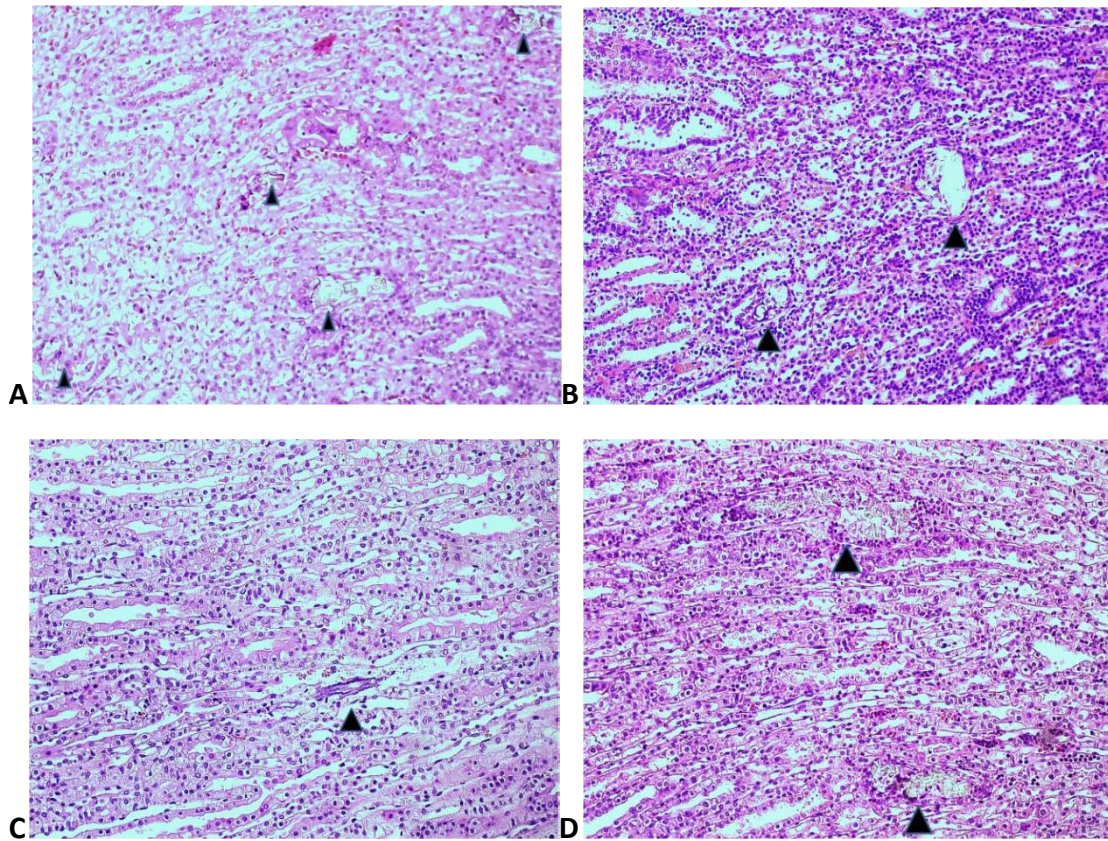


Fig 41. Imagen de un corte histológico a 200 aumentos de un riñón de una rata del grupo CTR-EG en el que se puede observar la cristalización de oxalato cálcico (A), de un riñón de una rata del grupo EPI-EG en el que se puede observar la cristalización de oxalato cálcico (B), de un riñón de una rata del grupo RGS-EG en el que se puede observar una mínima cristalización de hidroxapatita (C) y de un riñón de una rata del grupo WGS-EG en el que se puede observar la cristalización de oxalato cálcico (D).

3. ANÁLISIS DE ORINA

Los valores de los principales parámetros bioquímicos de la orina se muestran en las tablas 40 y 41.

TABLA 40. Datos de diuresis, pH y oxalato urinarios al finalizar el experimento, después de los ocho días de tratamiento con etilenglicol/ NH₄Cl.

Grupos	Diuresis(ml/24h)	pH (unidades)	Oxalato (mM)	Oxalato (mg/24 h)
CTR	30,7±1,7	7,2±0,1	0,21±0,02	0,66±0,09
EPI	24,9±2,1	7,2±0,0	0,24±0,02	0,51±0,06
RGS	25,4±0,6	7,3±0,1	0,21±0,01	0,58±0,07
WGS	27,8±1,5	7,3±0,1	0,23±0,02	0,63±0,05
CTR-EG	9,0±3,5*	7,1±0,5	1,32±0,13*	0,90±0,30*
EPI-EG	7,8±1,6*	6,3±0,0*	1,59±0,08*	1,70±0,00*
RGS-EG	12,3±1,6 ^{a,b}	7,6±0,5 ^b	2,69±0,63 ^a	3,36±0,62*
WGS-EG	16,0±1,3 ^{a,b}	6,2±0,1 ^{a,c}	2,17±0,12 ^{a,b}	3,11±0,32*

Los valores se representan mediante la media ± error estándar de la media:

*: valores significativamente diferentes respecto a su grupo no tratado con etilenglicol, p≤0,05.

^a: valores significativamente diferentes respecto a CTR, p≤0,05.

^b: valores significativamente diferentes respecto a EPI, p≤0,05.

^c: valores significativamente diferentes respecto a RGS, p≤0,05

TABLA 41. Datos de concentraciones de calcio, magnesio y fósforo urinarios al finalizar el experimento, después de los ocho días de tratamiento con etilenglicol/ NH₄Cl.

Grupos	Calcio (mM)	Magnesio (mM)	Fósforo (mM)
CTR	0,56±0,05	0,45±0,05	14,20±1,06
EPI	0,50±0,05	0,44±0,06	15,67±1,31
RGS	0,51±0,02	0,47±0,07	15,78±0,65
WGS	0,53±0,07	0,46±0,06	13,17±0,70
CTR-EG	0,29±0,06*	1,70±0,43*	50,51±11,11*
EPI-EG	0,10±0,03 ^a	1,51±0,15*	23,07±2,77 ^a
RGS-EG	0,08±0,03 ^a	1,09±0,15 ^b	34,65±3,15 ^b
WGS-EG	0,04±0,01 ^{a,b}	1,47±0,28*	33,87±2,83 ^b

Los valores se representan mediante la media ± error estándar de la media:

*: valores significativamente diferentes respecto a su grupo no tratado con etilenglicol, p≤0,05.

^a: valores significativamente diferentes respecto a CTR, p≤0,05.

^b: valores significativamente diferentes respecto a EPI, p≤0,05.

Se puede observar una disminución significativa ($p < 0,05$) de la diuresis en todos los grupos tratados con etilenglicol/ NH_4Cl , CTR-EG, EPI-EG, RGS-EG y WGS-EG en relación a sus respectivos grupos no tratados en un 72%, 69%, 49% y 50% respectivamente (ver figura 42).

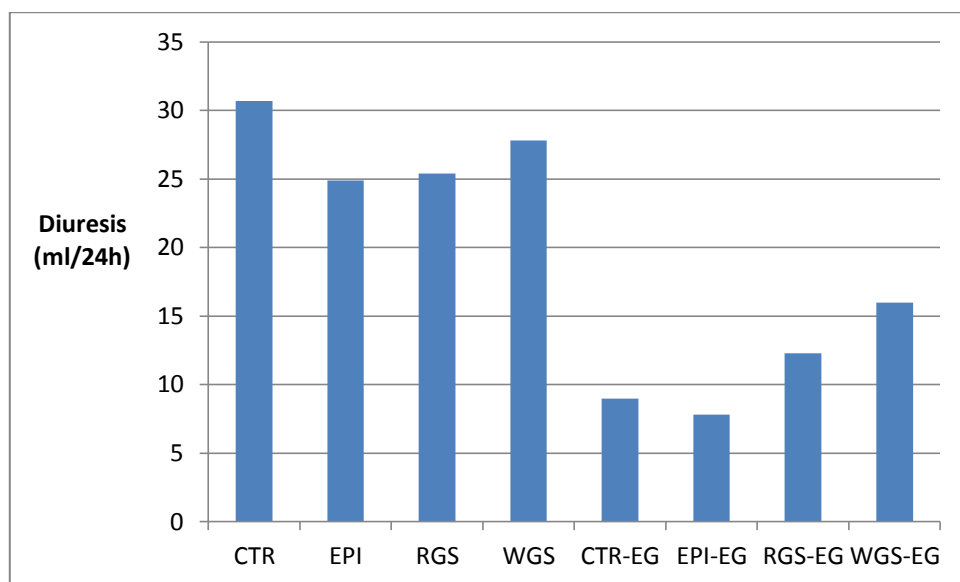


Fig 42. Volumen de orina excretada por los distintos grupos de ratas.

Como es lógico, la concentración de oxalato se vio incrementada en los animales tratados con etilenglicol/ NH_4Cl , siendo estas diferencias estadísticamente significativas (ver figura 43). Además, la concentración de oxalato urinario en los grupos RGS-EG y WGS-EG era mayor que en los grupos CTR-EG y EPI-EG.

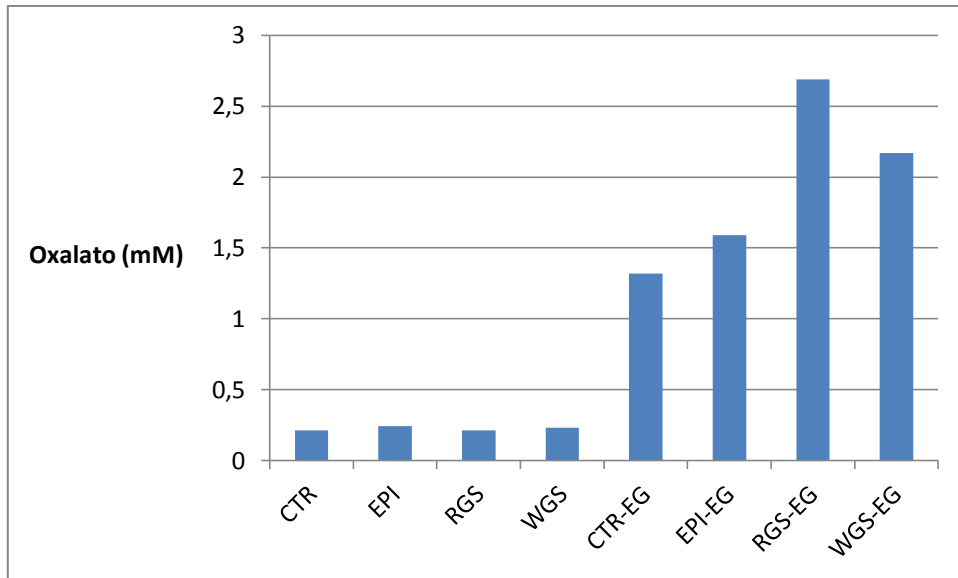


Fig 43. Concentración de oxalato en los distintos grupos.

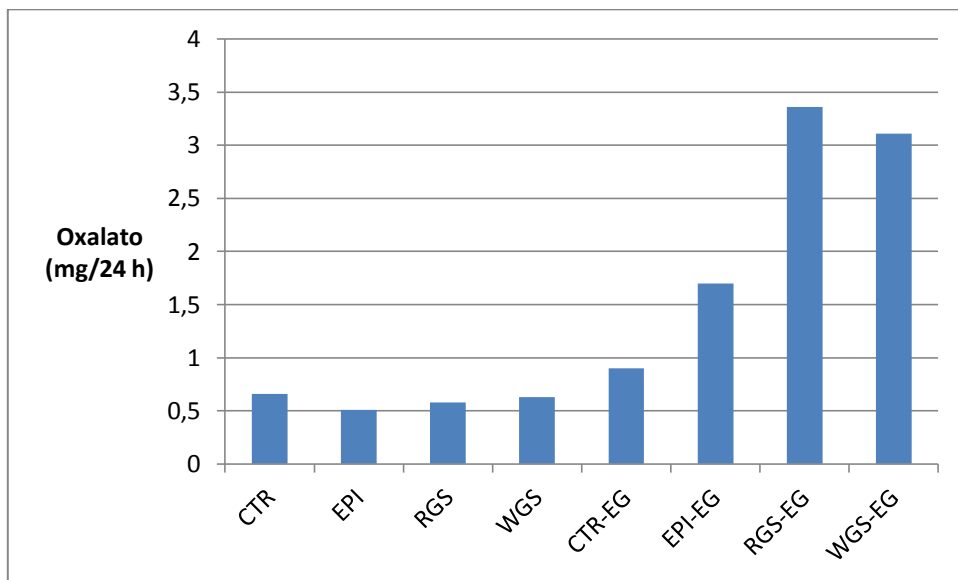


Fig 44. Excreción de oxalato en los distintos grupos.

Respecto a la excreción en mg/24 h de oxalato (figura 44), los grupos tratados con etilenglicol presentaron excreciones más elevadas que sus respectivos grupos sin tratar sin etilenglicol ($p < 0,05$), exceptuando el caso de los grupos CTR y CTR-EG, entre los cuales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a pesar de que el grupo CTR-EG presentó valores ligeramente más elevados. En cambio, sí se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con etilenglicol y el grupo CTR-EG ($p < 0,05$).

También existe un incremento significativo ($p < 0,05$) en las concentraciones de magnesio y fósforo en los grupos tratados con etilenglicol/ NH_4Cl respecto a sus grupos no tratados con EG (ver figuras 45 y 46).

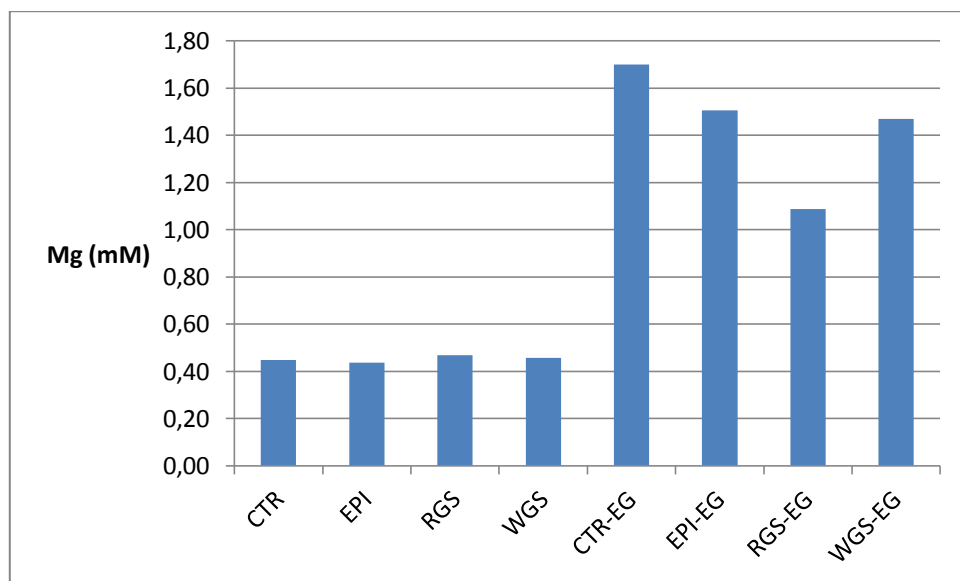


Fig 45. Concentración de magnesio en los distintos grupos.

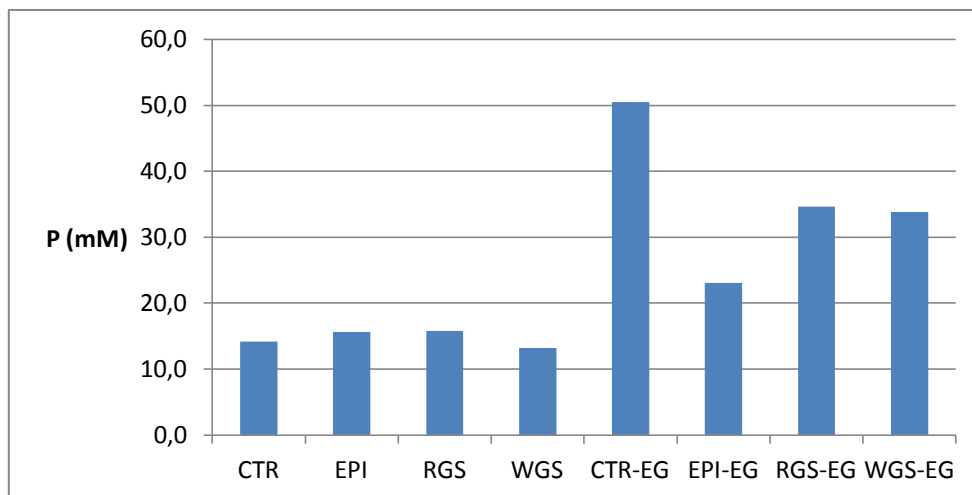


Fig 46. Concentración de fósforo en los distintos grupos.

Es diferente el caso del calcio, ya que su concentración urinaria disminuye significativamente ($p < 0,05$) en los grupos tratados con etilenglicol/ NH_4Cl respecto a sus grupos no tratados (ver figura 47). Como ocurre con los riñones, la concentración de calcio urinario es significativamente inferior en los grupos pre-tratados (EPI-EG, RGS-EG y WGS-EG) respecto a CTR-EG ($p < 0,05$).

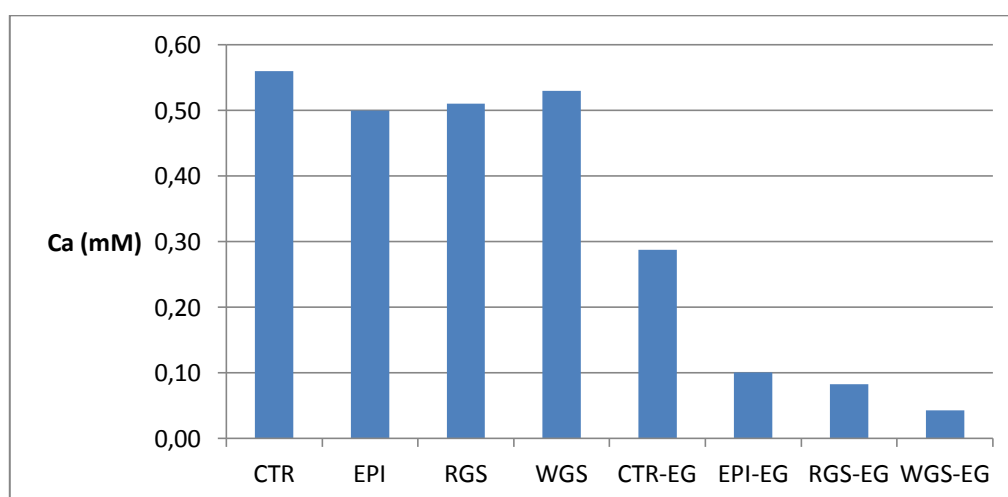


Fig 47. Concentración de calcio en los distintos grupos.

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de creatinina mediante el método de Jaffé, y se calculó el cociente de los parámetros anteriores (Ca, Mg, P y oxalato) y la creatinina. Los resultados se exponen en la tabla 42 y en las figuras 48-53.

TABLA 42. Datos de la concentración y excreción de creatinina y las respectivas relaciones molares de Ca, Mg, P y oxalato con la creatinina.

Grupos	Creatinina (mM)	Creatinina (mg/24 h)	Ca/Creatinina
CTR	3,55±0,21	11,65±0,32	0,19±0,02
CTR-EG	8,49±1,53*	4,03±0,08*	0,03±0,01*
EPI	3,83±0,36	9,32±0,31	0,14±0,01
EPI-EG	5,81±0,58*	6,79±0,32 ^{*a}	0,03±0,01*
RGS	3,23±0,16	9,11±0,34	0,16±0,01
RGS-EG	6,64±0,95*	8,17±0,40 ^a	0,02±0,01 ^{*a}
WGS	3,39±0,15	10,63±0,30	0,18±0,02
WGS-EG	5,77±0,36 ^{*a}	10,09±0,22 ^a	0,01±0,00 ^{*a}

Grupos	Mg/Creatinina	P/Creatinina	Oxalato/Creatinina
CTR	0,15±0,02	3,59±0,25	0,06±0,00
CTR-EG	0,20±0,00	5,59±0,50*	0,17±0,02*
EPI	0,13±0,02	3,85±0,19	0,07±0,01
EPI-EG	0,26±0,00 ^{*a}	3,46±0,50 ^a	0,32±0,03 ^{*a}
RGS	0,16±0,02	4,91±0,16	0,07±0,00
RGS-EG	0,18±0,01 ^a	6,27±0,94*	0,56±0,12 ^{*a}
WGS	0,14±0,02	3,53±0,25	0,07±0,01
WGS-EG	0,25±0,04*	5,83±0,28*	0,38±0,03 ^{*a}

Los valores se representan mediante la media ± error estándar de la media:

*: Diferencias significativas respecto a su grupo no tratado con EG, ($p \leq 0,05$).

^a: Diferencias significativas respecto a CTR-EG ($p \leq 0,05$).

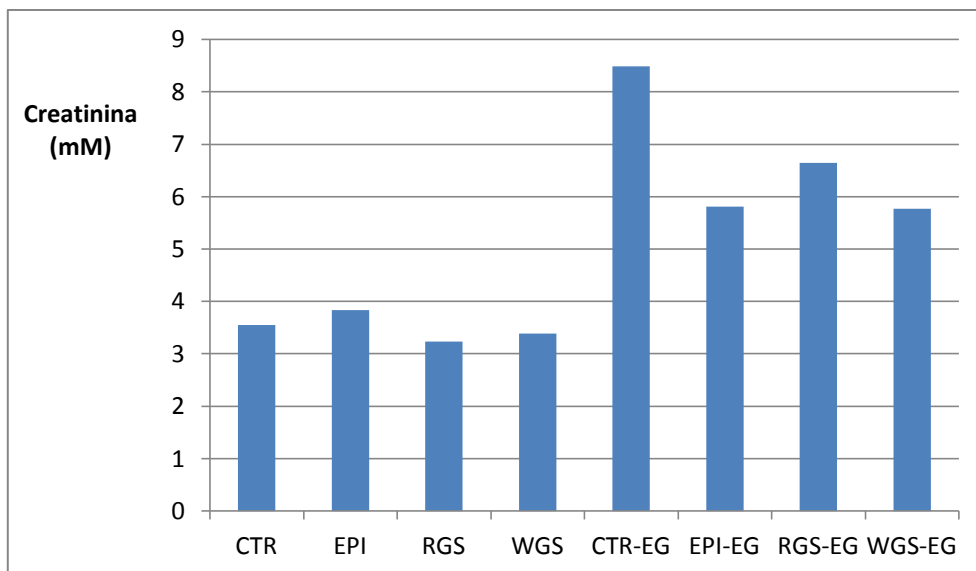


Fig 48. Concentración de creatinina de los diferentes grupos de animales.

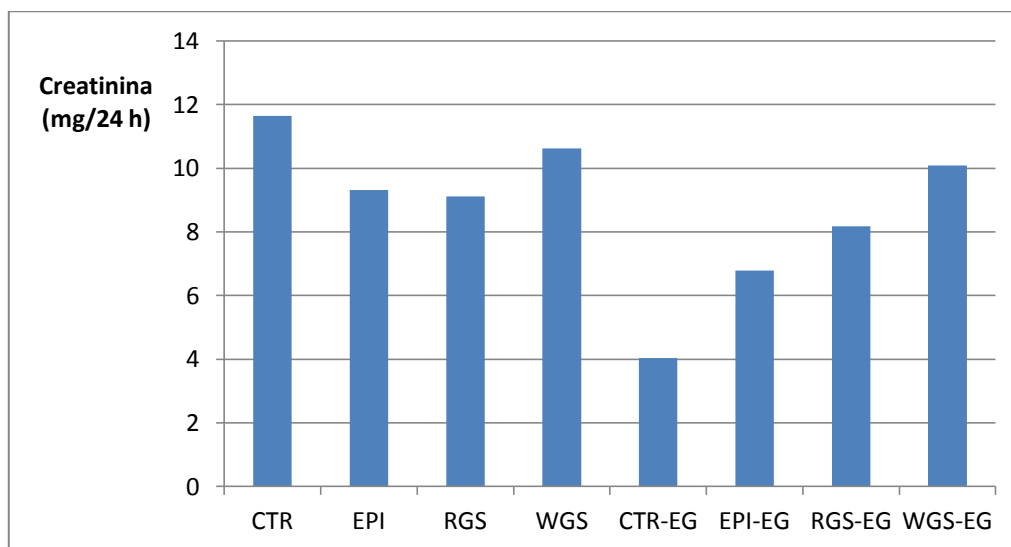


Fig 49. Excreción de creatinina en 24 horas de los diferentes grupos de animales.

La concentración de creatinina es más elevada en los grupos tratados con EG, hasta el punto de existir diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). No obstante, estas diferencias son engañosas, ya que al determinar la excreción, se

observó que estas diferencias desaparecían, exceptuando el grupo CTR-EG, debido a que el volumen de orina excretado por este grupo fue especialmente bajo.

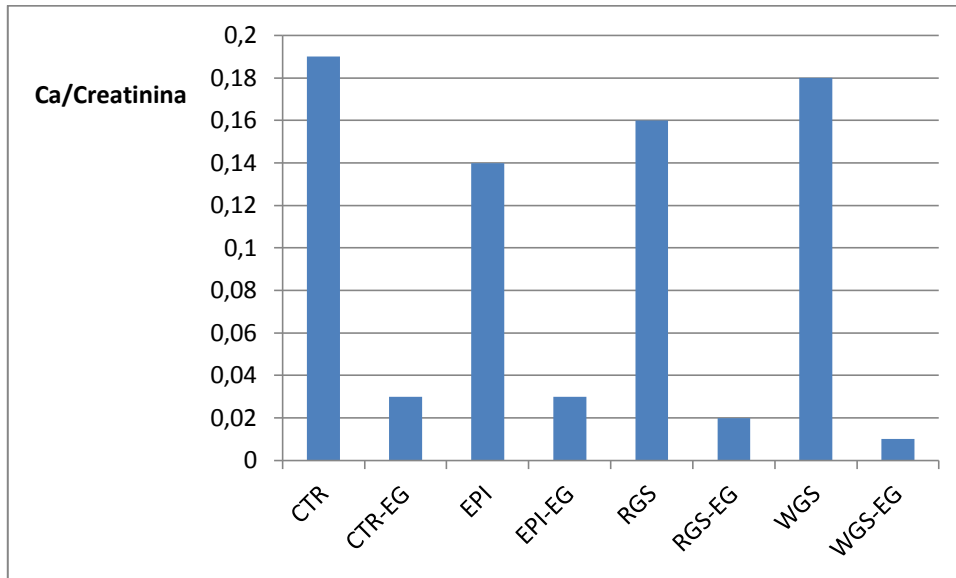


Fig 50. Representación gráfica de la relación molar entre Ca y la creatinina de los diferentes grupos de animales.

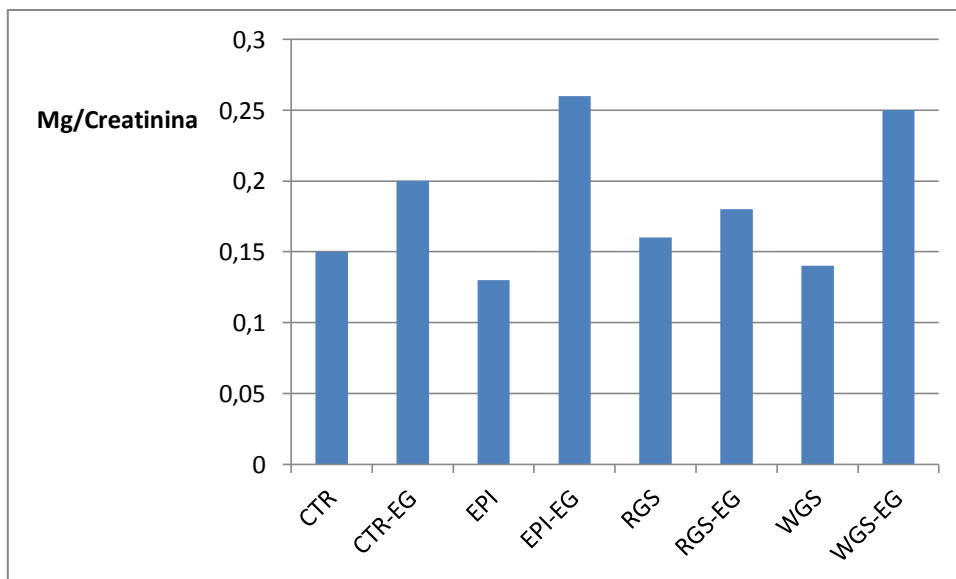


Fig 51. Representación gráfica de la relación molar entre Mg y la creatinina de los diferentes grupos de animales.

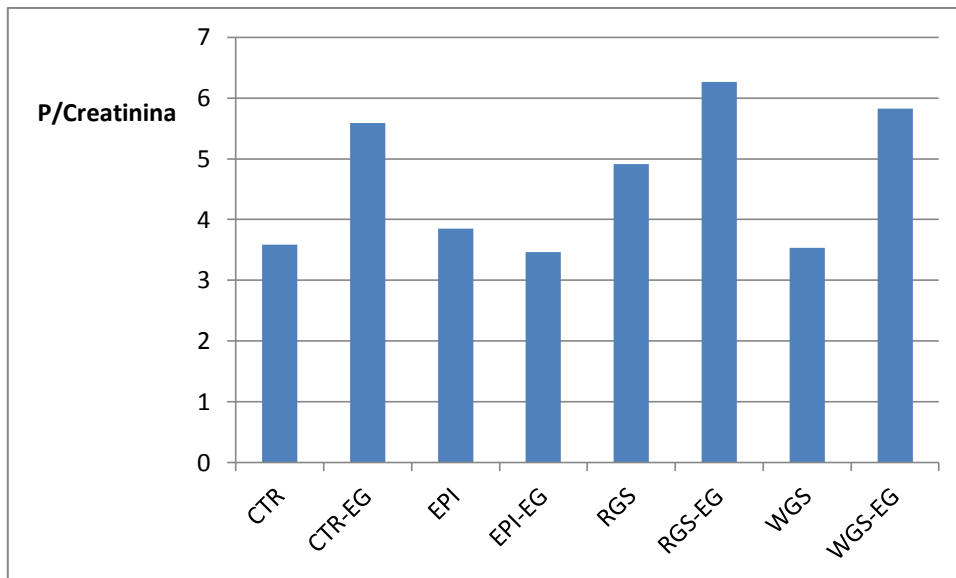


Fig 52. Representación gráfica de la relación molar entre P y la creatinina de los diferentes grupos de animales.

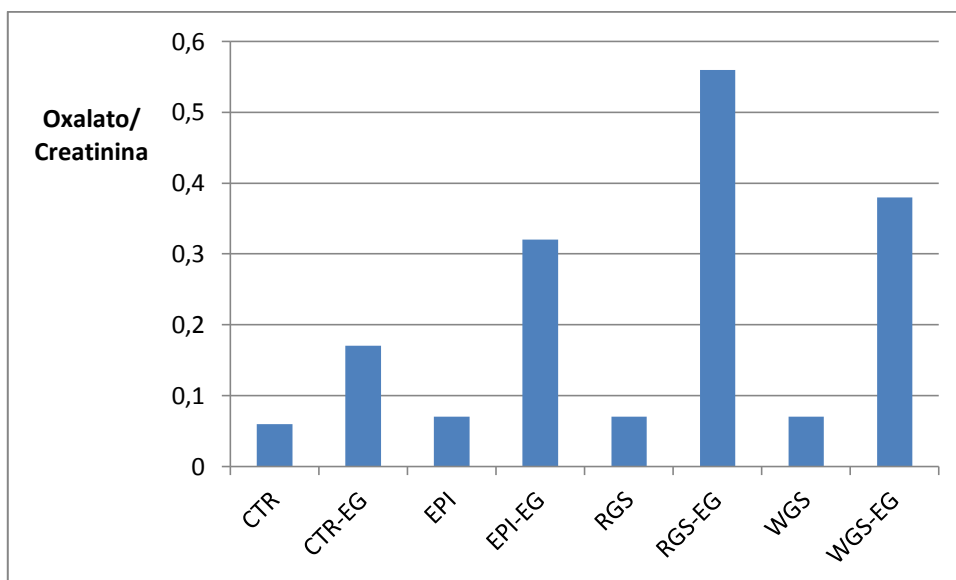


Fig 53. Representación gráfica de la relación molar entre oxalato y la creatinina de los diferentes grupos de animales.

DISCUSIÓN

El efecto litógeno del etilenglicol (EG) debe atribuirse a una lesión oxidativa causada por el elevado nivel de oxalato generado como resultado de la ingestión de EG. Por este motivo, las ratas con EG constituyen un buen modelo para la evaluación de la formación de cálculos papilares de COM. Este hecho se confirma con los resultados de este estudio, ya que la concentración de oxalato urinario es mucho más elevada en los grupos de los animales tratados con EG respecto a los otros grupos.

Los polifenoles son antioxidantes presentes en la dieta. Las fuentes principales son la fruta y los zumos de frutas. Té, vino tinto, verduras, legumbres, cereales y el chocolate también contribuyen a la ingesta total de polifenoles, la cual puede alcanzar la cantidad de 1 g/día en humanos (147). Los estudios que se centran en las propiedades antioxidantes de los polifenoles se han iniciado relativamente hace poco tiempo (1990s). Las evidencias obtenidas hasta la fecha demuestran que los polifenoles contribuyen en la prevención de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y en osteoporosis (148).

En el presente estudio, investigamos los efectos de un polifenol conocido, la epicatequina, en ratas con litiasis renal inducida con EG, en comparación con dos extractos de polifenoles obtenidos de la uva blanca y la uva negra. Durante el pre-tratamiento con los dos extractos polifenólicos, la deposición de calcio en los riñones de ratas tratadas con EG se redujo significativamente hasta niveles del orden de los observados en ratas tratadas con epicatequina. Estos resultados validan claramente la habilidad de los polifenoles para inhibir la calcificación papilar del tejido renal, como

consecuencia del estrés oxidativo, previniendo en consecuencia el desarrollo de cálculos papilares. Estos resultados concuerdan con anteriores descubrimientos sobre los efectos positivos de los polifenoles extraídos del té verde en el daño oxidativo en el riñón de rata (149). Se ha demostrado también que un polifenol del té verde, epigallocatequina-3-galato, mejora la glomerulonefritis mediada por el sistema inmune en ratones (150). El resveratrol reduce la lesión por reperfusión de isquemia renal mediante un mecanismo dependiente de NO en machos de rata Wistar (151). Otros estudios que utilizaron resveratrol revelaron que mejoraba la microcirculación y la protección del epitelio tubular en un modelo de ratas con lesión renal aguda generada por sepsis inducida (152). Otra investigación evaluó el sistema de defensas antioxidantes de riñones de rata después de exposición crónica al vino tinto rico en polifenoles (153). La capacidad antioxidante del plasma se evaluó basándose en la habilidad reductora del hierro (FRAP), y se determinaron los niveles de glutatión reducido (GSH) y de glutatión disulfido (GSSG). El incremento del FRAP y del índice GSH/GSSG se atribuyó a los polifenoles del vino tinto (153).

En esta investigación, las evidencias muestran el efecto protector de los polifenoles, no sólo por los niveles de calcio en el tejido renal, sino también en su excreción urinaria. La concentración de calcio urinario era inferior en los grupos tratados con EG, debido a que la cristalización a nivel renal reducía la excreción de calcio. En cambio, la cristalización no fue un impedimento para que la concentración urinaria de oxalato fuera elevada, ya que la hiperoxaluria fue provocada por la ingesta de EG, mientras que la ingesta de calcio no se modificó. Por otro lado, al observar los valores de excreción de oxalato (mg/24 h), encontramos diferencias significativas entre

todos los grupos, a excepción de los grupos CTR y CTR-EG. En este último caso cabe destacar que la diuresis del grupo CTR-EG resultó ser significativamente inferior al resto, de forma que afectó a la excreción de oxalato en 24 h de manera negativa, y no se puede tener en cuenta este valor, al igual que la comparación del grupo CTR-EG con el resto de grupos tratados con EG, ya que una diuresis similar entre estos grupos probablemente habría variado los resultados. Sin embargo, este hecho podría ser indicativo de que la función renal estaba más afectada en este grupo que en los grupos a los que se administraba el antioxidante conjuntamente con el EG. Este fenómeno supondría que los polifenoles actúan como protectores de la función renal al impedir la cristalización de oxalato cálcico monohidrato papilar. Para confirmar este hecho, se analizaron las concentraciones y las excreciones de creatinina de las ratas, en las que se observa que las concentraciones son más elevadas en los grupos tratados con etilenglicol, aunque esas diferencias no se apreciaron de forma significativa en los grupos RGS-EG y WGS-EG en la excreción, ya que dichos grupos excretaron un volumen de orina inferior a su grupo no tratado con etilenglicol. Además, como la diuresis fue muy inferior en los grupos CTR-EG y EPI-EG, la excreción de creatinina fue significativamente inferior al resto de grupos, a pesar de que su concentración fue más elevada. No obstante, los datos de la diuresis nos indican que la función renal estaba más afectada en los grupos tratados con EG, sobretodo en el grupo CTR-EG, que no recibió ningún antioxidante.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados hasta la fecha, que demuestran el efecto protector de los polifenoles en el tejido renal. Por esta razón, considerando que la lesión del tejido papilar constituye el primer paso en el desarrollo

de cálculos de COM papilar, la acción antioxidante de los polifenoles puede contribuir significativamente a su acción antilitiásica. Evidentemente, los polifenoles no resultan útiles en la prevención de otros tipos de cálculos renales, ya que dependen de otros factores etiológicos, entre los cuales no se encuentra una lesión en la papila provocada por el daño oxidativo, y si existe dicha lesión, se debe a una agresión producida por el propio cálculo ya formado.

3.2. EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES EN EL POTENCIAL REDOX URINARIO EN HUMANOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PRODUCTOS

- Galletas Quely® (Figura 54)

Ingredientes: harina de trigo, aceite de girasol (antioxidante E-320), levadura, aceite de oliva y sal marina.

Valores medios por 100 g de producto:

- Valores energéticos 458 kcal/ 1914 kJ.
- Grasas 19,2 g de las cuales saturadas 2,4 g, monoinsaturadas 5,8 g y poliinsaturadas 11 g.
- Hidratos de carbono 62,4 g de los cuales azúcares 2,8 g.
- Fibra alimentaria 3,4 g.
- Proteínas 8,8 g.
- Sal 1,40 g.



Fig 54. Imagen de un paquete de Quely®.

- Galletas Quelycor® (Figura 55)

Ingredientes: harina de trigo, aceite de girasol alto oleico, aceite de oliva, levadura, sal marina y polifenoles (0,6%). Contiene gluten de trigo.

Valores medios por 100 g de producto:

- Valores energéticos 474 kcal/ 1981 kJ.
- Grasas 20,4 g de las cuales saturadas 2,0 g, monoinsaturadas 15,3 g y poliinsaturadas 2,9 g.
- Hidratos de carbono 62,3 g de los cuales azúcares 3,3 g.
- Fibra alimentaria 3,1 g.
- Proteínas 8,7 g.
- Sodio 0,5 g.
- Polifenoles totales (en eq. mg ácido gálico /Kg) 5441 mg.



Fig 55. Imagen de un paquete de Quelycor®.

2. VOLUNTARIOS

Para este estudio se seleccionaron 46 voluntarios sanos (20 hombres y 26 mujeres) de edades comprendidas entre 18 y 65 años. Fue necesario descartar las muestras de algunos voluntarios, ya que no siguieron correctamente el protocolo de actuación del estudio.

Los criterios de inclusión y exclusión eran, por una parte, no padecer ningún tipo de patología, sea leve o grave, y por lo tanto, que no estuvieran bajo ningún tratamiento farmacológico (ya sea para trastornos agudos o crónicos), y por otra parte no consumir ningún tipo de droga ni complementos antioxidantes de manera habitual o durante el estudio.

Todos ellos entregaron el consentimiento informado por escrito y la institución encargada de revisar el estudio fue el Comité Ético de las Islas Baleares (nº IB 2030/13 PI), que aprobó el proyecto.

3. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN DE LOS VOLUNTARIOS

Una vez seleccionados los participantes, el protocolo (de tres días de duración) que debían seguir para realizar el experimento es el siguiente:

- El primer día, tomar ocho Quelys normales en la cena, las cuales pueden ir acompañadas por otro tipo de alimentos (salvo las excepciones que se mencionarán).
- El segundo día, recoger la primera muestra de orina de la mañana (acumulada durante la noche), para posteriormente medir el potencial redox urinario basal.

- El mismo día, tomar ocho Quelycor (con antioxidantes) en la cena, las cuales también pueden ir acompañadas por otros alimentos, siempre que sean los mismos que los del día anterior.
- El tercer día, volver a recoger la primera muestra de orina de la mañana (acumulada durante la noche), para posteriormente medir el potencial redox urinario.

La dieta que debían seguir los participantes durante el estudio era una dieta libre exceptuando las frutas y los zumos de frutas, cuyo alto contenido en antioxidantes podría interferir en la prueba. Era indispensable que una vez seleccionados los alimentos del primer día, anterior a la primera recogida de muestra, se debía repetir su consumo al día siguiente (anterior a la segunda recogida), para que no hubiera ningún tipo de influencia en la prueba que pudiera deberse a los cambios en la dieta.

También se debían evitar los complejos vitamínicos, por sus propiedades antioxidantes, y la realización de actividad física intensa, ya que el ejercicio físico provoca estrés oxidativo, de forma que también interferiría en la prueba.

4. MEDIDA DEL POTENCIAL REDOX URINARIO

El método utilizado para la valoración del estado oxidativo de los voluntarios incluidos en el estudio fue la determinación del potencial redox urinario (ver detalles en el capítulo 1) mediante un potenciómetro Crison, con un electrodo de platino como electrodo funcional y un electrodo sobresaturado de calomelanos como electrodo de

referencia. En este caso, la medida del potencial redox urinario se efectuó dos veces para cada voluntario, ya que cada participante proporcionaría dos muestras de orina diferentes, de acuerdo con el protocolo explicado anteriormente.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El test que se utilizó para el análisis estadístico de este estudio fue el test para datos emparejados proporcionado por Windows, ya que es la prueba que evalúa las diferencias entre dos datos distintos que corresponden a una misma muestra poblacional. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados de las medidas de los valores del potencial redox urinario que se obtuvieron fueron de $17,43 \pm 2,56$ mV para las muestras del potencial redox basal, y de $11,70 \pm 2,89$ mV para las muestras del potencial redox después del consumo de un alimento rico en antioxidantes. Estos resultados suponen que los polifenoles de las galletas redujeron la media del potencial redox urinario en un 33%. Los resultados de potencial redox, las muestras basal y con antioxidantes se pueden observar en la tabla 43 y la diferencia entre ellas se refleja en la figura 56.

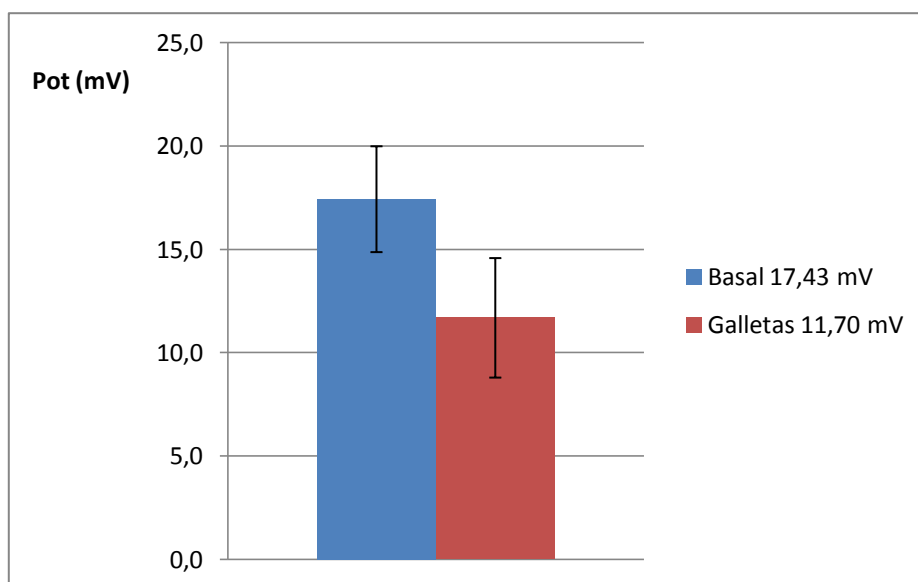


Fig 56. Potencial redox urinario basal y después de ingerir las galletas con antioxidantes de 46 voluntarios.

TABLA 43. Diferencias entre el potencial redox basal y después de ingerir las galletas con antioxidantes en las muestras analizadas.

VOLUNTARIO	POTENCIAL BASAL (mV)	POTENCIAL ANTIOXIDANTES(mV)
1	27	17
2	32	30
3	52	44
4	28	8
5	14	8
6	26	27
7	30	22
8	-14	-32
9	41	20
10	29	20
11	36	33
12	35	27
13	18	15
14	-2	-7
15	27	10
16	30	25
17	56	50
18	21	12
19	14	9
20	20	19
21	30	33
22	29	18
23	3	-5
24	27	24
25	31	17
26	-9	-20
27	40	20
28	-9	-64
29	11	10
30	18	-2
31	15	11
32	-8	-2
33	15	-1
34	30	24
35	12	14
36	8	9
37	-8	-5
38	23	34
39	3	11
40	19	22
41	10	18
42	-4	4
43	10	6
44	-20	-18
45	1	13
46	5	10

Al realizar el estudio estadístico mediante el test de datos emparejados, se obtuvo un valor de $p < 0,001$ lo que hizo que las diferencias se consideraran estadísticamente significativas.

Respecto a la distribución de la edad de los voluntarios, la franja de edad que predomina es entre 18 y 29 años, debido a los criterios de inclusión y exclusión (mencionados anteriormente), ya que es el intervalo en el que se pudieron encontrar más personas sanas y que no recibieran ningún tipo de tratamiento farmacológico. No obstante, se consiguió que hubiera participantes de todas las edades de 18 a 65 años. El número de participantes por cada intervalo de edad se muestra en la tabla 44.

TABLA 44. Distribución de la edad de los participantes

Edad (años)	Número Individuos
18-29	21
30-39	6
40-49	8
50-59	9
60-65	2

n=46

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los polifenoles extraídos de la uva negra contenidos en las galletas Quelycor® son útiles para reducir de forma significativa el potencial redox urinario, es decir, que este tipo de alimento se puede utilizar para reforzar las dietas antioxidantes para combatir el estrés oxidativo. De esta manera, los polifenoles se podrían utilizar para combatir las enfermedades derivadas del aumento del estrés oxidativo (como las que se mencionan en la introducción), entre las que encontramos la litiasis renal con formación de cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilar.

Como se ha mencionado en la introducción, esta conclusión no se aplicaría exclusivamente a estas galletas y a estos polifenoles, sino que una dieta continuada basada en nutrientes antioxidantes, puede servir a la larga para prevenir en mayor o menor medida cualquier tipo de patología derivada del estrés oxidativo.

En este caso en concreto, queda abierta la posibilidad de realizar estudios más amplios en pacientes de diversas patologías, para evaluar si realmente el consumo regular de este suplemento de polifenoles, al disminuir el estrés oxidativo, es también capaz de aminorar o incluso prevenir la reaparición de las enfermedades relacionadas con el aumento del estado oxidativo de los pacientes.

CONCLUSIONES

1. La medida del potencial redox urinario ha demostrado ser efectiva para la evaluación del estrés oxidativo, ya que es un método más rápido, sencillo y eficaz que otros métodos. Además, no requiere técnicas invasivas para la obtención de la muestra.

2. El estrés oxidativo medido mediante el potencial redox urinario se ve claramente incrementado y de forma significativa en los pacientes con ansiedad y depresión, como muestran los valores del potencial redox urinario en los individuos cuyos resultados en los cuestionarios STAI y BDI fueron elevados en comparación con los voluntarios sanos en los que los resultados de los cuestionarios fueron más bajos, de manera que se confirma el papel del estrés oxidativo en estos trastornos.

3. El potencial redox en la orina presenta valores claramente más elevados en el grupo de pacientes con litiasis papilar de oxalato cálcico monohidrato, que en el grupo de individuos sanos y que el grupo de pacientes con litiasis de oxalato cálcico dihidrato, lo que confirma que los cálculos papilares de oxalato cálcico monohidrato se originan debido a un aumento del estrés oxidativo, que a su vez se relaciona con el desarrollo de lesiones del tejido de la papila renal.

4. Los polifenoles como la epicatequina o bien en forma de extractos del grano de uva negra o uva blanca, disminuyen significativamente el desarrollo de calcificaciones a nivel de la papila renal, en ratas en las que se ha inducido litiasis renal papilar mediante etilenglicol. Este hecho demuestra la importancia de los antioxidantes en el tratamiento de la litiasis renal papilar inducida por agentes citotóxicos.

5. Una dieta rica en polifenoles de la uva, es capaz de reducir significativamente el potencial redox urinario, de forma que reduce el estrés oxidativo.

6. Al reducir el estrés oxidativo, una dieta rica en antioxidantes puede ser útil a la hora de prevenir y/o tratar enfermedades derivadas del mismo, como es el caso de la litiasis renal con cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilar, la ansiedad y la depresión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna* 18: 326-335, 2001
2. Tur JA. Los antioxidantes en la Dieta Mediterránea. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 10: 198-207, 2004
3. Castillo R, Huerta P, Carrasco R, Rodrigo R. Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL* 8: 43-52, 2003
4. Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84: 1-7, 2005
5. Mathews, van Holde. *Bioquímica*. 2ª Edición. Ed McGraw Hill. 1998. Madrid
6. Deng Q, Harvie EA, Huttenlocher A. Distinct signaling mechanisms mediate neutrophil attraction to bacterial infection and tissue injury. *Cell Microbiol* 14: 517-528, 2012
7. Cisneros E. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cub Invest Biomed* 14: 1-5, 1995
8. Zal F, Mostafavi-Pour Z, Amini F, Heidari A. Effect of vitamin E and C supplements on lipid peroxidation and GSH-dependent antioxidant enzyme status in the blood of women consuming oral contraceptives. *Contraception* 86: 62-66, 2012

9. Mancuso C, Barone E, Guido P, Miceli F, Di Domenico F, Perluigi M, Santangelo R, Preziosi P. Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation by endogenous and exogenous antioxidants in rat brain microsomes in vitro. *Neurosci Lett* 518: 101-105, 2012
10. Kinnunen P, Kaarniranta K, Mahalka A. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: From biophysics to clinical correlations. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2446-2455, 2012
11. Srinivas A, Jagannohan Rao P, Selvan G, Goparaju A, Balakrishna Murthy P, Neelakanta Reddy P. Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. *Hum Exp Toxicol* 31: 1113-1131, 2012
12. Widera D, Müller J, Imielski Y, Heimann P, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. Methods for the modulation and analysis of NF- κ B-dependent adult neurogenesis. *J Vis Exp* 84: e50870 doi: 10.3791/50870, 2014
13. Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828, 1995
14. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol* 62: 1161-1178, 2009.
15. Yang M, Huang C, Chan K, Yang Y, Peng C, Wang C. Mulberry Leaf Polyphenols Possess Antiatherogenesis Effect via Inhibiting LDL Oxidation and Foam Cell Formation. *J Agric Food Chem* 59: 1985-1995, 2011
16. Guyton-Hall. *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª Edición. Ed McGraw Hill. 2001. Madrid

17. Frombaum M, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie* 94: 269-276, 2012
18. Jamuna Rani A, Mythili S. Study on total antioxidant status in relation to oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Diagn Res* 8: 108-110, 2014
19. Carillon J, Knabe L, Montalban A, Stevant M, Keophiphat M, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM. Curative diet supplementation with a melon superoxide dismutase reduces adipose tissue in obese hamsters by improving insulin sensitivity. *Mol Nutr Food Res* 58: 842-850, 2014
20. De la Iglesia R, Lopez-Legarrea P, Abete I, Bondia-Pons I, Navas-Carretero S, Forga L, Martinez JA, Zulet MA. A new dietary strategy for long-term treatment of the metabolic syndrome is compared with the American Heart Association (AHA) guidelines: the Metabolic Syndrome Reduction in Navarra (RESMENA) project. *Br J Nutr* 111: 643-652, 2014
21. Elnakish M, Hassanain H, Janssen P, Angelos M, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol* 231: 290-300, 2013
22. Yen CH, Yang NC, Lee BJ, Lin JY, Hsia S, Lin PT. The antioxidant status and concentrations of coenzyme Q10 and vitamin E in metabolic syndrome. *Sci World J* 2013: 767968-767981, 2013

23. Bornhoeft J, Castaneda D, Nemoseck T, Wang P, Henning SM, Hong MY. The protective effects of green tea polyphenols: lipid profile, inflammation, and antioxidant capacity in rats fed an atherogenic diet and dextran sodium sulfate. *J Med Food* 15: 726-732, 2012
24. Lee WL, Huang JY, Shyur LF. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 925804-925852, 2013.
25. Baba Y, Sonoda J, Hayashi S, Tosuji N, Sonoda S, Makisumi K, Nakajo M. Reduction of oxidative stress in liver cancer patients by oral green tea polyphenols tablets during hepatic arterial infusion chemotherapy. *Exp Ther Med* 4: 452-458, 2012
26. Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48: 197-216, 2011
27. Yang CS, Li G, Yang Z, Guan F, Chen A, Ju J. Cancer prevention by tocopherols and tea polyphenols. *Cancer Lett* 334: 79-85, 2013.
28. Wang P, Vadgama J, Said JV, Magyar CE, Doan N, Heber D, Henning SM. Enhanced inhibition of prostate cancer xenograft tumor growth by combining quercetin and green tea. *J Nutr Bioch* 25: 73-80, 2014
29. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* 12: 931-947, 2013.
30. Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Rubinstein D, Viole G, Stefler-Stevenson W. Dietary intake of a plant phospholipid/lipid conjugate reduces lung cancer growth and tumor angiogenesis. *Carcinogen* 35: 1556-1563, 2014

31. Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, Zuo Y, Lei L, Ma KY, Huang Y, Chen ZY. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int* 2014: 831841-831873, 2014
32. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci* 58: 85-90, 2010
33. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* 302: 71-83, 2010
34. Sivaranjani N, Venkata Rao S, Rajeev G. Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J Clin Diagn Res* 7: 2683-2685, 2013
35. Wölfle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schemp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 50: 1081-1093, 2011
36. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97: 1634-1658, 2006
37. Degos V, Peineau S, Nijboer C, Kaindl AM, Sigaut S, Favrais G, Plaisant F, Teissier N, Gouadon E, Lombet A, Saliba E, Collingridge GL, Maze M, Nicoletti F, Heijnen C, Mantz J, Kavelaars A, Gressens P. G protein-coupled receptor kinase 2 and group I metabotropic glutamate receptors mediate inflammation-induced sensitization to excitotoxic neurodegeneration. *Ann Neurol* 75: 667-678, 2013

38. Gaweda-Walerych K, Zekanowski C. The impact of mitochondrial DNA and nuclear genes related to mitochondrial functioning on the risk of Parkinson's disease. *Curr Genomics* 14: 543-559, 2013
39. Minhas G, Modgil S, Anand A. Role of iron in ischemia-induced neurodegeneration: mechanisms and insights. *Metab Brain Dis.* 29: 583-91, 2014.
40. Naziroglu M, Cig B, Ozgul C. Modulation of oxidative stress and Ca(2+) mobilization through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neuron by *Hypericum perforatum*. *Neurosci* 28: 27-35, 2014
41. Mousseau DD, Baker GB. Recent developments in the regulation of monoamine oxidase form and function: is the current model restricting our understanding of the breadth of contribution of monoamine oxidase to brain dysfunction? *Curr Top Med Chem* 12: 2163-2176, 2012
42. Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 73: 14-29, 2014
43. Zhong Y, Dong G, Luo H, Cao J, Wang C, Wu J, Feng YQ, Yue J. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicol* 302: 275-84, 2012

44. Annese V, Herrero MT, Di Pentima M, Gomez A, Lombardi L, Ros CM, De Pablos V, Fernandez-Villalba E, De Stefano ME. Metalloproteinase-9 contributes to inflammatory glia activation and nigro-striatal pathway degeneration in both mouse and monkey models of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinsonism. *Brain Struct Funct* 10: 429-453, 2014
45. Chiu LY, Ho FM, Shiah SG, Chang Y, Lin WW. Oxidative stress initiates DNA damager MNNG induced poly(ADP-ribose)polymerase-1-dependent parthanatos cell death. *Biochem Pharmacol* 81: 459-70, 2011
46. Guo F, Jin WL, Li LY, Song WY, Wang HW, Gou XC, Mi YJ, Wang Q, Xiong L. M9, a novel region of amino-Nogo-A, attenuates cerebral ischemic injury by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in mice. *CNS Neurosci Ther* 19: 319-28, 2013
47. Vandervelt GM, Regan RF. The neurotoxic effect of sickle cell hemoglobin. *Free Radic Res* 38: 431-7, 2004
48. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neuroscience Research* 68: 261-275, 2010
49. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11: 851-76, 2008
50. Gardner A, Johansson A, Wibom R, Nennesmo I, von Döbeln U, Hagenfeldt L, Hällström T. Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J Affect Disord* 76: 55-68, 2003

51. Flatscher-Bader T, van der Brug M, Hwang JW, Gochee PA, Matsumoto I, Niwa S, Wilce PA. Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics. *J Neurochem* 93: 359-370, 2005
52. Denis MC, Furtos A, Dudonné S, Montoudis A, Garofalo C, Desjardins Y, Delvin E, Levy E. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *Plos One* 8: 1-17, 2013
53. Abbas S, Schaalán M, Bahgat A, El-Denshary E. Possible potentiation by certain antioxidants of the anti-inflammatory effects of diclofenac in rats. *Sci World J* 12: 731462-731482, 2014
54. Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ, Pentney R, Snell LD, Tabakoff B, Zou J, Noronha A. Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin Exp Res* 28: 350-364, 2004
55. Caro AA, Cederbaum AI. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid- mediated cytotoxicity. *Free Radic Biol* 40: 364-375, 2006
56. Bazan Ng. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 136-141, 2007
57. Sukanuma H, Arai Y, Kitamura Y, Hayashi M, Okumura A, Shimizu T. Maternal docosahexanoic acid-enriched diet prevents neonatal brain injury. *Neuropathol* 30: 597-605, 2010
58. Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yeziarski RP. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappa β activation. *J Neurosci* 18: 3251-3260, 1998

59. Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Bauerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappa β is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 94: 2642-2647, 1997
60. Davis RL, Syapin PJ. Ethanol increases nuclear factor-kappa β activity in human astroglial cells. *Neurosci Lett* 371: 128-132, 2004
61. Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety. *Oxid Med Cell Longev* 2: 63-67, 2009
62. Alcocer-Gomez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, Núñez-Vasco J, Sánchez-Alcazar JA, Fernández-Rodríguez A, Cordero MD. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 36: 111-117, 2014
63. Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, Goehler L, Brzeszcz J. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative and nitrosative stress pathways. *Neuro Endocrinol Lett* 32: 7-24, 2011
64. Schuch FB, Vasconcelos-Moreno MP, Borowsky C, Zimmermann AB, Wollenhaupt-Aguiar B, Ferrari P, de Almeida Fleck MP. The effects of exercise on oxidative stress (TBARS) and BDNF in severely depressed inpatients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 264: 605-613, 2014
65. Siwek M, Sowa-Kucma M, Dudek D, Styczeń K, Szewczyk B, Kotarska K, Misztak P, Pilc A, Wolak M, Nowak G. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep* 65: 1558-1571, 2013

66. Anderson G, Kubera M, Duda W, Lasoń W, Berk M, Maes M. Increased IL-6 trans-signaling in depression: focus on the tryptophan catabolite pathway, melatonin and neuroprogression. *Pharmacol Rep* 65: 1647-1654, 2013
67. Zhang G, Zhao MS, Xia RH, Wang YH, Zhang GH. Relationship between oxidative stress and depression in patients with rheumatoid arthritis. *Beijing Da Xue Xue Bao* 44: 199-203, 2012
68. Stafford L, Berk M. The use of statins after a cardiac intervention is associated with reduced risk of subsequent depression: proof of the concept for the inflammatory and oxidative hypotheses of depression? *J Clin Psychiatry* 72: 1229-35, 2011
69. Kovacic P, Somanathan R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuropharmacol* 10: 289-302, 2012
70. Khurana DS, Valencia I, Goldenthal MJ, Legido A. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Semin Pediatr Neurol* 20: 176-87, 2013
71. Rumià J, Marmol F, Giménez-Crouseilles J, Carreño M, Bargalló N, Boget T, Pintor L, Setoain X, Donaire A, Saez GT, Ribalta T, Ferrer E, Puig-Parellada P. Oxidative stress markers in the neocortex of drug-resistant epilepsy patients submitted to epilepsy surgery. *Epilepsy Res* 107: 75-81, 2013
72. Tillement JP, Papadopoulos V. Subcellular injuries in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13: 593-605, 2013

73. Chang Y, Kong Q, Tian G, Ilieva H, Cleveland DW, Rothstein JD, Borchelt DR, Wong PC, Lin CL. Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS ONE* 3: 2849-2878, 2008
74. Marlatt M, Lee HG, Perry G, Smith MA, Zhu X. Sources and mechanisms of cytoplasmic oxidative damage in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp* 64: 81-87, 2004
75. Butterfield DA, Perluigi M, Sultana R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain new insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol* 545: 39-50, 2006
76. Aliev G, Palacios H, Gasimov E, Obrenovich M, Morales L, Leszek J, Bragin V, Solís Herrera A, Gokhman D. Oxidative stress induced mitochondrial failure and vascular hyperfusion as a key initiator for the development of Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals* 3: 158-187, 2010
77. Sesti F, Liu S, Cai SQ. Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration. *Trends Cell Biol* 20: 45-51, 2009
78. Hashim A, Wang L, Juneja K, Ye Y, Zhao Y, Ming LJ. Vitamin B6s inhibit oxidative stress caused by Alzheimer's disease-related Cu(II)- β -amyloid complexes-cooperative action of phosphor-moiety. *Bioor Med Chem Lett* 21: 6430-6432, 2011
79. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 3: 461-91, 2013
80. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 7: 1914-1924, 2011

81. Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. Unraveling the complexity of neurodegeneration in brain of subjects with Down Syndrome: insights from proteomics. *Proteomics Clin Appl* 8: 73-85, 2013
82. Pallardo FV, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Zatterale A, Calzone R, Castello G, Fernandez-Delgado R, Dunster C, Lloret A, Manini P, Pisanti MA, Vuttariello E, Pagano G. Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down Syndrome patients. *Biogerontol* 7: 211-220, 2006
83. Lim D, Fedrizzi L, Tartari M, Zuccato C, Cattaneo E, Brini M, Carafoli E. Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J Biol Chem* 283: 5780-5789, 2008
84. Gonzalez-Pinto A, Martinez-Cengotitabengoa M, Arango C, Baeza I, Otero-Cuesta S, Graell-Berna M, Soutullo C, Leza JC, Micó JA. Antioxidant defense system and family environment in adolescents with family history of psychosis. *BMC Psychiatry* 12: 200-214, 2012
85. Yang Li C, Liang Deng Y, Hua Sun B. Taurine protected kidney from oxidative injury through mitochondrial-linked pathway in a rat model of nephrolithiasis. *Urol Res* 37: 211-220, 2009
86. Ouyang J, Yao Q, Tan J, Wang F. Renal epithelial cell injury and its promoting role in formation of calcium oxalate monohydrate. *J Biol Inorg Chem* 16: 405-416, 2011

87. Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo' C, Martini D, Campolo J, Vendrame S, Møller P, Loft S, De Maria R, Porrini M. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur J Nutr* 52: 949-961, 2013
88. Bian S, Gao Y, Zhang M, Wang X, Liu W, Zhang D, Huang G. Dietary nutrient intake and metabolic syndrome risk in Chinese adults: a case-control study. *Nutr J* 12: 106-124, 2013
89. Anuzzi G, Bozzetto L, Costabile G, Giacco R, Mangione A, Anniballi G, Vitale M, Vetrani C, Cipriano P, Della Corte G, Pasanisi F, Riccardi G, Rivellese AA. Diets naturally rich in polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 99: 463-471, 2014
90. Mielgo-Ayuso J, Barrenechea L, Alcorta P, Larrarte E, Margareto J, Labayen I. Effects of dietary supplementation with epigallocatechin-3-gallate on weight loss, energy homeostasis, cardiometabolic risk factors and liver function in obese women: randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Brit J Nutr* 111: 1263-1271, 2014
91. Ibraheem ZO, Satar M, Abdullah NA, Rathore H, Tan YC, Uldin F, Basri R, Abdullah MH, John E. Antioxidant and cardio protective effect of palm oil leaves extract (standardized ethanolic fraction) in rats model of saturated fats induced metabolic disorders. *Pak J Pharm Sci* 27: 1-9, 2014

92. Boshtam M, Asgary S, Moshtaghian J, Naderi G, Jafari-Dinani N. Impacts of fresh lime juice and peel on atherosclerosis progression in an animal model. *Atheroscler* 9: 357-361, 2013
93. Durkar AM, Patil RR, Naik SR. Hypolipidemic and antioxidant activity of ethanolic extract of *Symplocos racemosa* Roxb. in hyperlipidemic rats: an evidence of participation of oxidative stress in hyperlipidemia. *Indian J Exp Biol* 52: 36-45, 2014
94. Wallert M, Schmözl L, Galli F, Birringer M, Lorkowski S. Regulatory metabolites of vitamin E and their putative relevance for atherogenesis. *Redox Biol* 2: 495-503, 2014
95. Romain C, Bresciani L, Gaillet S, Feillet-Coudray C, Calani L, Bonafos B, Vidé J, Rugani N, Ramos J, Del Rio D, Cristol JP, Rouanet JM. Moderate chronic administration of Vineatrol-enriched red wines improves metabolic, oxidative, and inflammatory markers in hamsters fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 58: 1212-1225, 2014
96. Loke WM, Proudfoot J, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft KD. Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 749-757, 2010
97. Peluso I, Romanelli L, Palmery M. Interactions between prebiotics, probiotics, polyunsaturated fatty acids and polyphenols: diet or supplementation for metabolic syndrome prevention? *Int J Food Sci Nutr* 65: 259-267, 2014

98. Ali-Hassan-Sayegh S, Mirhosseini S, Rezaeisadrabadi M, Dehghan HR, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Popov AF, Liakopoulos OJ. Antioxidant supplementations for prevention of atrial fibrillation after cardiac surgery: an updated comprehensive systematic review and meta-analysis of 23 randomized controlled trials. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 18: 646-654, 2014
99. Kostyuk V, Potapovich A, Suhan T, de Luca C, Korkina L. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *Eur J Pharmac* 658: 248-256, 2011
100. Borriello A, Bencivenga D, Caldarelli I, Tramontano A, Borgia A, Zappia V, Della Ragione F. Resveratrol: from basic studies to bedside. *Cancer Treat Res* 159: 167-184, 2014
101. Singh R, Akhtar N and Haqqi T. Green tea polyphenol epigallocatechi-3-gallate: inflammation and arthritis. *Life Sci* 86: 907-918, 2010
102. Carr AC, Vissers MC, Cook J. Relief from cancer chemotherapy side effects with pharmacologic vitamin C. *N Z Med J* 127: 66-70, 2014
103. Guo W, Kong E, Meydani M. Dietary polyphenols, inflammation and cancer. *Nutr Cancer* 61: 807-810, 2009
104. Khuda-Bukhsh AR, Das S, Saha SK. Molecular approaches toward targeted cancer prevention with some food plants and their products: inflammatory and other signal pathways. *Nutr Cancer* 66: 194-205, 2014
105. Hu G, Zhang L, Rong Y, Ni X, Sun Y. Downstream carcinogenesis signaling pathways by green tea polyphenols: a translational perspective of chemoprevention and treatment for cancers. *Curr Drug Metab* 15: 14-22, 2014

106. Henning SM, Wang P, Carpenter CL, Heber D. Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenom* 5: 729-741, 2013
107. Sahpazidou D, Geromichalos GD, Stagos D, Apostolou A, Haroutounian SA, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN, Hayes AW, Kouretas D. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicol Lett* 4274: 62-69, 2014
108. Mazue F, Delmas D, Murillo G, Saleiro D, Limagne E, Latruffe N. Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis. *Food Funct* 5: 663-670, 2014
109. Vuong QV, Hirun S, Phillips PA, Chuen TL, Bowyer MC, Goldsmith CD, Scarlett CJ. Fruit-derived phenolic compounds and pancreatic cancer: perspectives from Australian native fruits. *J Ethnopharmacol* 152: 227-242, 2014
110. Giudice A, Crispo A, Massimiliano G, D'Arena G, Tecce MF, Grimaldi M, Amore A, Esposito E, Montella M. Metabolic syndrome, insulin resistance, circadian disruption, antioxidants and pancreatic carcinoma: an overview. *J Gastrointestin Liver Dis* 23: 73-77, 2014
111. Barron C, Moore J, Tsakiridis T, Pickering G, Tsiani E. Inhibition of human lung cancer cell proliferation and survival by wine. *Cancer Cell Int* 14: 6-19, 2014
112. Yuan JM. Cancer prevention by green tea: evidence from epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 98: 1676-1681, 2013
113. Abbas A, Patterson W 3rd, Georgel PT. The epigenetic potentials of dietary polyphenols in prostate cancer management. *Biochem Cell Biol* 91: 361-368, 2013

114. Noratto G, Porter W, Byrne D, Cisneros-Zevallos L. Polyphenolics from peach (*Prunus persica* var. Rich Lady) inhibit tumor growth and metastasis of MDA-MB-435 breast cancer cells in vivo. *J Nutr Biochem* 2863: 23-59, 2014
115. Crawford S. Anti-inflammatory/antioxidant use in long-term maintenance cancer therapy: a new therapeutic approach to disease progression and recurrence. *Ther Adv Med Oncol* 6: 52-68, 2014
116. Moreno-Macias H, Romieu I. Effects of antioxidant supplements and nutrients on patients with asthma and allergies. *J Allergy Clin Immunol* 133: 1237-1244, 2014
117. Santus P, Corsico A, Solidoro P, Braido F, Di Marco F, Scichilone N. Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. *COPD* 00: 1-13, 2014
118. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY, Lanaspa MA. Sugar, uric acid and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes* 62: 3307-3315, 2013
119. Mazloom Z, Ekramzadeh M, Hejazi N. Efficacy of supplementary vitamins C and E on anxiety, depression and stress in type 2 diabetic patients: a randomized, single-blind, placebo-controlled trial. *Pak J Biol Sci* 16: 1597-1600, 2013
120. Wahlqvist ML. Antioxidant relevance to human health. *Asia Pac J Clin Nutr* 22: 171-176, 2013
121. Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46: 214-223, 2013

122. Allam F, Dao AT, Chugh G, Bohat R, Jafri F, Patki G, Mowrey C, Asghar M, Alkadhi KA, Salim S. Grape powder supplementation prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior, memory impairment, and high blood pressure in rats. *J Nutr* 143: 835-842, 2013
123. Berk M, Ng F, Dean O, Dodd S, Bush AI. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends Pharmacol Sci* 29: 346-351, 2008
124. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 18: 567-579, 2007
125. Holoch PA, Tracy CR. Antioxidants and self-reported history of kidney stones: the National Health and Nutrition Examination Survey. *J Endourol* 25: 1903-1908, 2011.
126. Grases F, Prieto R, Gomila I, Sanchís P, Costa-Bauzá A. Phytotherapy and renal stones: the role of antioxidants. A pilot study in Wistar rats. *Urol Res* 37: 35-40, 2009
127. Chennasamudram S, Kudugunti S, Boreddy PR, Moridani M, Vasylveva T. Renoprotective effects of (+)-catechin in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Nutr Res* 32: 347-356, 2012.
128. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322: 339-346, 1995

129. Vaille C, Debray C, Martin E, Souchard M, Roze C. On experimental ethylene glycol renal lithiasis in young rats before weaning. *Ann Pharm Fr* 21: 201-206, 1963
130. Debray C, Vaille C, Fiehrer A, Martin E, Souchard M, Roze C. Experimental disease due to paired stresses. Humoral and visceral disturbances induced by tween 80 in rats with experimental oxalate nephritis caused by ethylene glycol. *J Physiol* 56: 707-726, 1964
131. Thamilselvan S, Hackett R.L., Khan S.R. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 157: 1059-1063, 1997.
132. Hadjzadeh MA, Khoei A, Hadjzadeh Z, Parizady M. Ethanolic extract of nigella sativa L seeds on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *Urol J* 4: 86-90, 2007
133. Pino Pérez F. Técnicas Experimentales de Análisis Cualitativo. Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 1973. Sevilla
134. Benzie I, Strain J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239: 70-76, 1996
135. Hayes W, Mills D, Neville R, Kiddie J, Collins L. Determination of the molar extinction coefficient for the ferric reducing/antioxidant power assay. *Anal Biochem* 416: 202-205, 2011
136. Tandon M, Thirumeignanam D, Rai S.N. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay. *NDRI* 1: 1-2, 2000

137. Valcárcel P, Lemus Y. El Potencial Reductor Férrico (FRP). Un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante en suero. *Corr Cient Med Holguín* 8: 1-4, 2004.
138. Petrat F, Paluch S, Dogruöz E, Dörfler P, Kirsch M, Korth H, Sustmann R, de Groot H. Reduction of Fe(III) Ions Complexed to Physiological Ligands by Lipoyl Dehydrogenase and Other Flavoenzymes *in Vitro*. *J Biol Chem* 278: 46403-46413, 2003
139. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37: 277-285, 2004
140. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 37: 112-119, 2004
141. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38: 1103-1111, 2005
142. Demirbag R, Gur M, Yilmaz R, Kunt A, Erel O, Andac M. Influence of oxidative stress on the development of collateral circulation in total coronary occlusions. *Int J Cardiol* 116: 14-19, 2007
143. Túnez I, Drucker-Colín R, Montilla P, Peña J, Jimena I, Medina FJ, Tasset I. Protective effect of nicotine on oxidative and cell damage in rats with depression induced by olfactory bulbectomy. *Eur J Pharmacol* 627: 115-118, 2010
144. Vargas HO, Nunes SO, Pizzo de Castro M, Bortolasci CC, Sabbatini Barbosa D, Kaminami Morimoto H, Venugopal K, Dodd S, Maes M, Berk M. Oxidative stress and lowered total antioxidant status are associated with a history of suicide attempts. *J Affect Disord* 150: 923-930, 2013

145. Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 1539: 73-86, 2013
146. Askenazi DJ, Moore JM, Fineberg N, Koralkar R, Clevenger S, Sharer JD. Comparison of methods, storage conditions, and time to analysis of serum and urine creatinine measured from microsamples by liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) vs. Jaffe. *J Clin Lab Anal* 0: 1-4, 2014
147. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073-2085, 2000
148. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287-306, 2005
149. Khan SA, Priyamvada S, Farooq N, Khan S, Khan MW, Yusufi AN. Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacol Res* 59: 254-62, 2009
150. Peng A, Ye T, Rakheja D, Tu Y, Wang T, Du Y, Zhou JK, Vaziri ND, Hu Z, Mohan C, Zhou XJ. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int* 80: 601-611, 2011
151. Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *J Cardiovasc Pharmacol* 37: 262-270, 2001

152. Holthoff JH, Wang Z, Seely KA, Gokden N, Mayeux PR. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 81: 370-378, 2011
153. Rodrigo R, Rivera G, Orellana M, Araya J, Bosco C. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sci* 71: 2881-2895, 2002

