



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO: ANTIOXIDANTES

Autor: Adrián Repilado Álvarez

D.N.I.: 48080099-W

Tutor: Irene Iglesias Peinado

Convocatoria: Febrero

RESUMEN

Las especies reactivas que se generan en los organismos como resultado del metabolismo y de los factores ambientales pueden dañar moléculas biológicas y ser causa de numerosas enfermedades. Nuestro organismo, al igual que el de las plantas, dispone de mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo, pero muchas veces pueden no ser suficientes. Las plantas funcionan como factorías donde se generan innumerables compuestos con capacidad antioxidante cuya ingesta con la dieta, o en forma de suplementos dietéticos, podría tener un papel relevante en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. Esta revisión pretende explicar la procedencia de los radicales libres así como los diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El oxígeno es vital para los organismos aeróbicos ya que no podrían llevar a cabo los procesos metabólicos sin él. Sin embargo, paradójicamente, cuando este oxígeno es activado, deja de ser vital y se convierte en tóxico. Los radicales libres forman parte de nuestra fisiología pero cuando se descontrolan son causa de patologías crónicas de gran prevalencia como las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, el cáncer y la diabetes (1). Estas enfermedades se caracterizan por un elevado nivel de estrés oxidativo, que puede ser debido bien a una sobreproducción de especies reactivas o a una disminución de las defensas antioxidantes (2). Este estrés oxidativo también parece ser causa del envejecimiento según la teoría propuesta por Denham Harman publicada en 1954 que afirmaba que “el envejecimiento y todas las enfermedades que conlleva se deberían básicamente a los efectos dañinos que los radicales libres tenían sobre diferentes componentes celulares”. Esta teoría, no obstante, ha sufrido modificaciones durante los últimos años y se ha vuelto algo más compleja de lo que era inicialmente.

El impacto que tienen los radicales libres y su neutralización en la salud, quedó patente en 1992 cuando se llevó a cabo un estudio en el que se evaluó la incidencia de enfermedades coronarias en la población francesa, una población con una dieta rica en grasas saturadas. Los resultados sorprendieron a Renaud y de Lorgeril (3) ya que observaron una baja incidencia de esta enfermedad y lo atribuyeron al consumo moderado de vino. Desde entonces se han realizado otros estudios, no tan conocidos como el que dio nombre a la “paradoja francesa”, pero igual de relevantes, como el llevado a cabo en Copenhage por Gronbaek et al.(4) en el que se asocia el consumo moderado de vino con un menor riesgo de mortalidad por enfermedades

cardiovasculares y cerebrovasculares. Todos estos estudios suponen una evidencia epidemiológica de que los compuestos antioxidantes pueden prevenir e incluso tratar estas enfermedades, pero no existe consenso en cuanto al mecanismo de acción. En el caso del vino, sabemos que durante la maceración se extrae de las semillas de las uvas el resveratrol, una fitoalexina que produce la planta en respuesta a un daño o ataque (5). Además del resveratrol en la uva, (al igual que en muchas otras plantas) son los compuestos fenólicos (que incluyen flavonoides, proantocianidinas, antocianidinas, ácidos fenólicos (6)), los responsables de captar los radicales libres. Los compuestos fenólicos están formados químicamente por anillos aromáticos conjugados y otros grupos funcionales que son capaces de estabilizar los radicales libres produciendo una forma radicalaria bastante estable. Otro posible mecanismo de acción sería la quelación de iones metálicos, que influyen en la producción de radicales libres (7). Es entonces razonable pensar que los compuestos antioxidantes, a los que muchos autores se refieren como “radical scavengers” puedan ser una herramienta terapéutica útil para promover la salud. Para Forman et al. y otros autores estos dos términos no deben ser sinónimos dado que la gran mayoría de antioxidantes se comportan como excelentes atrapadores de radicales in vitro, pero la cinética in vivo limitaría este mecanismo de acción (8). Otros mecanismos han sido propuestos para explicar los efectos protectores contra el estrés oxidativo, como la inducción de la transcripción de genes que codifican para enzimas y proteínas antioxidantes. Todavía queda mucho por conocer en lo que a su eficacia y posible uso terapéutico se refiere ya que los resultados de algunos metanálisis son diferentes o llegan a ser contradictorios. Sin embargo los autores asocian la inconsistencia de estos estudios a la baja calidad del diseño de los ensayos. Todo apunta a que en un futuro los antioxidantes serán parte de la estrategia terapéutica en el tratamiento de muchas enfermedades.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es poder señalar con rigor científico el papel que juegan los radicales libres en la enfermedad, el significado biológico de los antioxidantes, y la función que desempeñan los componentes de muchos productos “over the counter” (OTC) a los que se les atribuyen propiedades antioxidantes, a través de una recopilación de las últimas publicaciones relacionadas. En resumen, estaríamos satisfechos si una vez terminada la lectura de éste trabajo el lector fuese consciente del potencial terapéutico de los antioxidantes y a la vez fuese capaz de conocer los argumentos más críticos en contra de su uso.

METODOLOGÍA

Durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2015 buscamos en la bases de datos de PubMed artículos a partir de palabras clave en inglés como “antioxidant supplement”, “resveratrol”, “vitamin supplement”, “radical scavenger”, “phenolics compounds”, “vitamin E” y revisamos la bibliografía de los artículos seleccionados. Aquellos artículos que no estaban disponibles gratuitamente fueron proporcionados por el Servicio Bibliotecario Ateneo de la Universidad de Ferrara (Italia). Tras la revisión bibliográfica de los artículos seleccionados y siguiendo la línea guía consensuada con el tutor, procedimos a la redacción de este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis e importancia de los antioxidantes en la fisiología vegetal y animal.

En la actualidad la población parece ser consciente de la importancia que tienen los hábitos alimenticios en nuestra salud. Diversos estudios concluyen que tomar 5 piezas de fruta y verdura al día disminuye el riesgo de mortalidad por todas las causas ya que tienen componentes fitoquímicos que pueden ayudar en la prevención y tratamiento de enfermedades como el cáncer (9-12), enfermedades neurodegenerativas (13), enfermedades cardiovasculares (14), y otras.

Estas propiedades terapéuticas se deben principalmente a los polifenoles. Hasta la fecha se han descrito 8.000 de estos compuestos pero la continua evolución de nuevos genes y mutaciones, que posibilitan la adaptación a los cambios ambientales, hacen que todavía queden muchos más compuestos por descubrir. Se estima que existen entre 100.000 y 200.000 metabolitos secundarios (15). Todos estos compuestos, sin embargo tienen un origen común, los aminoácidos fenilalanina y tirosina, y los carbohidratos que sufren reacciones de metilación, hidroxilación o glicosilación y se sintetizan en la glicolisis y en la ruta del ácido shikímico. Se forman principalmente durante la fase de crecimiento de los vegetales, y su contenido no es constante sino que está influenciado por factores endógenos o genéticos, y factores exógenos o ecológicos que pueden ser además bióticos o abióticos. Estos factores pueden suponer situaciones de estrés para la planta y tendrían consecuencias perjudiciales de no ser por las reservas de antioxidantes. Dicho de otra forma las plantas responden ante estímulos dañinos, como los ataques por parásitos, terrenos no adecuados, sequías, cambios de temperatura o elevada altitud, con la síntesis de compuestos del metabolismo secundario.

Un ejemplo muy ilustrativo es el de las aplanoesporas de *Chlamydomonas nivalis*, conocida como “alga de las nieves” o “watermelon snow” por dar a la nieve sabor y color parecido al de la sandía. Estas algas se encuentran en las laderas de las montañas que tienen nieve durante todo el año. Cuando llega la primavera y la radiación ultravioleta (UV) es mayor, las esporas que liberan tienen una gran cantidad de astaxantina, un pigmento carotenoide de color rosa, se ha comprobado que la concentración de este pigmento es mayor en las capas superficiales de la nieve ya que es donde más radiación incide (16). La síntesis de este compuesto se produce en respuesta al estrés que genera estar a elevada altitud con el objetivo de absorber las radiaciones UV. Actualmente este compuesto se utiliza en cremas de alta cosmética por su efecto antioxidante.

La supervivencia de las plantas a los continuos cambios ambientales es posible gracias a su capacidad para regular su metabolismo. Un estudio reciente estima que las situaciones de estrés como el calor, sequía, baja concentración de oxígeno, o elevada intensidad lumínica incrementan entre un 300% y un 1000% la producción de radicales libres (17). En el reino vegetal (de forma similar al animal) es en las mitocondrias y en los cloroplastos, orgánulos encargados de la función energética, donde se generan las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los fotosistemas I y II de los cloroplastos, y los complejos I, III de la cadena transportadora de electrones (ETC) son los principales sitios de producción de ROS además de los peroxisomas, orgánulos citoplasmáticos que contienen gran cantidad de catalasas (CAT) y flavinooxidasas (FO) que tienen un papel importante en la detoxificación celular. En estos orgánulos se oxidan lípidos, aminoácidos, ácido úrico y otros sustratos utilizando oxígeno molecular y produciendo H_2O_2 , consecutivamente CAT degrada el peróxido de hidrógeno a 2 moléculas de agua (18). En estas reacciones puede producirse la salida de electrones capaces de reaccionar con el oxígeno molecular (O_2). Cuando el O_2 adquiere un electrón del sistema de transporte de electrones, el oxígeno adquiere una carga negativa como primer estadio de la reducción monovalente del oxígeno molecular, $O_2^{-\bullet}$ (19), este ROS es el superóxido (SO), una molécula relativamente inestable con una vida media de milisegundos. En principio, el radical SO carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas, pero en presencia de trazas de catalizadores metálicos junto con H_2O_2 , (reacción de Fenton o Haber-Weiss(20)) puede dar lugar al radical OH^{\bullet} , considerado el principal ariete contra todo tipo de macromoléculas por su elevada reactividad. De forma similar se producen especies reactivas de nitrógeno como el radical de óxido nítrico NO^{\bullet} -y el peroxinitrito $ONOO^-$, y de azufre.

Los ROS tienen una procedencia mayoritariamente endógena, sin embargo también pueden ser generadas ante estímulos externos como agentes tóxicos, luz UV, radiación ionizante o fármacos. En condiciones normales la célula humana produce unos 2 billones de radicales SO y H_2O_2 por célula al día, es decir cerca del 2% del oxígeno consumido en la respiración celular es reducido a estas formas radicalarias (21).

Las plantas tienen eficientes sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, que les permiten defenderse de los efectos tóxicos de los radicales libres. Los sistemas enzimáticos incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). Mientras que el sistema antioxidante no enzimático está compuesto por antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, glutatión, prolina, ácidos fenólicos, flavonoides (polifenoles) etc, y metabolitos secundarios de elevado peso molecular. Estos compuestos son esenciales para mantener el equilibrio redox (22). Además estos compuestos influyen en la expresión de los genes asociados al estrés biótico y abiótico para maximizar la defensa, es decir son compuestos a los que podríamos denominar proantioxidantes. El sistema de antioxidantes engloba compuestos hidrosolubles y liposolubles.

Los antioxidantes liposolubles son necesarios para evitar la oxidación de la membrana celular mientras que los hidrosolubles contribuyen a evitar la oxidación del medio extracelular y el citosol. Sin embargo, los antioxidantes de los dos compartimentos deben funcionar interconectados, por ejemplo, la forma oxidada de vitamina E requiere la acción de la vitamina C, que se genera durante el metabolismo aeróbico de las plantas y es capaz de reaccionar rápidamente con el radical SO , el O_3 y el H_2O_2 utilizando la ascorbato peroxidasa para neutralizar sus efectos tóxicos. De esta manera la vitamina C ayuda a regenerar los pigmentos antioxidantes, los carotenos y xantófilos, y la vitamina E para que vuelvan a estar en una forma activa. Por esta razón los suplementos antioxidantes, como se verá más adelante, se formulan con más de un componente.

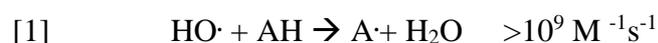
En las plantas la producción de radicales libres aumenta en situaciones de estrés, de la misma manera que en el cuerpo humano aumenta en situaciones como la inflamación, el metabolismo de algunos compuestos y la radiación. Los sitios de producción son (a excepción de los cloroplastos) los mismos. Sin embargo, los peroxisomas de las células vegetales contienen un ciclo ascorbato-glutatión muy efectivo que mantiene los radicales libres controlados y que no existe en las células del cuerpo humano. Por otro lado, el retículo endoplásmico responsable de la síntesis de proteínas también genera radicales SO por la acción

de ciertos citocromos P450 y en la membrana plasmática por acción de la nicotinamidaadenina-dinucleótido-fosfato oxidasa (NADPH oxidasa).

A diferencia de las plantas, los seres humanos no contamos con los metabolitos secundarios. Nuestra defensa antioxidante se limita a los compuestos que normalmente biosintetiza el organismo y aquellos que ingresan en nuestro organismo a través de la dieta. Los antioxidantes enzimáticos son: la SOD, CAT, glutatión-reductasa, glutatión S-transferasa, tioredoxina-reductasa y sulfoxi-metionina-reductasa. Los antioxidantes no-enzimáticos son el glutatión, ácido úrico, ácido dihidrolipóico, metalotioneína, co-enzima Q y melatonina. Comparado con las plantas, nuestra reserva de antioxidantes es muy inferior, por lo que es importante la ingesta variada de frutas y verduras que incorporen compuestos antioxidantes que nuestro organismo no puede sintetizar como el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol y el betacaroteno (vitaminas-antioxidantes), la luteína, zeaxantina y licopeno (carotenoides), polifenoles, flavonoides y no flavonoides y compuestos glucosinolatos y azufrados. Pero debemos tener en cuenta que las plantas producen los antioxidantes para sus propios requerimientos y en consecuencia, en el cuerpo humano puede que no sean igual de efectivos ya que deben pasar los procesos de absorción, distribución, metabolismo, acúmulo y eliminación. Como resultado, muchos de estos buenos antioxidantes existentes en las plantas no son capaces de generar el efecto deseado e incluso podrían tener efectos pro-oxidantes (23).

Mecanismos de acción e importancia terapéutica de los antioxidantes en las patologías humanas.

El hecho de que un compuesto atrape radicales *in vitro* no le confiere *per se* a dicho compuesto la cualidad de antioxidante *in vivo*. Esto sucede principalmente por dos motivos: Primero, porque las especies radicalarias tienen una enorme facilidad para difundir y propagarse, algunos tienen tiempos de vida de nanosegundos por lo que es extremadamente difícil que el antioxidante esté presente en el momento exacto y en el lugar oportuno para evitar el daño oxidativo. Segundo, porque las reacciones entre los antioxidantes y los oxidantes son reacciones de segundo orden, es decir $R=k[\text{antioxidante}][\text{especies reactivas}]$ donde k es una constante de cinética de segundo orden. Un ejemplo:



La reacción entre el radical hidroxilo HO·, que proviene de la descomposición del H₂O₂ o del H₂O, y cualquier molécula AH presente en la célula tiene una velocidad cercana a la de la limitación de la difusión de reacción. Luego carece de sentido argumentar que cualquier

compuesto que reaccione con el radical, nos protege del radical (8). Para este mismo autor, el único mecanismo de protección sería la prevención de la formación de los radicales y no el hecho de atraparlos cuando ya se hayan formado. Esta prevención consiste en reducir el H₂O₂ a agua y los hidroperóxidos lipídicos (ROO·) a sus respectivos alcoholes (ROOH), reacciones que sólo pueden llevarse a cabo si son catalizadas por enzimas específicas.



Sin embargo, existe un ejemplo de protección contra los radicales libres que no necesita de enzimas que lo catalicen. Es el caso de la vitamina E, un importante antioxidante liposoluble que se sintetiza en cloroplastos y protoplastos y se localiza en las membranas celulares evitando la peroxidación lipídica. En la siguiente reacción aparece representado como T-OH, mientras que ROO· es el radical hidroxiperílico de la reacción [2].



Estas reacciones [3,4] son muy lentas dado que el radical que se forma (T-O·) es muy estable. Esto ocurre porque su estructura química le permite deslocalizar el electrón desapareado hasta estabilizar un segundo electrón o bien hasta que este sea reducido, formando así una orto o para-hidroquinona estable. Para que la reacción [4] no ocurra es importante disponer de reservas de vitamina C que puedan reciclar el radical alfa-tocoferol, ya que de no ser así, podría asumir un papel de pro-oxidante y aumentar la oxidación lipídica (24). De aquí que muchos suplementos antioxidantes comercializados contengan las dos vitaminas antioxidantes por su acción sinérgica, pero este argumento suscita críticas ya que por su diferente afinidad por el medio acuoso o lipídico, sería difícil encontrarlos actuando juntos. El mismo mecanismo de la reacción [3] es el que se atribuye a muchos polifenoles presentes en la naturaleza, sin embargo se ha comprobado que el número de quinonas (orto y para hidroquinonas) producidas en las células y membranas a partir de polifenoles, es menor que las que se producen con la misma concentración de vitamina E. Volviendo a las plantas, una deficiencia de vitamina E se asocia con un retraso en el crecimiento y adaptación al estrés ambiental (25) a pesar de que las plantas disponen de una gran variedad de fitoquímicos. De la misma manera, se ha comprobado que el síndrome de deficiencia de vitamina E en humanos tiene importantes consecuencias como: hiporreflexia, ataxia, debilidad muscular, reducción del campo de visión y si la deficiencia es prolongada: demencia, arritmias cardíacas y lesiones del sistema nervioso (26). Esta deficiencia no sólo no puede ser tratada con fitoquímicos sino que

sólo se puede revertir con vitamina E. Los más críticos con los antioxidantes no enzimáticos de tipo “radical scavengers” argumentan que los procesos de absorción, distribución, concentración y localización del fitoquímico limitan su efecto. No es lo mismo prevenir el estrés oxidativo que se produce en el lumen intestinal después de las comidas, que el estrés oxidativo que caracteriza muchas enfermedades neurodegenerativas. Para prevenir el primero bastaría con un vaso de vino rico en polifenoles con la comida (27), sin embargo todavía no hay evidencia de que un vaso de vino sea suficiente para combatir el estrés oxidativo característico de las enfermedades neurodegenerativas. Una posible explicación es la baja biodisponibilidad de estos compuestos.

La biodisponibilidad hace referencia a la fracción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación, luego no es tan importante cuántos polifenoles antioxidantes tiene un alimento como la biodisponibilidad de esos polifenoles (28). Puede que sea esta la razón por la que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo (29). La mayoría de los polifenoles se encuentran en forma de ésteres, glucósidos o polímeros, es decir, formas no absorbibles. Los glucósidos pueden ser hidrolizados por enzimas intestinales como la b-glucosidasa (30) o ser degradados por la microflora del colon que metaboliza las agliconas en distintos ácidos aromáticos hasta reducirlos a ácido benzoico u otros metabolitos con propiedades fitoestrogénicas como el equol, que además posee una actividad antioxidante superior a todas las isoflavonas (31). Por ejemplo, la quercetina, uno de los flavonoides más ampliamente difundidos en los vegetales, sólo se absorbe en el estómago cuando no se encuentra glucosilada. Una vez absorbidos sufren modificaciones en su estructura como consecuencia de la metilación, sulfatación y glucoronidación que ocurren a su paso por el hígado y que aumentan su hidrofilia para facilitar su excreción con la orina. Como consecuencia el polifenol metabolizado que llega al plasma puede no ser un metabolito activo.

Esto se puede estudiar analizando la capacidad antioxidante del plasma tras la ingesta de determinados alimentos que contengan los polifenoles de interés, si el metabolito es activo, la sangre tendrá capacidad antioxidante.

Los metabolitos pueden circular por la sangre unidos a proteínas plasmáticas, mayoritariamente a la albúmina, sin embargo no es tan importante la concentración en la sangre como la concentración en los tejidos que varía según el tipo de polifenol, es decir pueden acumularse en tejidos diana (32). Después de los procesos de absorción, metabolismo y distribución es muy improbable que un antioxidante coincida con una ROS en el momento y

lugar oportuno, y más teniendo en cuenta que los radicales libres difunden con gran facilidad y algunos tienen tiempos de vida de nanosegundos. Como consecuencia de su baja disponibilidad, y de las cinéticas de reacción de los “radical scavenger” in vivo, no hay consenso en el posible mecanismo de acción. Recientes estudios apuntan que el efecto antioxidante pueda ser debido a la inducción, por parte de estos compuestos, de las defensas antioxidantes endógenas.

Podría pensarse que al aumentar el aporte de antioxidantes exógenos, se produciría un descenso en la regulación de los antioxidantes endógenos; pero esto no es así, ocurre todo lo contrario, la ingesta de compuestos fenólicos produce un aumento de la protección endógena antioxidante.

Daniel et al. (33) demostraron que los compuestos electrófilos y los metabolitos de los compuestos aromáticos, que cuando son metabolizados pasaban a ser electrófilos, son capaces de activar el “electrophile response element” (EpRE) un elemento en cis que se encuentra en los genes que codifican enzimas de fase II como la GST. Esta secuencia de 9 bases está modulada por Nrf2, un factor de transcripción de la familia “Cap’n’Collar” (CNC) con dominio de unión al ADN de tipo cremallera de leucina en el extremo C-terminal, por el cual reconoce al EpRE, mientras que el dominio N-terminal, es responsable de la regulación negativa al interactuar con “Kelch-like ECH-associated protein 1” (Keap1) (34). La activación por parte de Nrf2 del EpRE es clave en la respuesta adaptativa a los estímulos oxidantes.

El mecanismo no es sencillo, en condiciones fisiológicas, el factor de transcripción Nrf2 se encuentra unido a Keap1 (8), y según algunos autores también al complejo ubiquitina ligasa 3 (Cul3), que actúa como marcador para que el conjunto Keap1-Nrf2-Cul3 sea degradado por el 26S del proteosoma manteniendo unos niveles bajos de transcripción (8). Por esta razón Keap1 también se conoce como INNrf2 por ser inhibidor del propio factor de transcripción, sin embargo, cuando los residuos de cisteína (CYS) presentes en Keap1 son oxidados o modificados por la unión covalente de un compuesto como las quinonas, Keap1 se inactiva y Nrf2 se escapa de la degradación. Ahora Nrf2, puede ser fosforilada por proteínas que también son activadas en presencia de oxidantes y compuestos electrófilos (35), de manera que puede trasladarse al núcleo y aumentar la transcripción de antioxidantes endógenos. Esta teoría que propone que la reacción del organismo a agentes dañinos es la inducción de sus propios mecanismos de defensa antioxidante se puede parangonar a aquella que vimos en la primera parte del trabajo que decía que los vegetales reaccionan a situaciones de estrés aumentando la síntesis y acúmulo de compuestos del metabolismo secundario, que son los antioxidantes no enzimáticos.

Además de inducir las defensas antioxidantes, los estímulos dañinos o los oxidantes sirven para que las células puedan prevenir o reparar los daños y, en caso de daño importante, ordenar la apoptosis. Prácticamente todos estos efectos están mediados por reacciones de oxidación de diferentes mediadores peptídicos (36). Esta señalización ocurre también cuando no existe un estímulo dañino, sin embargo, como ya se ha explicado, la respuesta a estos estímulos implica la formación de compuestos electrófilos y especies oxidantes que acabaría con la homeostasis redox produciendo la oxidación de macromoléculas biológicas. La alteración del equilibrio redox puede ser la causa de enfermedades como el cáncer (37), o las neurodegenerativas (38). Por un lado, el cáncer cursa con proliferación descontrolada de células que son resistentes a la apoptosis. Por otro lado, en las enfermedades neurodegenerativas se produce sin motivo aparente la muerte celular. El denominador común es el estrés oxidativo. Actualmente encontramos una extensa bibliografía que teoriza sobre cómo evitarlo. Compuestos como la curcumina o el resveratrol antes mencionado que cuentan con grupos carbonilos alfa-beta-insaturado en su estructura, actúan uniéndose directamente a la Keap-1 sin necesidad de ser oxidados (39-40). En cambio, algunos polifenoles como los presentes en el cacao y el té verde, o el hidroxitirosol de las hojas del olivo, interaccionan con Keap 1 cuando ya han sido oxidadas a quinonas, mucho más electrófilas que la forma no oxidada del polifenol. La oxidación del polifenol a quinona o hidroquinona por la presencia de radicales libres se produce mucho más rápidamente que la reacción enzimática catalizada por la glutathion-S-transferasa que retira los compuestos electrófilos. Esto tiene sentido ya que, de no haber electrófilos, no se activaría la transcripción de genes que codifican para enzimas como la propia glutathion-S-transferasa (8).

Ya se han explicado los mecanismos de acción de los polifenoles, y de las vitaminas E y C. Pero no todas las vitaminas antioxidantes actúan de la misma manera, por ejemplo la vitamina A, conocida como retinol, además de tener la capacidad de atrapar radicales, es un eficaz antioxidante por su capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico (NO), a través de la inhibición de la transcripción de los genes que codifican para la óxido nítrico sintasa (NOS) en los tejidos vascular, cardíaco y endotelial (41). También la nicotinamida, conocida como vitamina B3 o niacina es capaz de modular la expresión de NOS, pero juega un papel fundamental reciclando la red antioxidante. Igual que la riboflavina, la niacina, es un componente más de NADPH y FAD que son cofactores de muchas reacciones mediadas por enzimas antioxidantes. Otras vitaminas como la B6 y la B12 se consideran antioxidantes indirectos ya que están involucradas en el metabolismo del aminoácido homocisteína muy oxidante y dañino para el endotelio vascular (42).

Todos los suplementos dietéticos antioxidantes que encontramos en la farmacia, además de tener las vitaminas del grupo B, vitamina A, C y E contienen minerales como el magnesio, zinc o selenio que son cofactores enzimáticos. El magnesio, por ejemplo, es necesario para la producción del NADPH, imprescindible en la reducción del glutatión y detoxificación de especies reactivas. El zinc cataliza reacciones de transcripción de genes, como las que hemos atribuido a los polifenoles. También interviene en la síntesis proteica. Parece ser, que la exposición continuada a minerales como el zinc aumenta la producción de metalotioneínas, que son proteínas ricas en aminoácidos de cisteína utilizadas como biomarcadores de exposición a metales pesados. Estas proteínas son capaces de fijar metales como cobre, cadmio, mercurio, plata o arsénico. Se ha sugerido que estos restos de cisteína pueden ser oxidados a cistina cuando reaccionan con radicales SO y $HO\cdot$, ejerciendo un papel de antioxidante. Por otro lado el selenio, presente también entre los componentes de muchos complementos antioxidantes, actúa como cofactor de la glutatión-peroxidasa (GPx) y otras enzimas dependientes de selenio que se encargan de la eliminación de los lípidos peroxidados.

Este tipo de productos OTC, también conocidos como artículos de mostrador o de venta libre, completan su fórmula con ácidos grasos omega 3 y omega 6, y la coenzima Q. Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) existe cierta controversia dado que una mayor ingesta de lípidos se asocia con la inducción en la expresión de NOS y consecuentemente una mayor producción de ROS. Los aceites de pescado son ricos en estos PUFAs a los que se atribuye capacidad antioxidante, sin embargo un estudio comparativo llevado a cabo con ratas alimentadas con aceite de pescado y ratas alimentadas con aceite de oliva, relaciona el consumo de aceite de pescado con un mayor estrés oxidativo. En cuanto a la coenzima Q conocida como ubiquinona, existe una mayor evidencia de su capacidad antioxidante. Se conoce el papel que desempeña en la membrana de la mitocondria. Además su forma reducida, el ubiquinol también posee actividad antioxidante en las membranas lipídicas y lipoproteínas.

Dejando de lado los productos OTC, en la rebotica de las farmacias encontramos la N-acetilcisteína (NAC). La NAC se usa en el tratamiento de la sobredosis de paracetamol, aunque en la farmacia se encuentran las presentaciones de 200mg y 600mg que tienen la indicación de mucolítico. La NAC, atraviesa la membrana sin necesidad de un transporte activo y una vez dentro de la célula es hidrolizada liberando cisteína (un precursor del glutatión (GSH)). La síntesis de GSH está mediada por la C-glutamylcisteína sintetasa y la GSH-sintetasa, y depende de la disponibilidad de los substratos, normalmente el reactivo limitante es la cisteína. Como ya se ha explicado anteriormente, GSH participa en la defensa antioxidante tanto enzimática

como no enzimática. Igual que ocurría con los polifenoles, la NAC tiene una baja biodisponibilidad que limita la protección contra el estrés oxidativo (43). Se han sintetizado ésteres etílicos y amidas de NAC que aumentan su lipofilia, biodisponibilidad y propiedades antioxidantes. En cualquier caso la NAC es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica BHE por lo que es una esperanza terapéutica en el tratamiento de muchas enfermedades neuronales.

Se ha propuesto el uso de antioxidantes como la vitamina E y NAC como coadyuvantes en el tratamiento del Alzheimer. En esta enfermedad se han observado elevados niveles de lípidos peroxidados en el córtex cerebral así como una disminución de GSH en áreas de la corteza y el hipocampo (44). Los estudios llevados a cabo en modelos animales no prueban la eficacia del tratamiento con NAC si bien es cierto que se observaron mejoras en algunas medidas secundarias (45). Dado que la NAC es bastante segura y bien tolerada a dosis elevadas, el balance beneficio-riesgo pocas veces es desfavorable. Únicamente se han descrito casos de efectos adversos como vómitos, náuseas y diarreas. La acción de mucolítico hace que esté contraindicado en personas con úlcera péptica. El Alzheimer es una enfermedad muy prevalente entre personas con síndrome de Down. Algunos investigadores proponen la administración diaria desde los primeros años de vida de NAC para combatir el estrés oxidativo y prevenir la aparición de esta enfermedad.

En la enfermedad de Parkinson, se estima que los niveles de GSH se reducen al 40% en la sustancia negra, esto parece ocurrir por el mal funcionamiento de las mitocondrias y el aumento de estrés oxidativo que provoca el acúmulo de alfa-sinucleína (SNCA) tóxico (46). Un estudio llevado a cabo en 2010 demostró que el tratamiento con NAC en ratas aumentaba los niveles de GSH a las 5 semanas de tratamiento. Además se demostró que la pérdida de terminaciones dopaminérgicas se había reducido debido a la disminución en la sobreexpresión de SNCA. Asimismo se ha comprobado que la sustancia negra en los enfermos de Parkinson contiene cantidades diferentes de hierro y neuromelanina que los controles, ambos compuestos median la producción de ROS. En el caso de la neuromelanina existe cierta controversia porque es capaz de reducir el hierro (III) a hierro (II) y quelar metales tóxicos lo que le da propiedades antioxidantes pero al mismo tiempo se le atribuyen efectos pro-oxidantes cuando existe un exceso de hierro libre. Para combatir las especies reactivas se han llevado a cabo estudios en los que se administraba vitamina E y vitamina C a estos enfermos, desafortunadamente, no se observó ninguna mejoría. Es posible que esta falta de eficacia pueda deberse a la baja biodisponibilidad de estas vitaminas antioxidantes que hace que estos compuestos no lleguen

al cerebro en las concentraciones necesarias. La solución a esta limitación parece haber sido hallada por un grupo de investigadores de la Universidad de Ferrara que sugiere usar la vitamina C como “un caballo de Troya” que transporte los fármacos, en este caso antioxidantes, al cerebro (47).

Recientemente se ha realizado un interesante estudio en el que se ha valorado la eficacia de la combinación NAC y selenio en el tratamiento de traumatismo cerebral. Ambos demostraron aumentar la capacidad antioxidante del plasma, así como los niveles de vitaminas antioxidantes reduciendo significativamente el estrés oxidativo. Además se observó la regulación de niveles de Interleucinas que median los procesos inflamatorios.

En cuanto a la esclerosis múltiple (ME), existe una correlación entre los niveles de expresión de factor de necrosis tumoral (TNF) y el progreso de la enfermedad. Se ha demostrado que NAC es capaz de inhibir los efectos tóxicos de TNF en modelos animales (48). En otro estudio, se seleccionaron 10 pacientes con ME que fueron sometidos a tratamiento con NAC durante 16 meses. Los resultados fueron sorprendentes dado que 2 de esos pacientes que inicialmente tenían una gran dificultad en el habla, mejoraron la capacidad para hablar con una mayor velocidad. La inconsistencia de este estudio se debe principalmente al pequeño tamaño de muestra, por lo que muchos autores coinciden en la importancia de llevar a cabo ensayos clínicos controlados que manejen una población mayor para evitar sesgos.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) puede ocurrir por mutaciones en el gen que codifica para la SOD, disminuyendo su expresión y facilitando la progresión del estrés oxidativo. Sin embargo, en algunos casos de ELA esporádica, los niveles de SOD son normales, y son la GSH-peroxidasa y la GSH-reductasa las que están disminuidas. Se han llevado a cabo varios estudios en pacientes con ELA esporádica. En estos estudios se observó cómo los pacientes recuperaban fuerza muscular a los 12 meses de tratamiento, o la enfermedad se mantuvo estable (48). El tratamiento con NAC modifica el desarrollo de la enfermedad, y la mortalidad durante el primer año se ha llegado a reducir en un 50% según los resultados de un ensayo doble ciego (49).

En cuanto al cáncer, hemos visto los mecanismos de acción de los antioxidantes, unos a través de la inducción enzimática mediada por Nrf2/Keap1, otros atrapando radicales, normalizando la función mitocondrial o inhibiendo enzimas que generan ROS como la (NADPH oxidasa). Pero estos mecanismos no resultan útiles en el tratamiento de todos los tumores. Sí son útiles en el tratamiento de aquellos tumores provocados por ROS. Este tipo de

tumores se caracteriza por elevados niveles de NF-Kb (Nuclear Factor-Kappa-light-chain enhancer of activated B cells), y una actividad excesiva de Akt. NF-Kb es una familia de factores de transcripción que son activadas por las ROS y aumentan la resistencia a la quimioterapia, apoptosis e hipoxia. Para determinar si un tumor es susceptible de beneficiarse de una terapia de antioxidantes previa a la quimioterapia o a la radiación, se puede identificar WT1, un biomarcador de este tipo de tumores. En este caso los antioxidantes actuarían regulando negativamente NF-Kb, la actividad de Akt y otras alteraciones, de esta forma se aumentaría la sensibilidad a los tratamientos posteriores (50).

También se ha estudiado la implicación de ROS en la diabetes mellitus. Los niveles de glucosa elevados están directamente relacionados con una mayor producción de ROS por parte del complejo II de la mitocondria además de otros mecanismos (51). Es decir, una mayor disponibilidad de sustratos energéticos aumenta la producción mitocondrial de ROS. Por esta razón para prevenir y tratar las complicaciones se propone a los pacientes aumentar el ejercicio físico y reducir la ingesta calórica. El uso de antioxidantes que prevengan la producción de ROS, podría ser un buen complemento para el tratamiento no farmacológico de los pacientes diabéticos (52).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo. La mayor parte de estas enfermedades pueden prevenirse promoviendo los hábitos de vida saludables. Un marcador de riesgo de las ECV es la rigidez arterial, asociada a muchas condiciones patológicas como la arteriosclerosis, dislipemias, diabetes y enfermedades del corazón. El endurecimiento de la pared arterial se produce entre otras causas, por la sustitución de la elastina por colágeno y la proliferación de la musculatura lisa, muy influenciadas por el estrés oxidativo (53). Por esta razón la dieta mediterránea, rica en compuestos con propiedad antiinflamatoria y antioxidante (54) ha demostrado tener un efecto positivo en la prevención de enfermedades cardiovasculares (55). Los resultados de un meta-análisis llevado a cabo en 2013 demuestran que la suplementación con vitaminas antioxidantes, especialmente la vitamina C junto con la E reducen la rigidez arterial y por tanto, son un factor de protección contra las ECV (56).

Otro importante meta-análisis estudia el potencial terapéutico de los antioxidantes en la prevención de la fibrilación auricular (FA). La FA es la arritmia con significación clínica más frecuente dentro de la población adulta y sus complicaciones tanto a nivel cardio- como cerebrovascular son de sobra conocidas. Se ha demostrado que ROS juega un papel determinante en el mantenimiento de la arritmia. De la misma manera que ocurre el

endurecimiento de la pared arterial, ocurre el remodelado del corazón. Este estudio concluye que los antioxidantes con mayor capacidad para reducir la FA son la vitamina C y la NAC, pero la baja calidad de los estudios pone en duda la verdadera eficacia de ambos antioxidantes (57).

El mayor de los meta-análisis revisados para este trabajo analizó una muestra de 294.478 participantes en 50 ensayos. Este análisis no encontró evidencias que apoyasen el uso de vitaminas y antioxidantes en la prevención primaria o secundaria de ECV. Sin embargo sí demostró que la suplementación con vitamina E disminuye el riesgo de infarto de miocardio, si bien es cierto que esta relación solo se observó en aquellos ensayos en los que los suplementos de vitamina E provenían de la industria farmacéutica (58).

CONCLUSIONES

La fisiología de las plantas está mucho más expuesta al oxígeno que la de los humanos, esta puede ser la causa por la que las plantas cuentan con una mayor defensa antioxidante no enzimática capaz de neutralizar ROS. La afirmación de que la suplementación con antioxidantes, o la ingesta de estos con la dieta, neutralizan también las ROS que se generan en el cuerpo humano y por tanto previene las enfermedades causadas por el estrés oxidativo puede ser demasiado simple, ya que no tiene en cuenta la baja biodisponibilidad de estos compuestos. Por tanto, que un compuesto tenga capacidad antioxidante in vitro, no basta para afirmar que tiene actividad antioxidante in vivo.

Todavía queda mucho por conocer sobre los antioxidantes. Sabemos que no todos los antioxidantes funcionan atrapando los radicales libres sino que lo hacen a través de mecanismos bioquímicos complejos. Hemos observado como los estudios llevados a cabo en muestras poblacionales pequeñas dan resultados esperanzadores, en cambio, los ensayos con grandes poblaciones no logran evidenciar beneficios del consumo de antioxidantes. La calidad de los ensayos debe mejorar con el fin de obtener resultados concluyentes que permitan definir las dosis para lograr la mayor eficiencia terapéutica. Asimismo se deben modificar los compuestos antioxidantes y las formas farmacéuticas que los contienen para mejorar la biodisponibilidad y garantizar así los efectos beneficiosos.

Debemos conocer la causa de la enfermedad para poder establecer las condiciones de uso óptimas para cada antioxidante. En palabras de Gregorio Marañón (1887-1960) “no hay enfermedades sino enfermos”, y de la misma manera que la enfermedad es diferente en cada paciente, el tratamiento también debe serlo. (¿Por qué en un paciente con EM avanzada la NAC ha logrado hacerle recuperar el habla mientras que en otros no es eficaz?).

El potencial terapéutico de los antioxidantes es un hecho. No se puede equiparar un fármaco, o un compuesto antioxidante, a cualquier otro bien de consumo, por eso es importante que haya sido fabricado por profesionales siguiendo unas normas de correcta elaboración y que haya superado los controles de calidad. También es importante que sea indicado por profesionales que estén en grado de valorar el balance beneficio-riesgo que tenga su uso en un determinado paciente.

AGRADECIMIENTOS

A Felisa Repilado, no solo por dirigir este trabajo de final de grado, sino por las enseñanzas e inquietudes que me ha transmitido desde el primer año.

REFERENCIAS

- (1) Dröge W. *Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev.* 2002 Jan; 82(1):47-95.
- (2) Barry Halliwell. *Free radicals and other reactive species in Disease. National university of Singapore, Encyclopedia of life science, 2001.*
- (3) Renaud SC, Guergen R, Siest G, Salomon R, Wine beer and mortality in middle aged men from eastern France. 1999 *Arch Intern Med* 159, 1865-1870.
- (4) Gronback M Deis A Soresen T.I. Becjer U, Schnohr P and Jensen G. *Mortality associated with moderate intake of wine, beer or spirit 1995, BHJ 310, 1165-1169.*
- (5) Campasso F,. Grandolini G, Izzo A.A. *Fitoterapia Impiego razionale delle droghe Vegetali Ed Springer 2012. 1031 pag.*
- (6) Waterhouse A.L. *Wine Phenolics Ann NY acad Sci 2002 May 957, 21-36.*
- (7) Pereira 1, Patrícia Valentão 1, José A. Pereira 2, and Paula B. Andrade 1. *Phenolics: From Chemistry to Biology David M. Molecules 2009, 14, 2202-2211.*
- (8) Henry Jay Forman, Kevin J. A. Davies, and Fulvio Ursini. *How do nutritional antioxidants Really Work: Nucleophilic Tone and Para-Hormesis Versus Free Radical Scavenging in vivo. Free radic biol med 2014 Jan 8:66 1000-1016.*
- (9) Mileo AM, Miccadei S. *Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. Oxid Med Cell Longev 2015 Nov Vol 2016, Article ID 6475624 17 pages.*
- (10) Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, Dioguardi M, Troiano G, Lo Russo L, DE Lillo A, Laino L, Lo Muzio L. *Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. Exp Ther Med. 2015 Nov; 10(5):1615-1623.*
- (11) Greenwell M, Rahman PK. *Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. Int J Pharm Sci Res. 2015 Oct. 4103-4112.*
- (12) Kwee JK. *Yin and yang of polyphenols in cancer prevention. A short review. Anticancer Agents Med Chem. 2015 Nov 16. PMID: 26567629.*
- (13) Pandareesh MD, Mythri RB, Srinivas Bharath MM. *Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. Neurochem Int. 2015 Oct; 89:198-208.*

- (14) Guillermo Gormaz J, Valls N, Sotomayor C, Turner T, Rodrigo R. *Potential Role of Polyphenols in the Prevention of Cardiovascular Diseases: Molecular Bases. Curr Med Chem.* 2015 Nov 27 Vol 23, 42.
- (15) Dai J, Mumper RJ. *Plan phenolics extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules* 2010; 15; 7313-52.
- (16) Gorton HL¹, Vogelmann TC. *Ultraviolet radiation and the snow alga Chlamydomonas nivalis (Bauer) Wille. Photochem Photobiol.* 2003 Jun; 77(6):608-15.
- (17) Deepak M. Kasote, Surenda S, Katyare, Mahabaleshwar V. Hedge, Hanhong Bae. *Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. Int J of bio Sciences* 2015 Vol 11, 8, 982-91.
- (18) López-Terradas Covisa, J. M. *Introducción al estudio de las enfermedades peroxisomales. Rev de Neurol.* 1999 Jan; 28 Suppl 1:S34-7.
- (19) http://ocw.upm.es/tecnologia-de-alimentos/industria-alimentaria-y-su-repercusion-en-lasalud/contenidos/radicales_libres/formacion-de-radicales-libres Nov 2015
- (20) EC Vaquero-Raya, X Molero-Richard. *Reactive oxygen species in inflammatory diseases of the pancreas. A possible therapeutic target? Gastro-hepatol Elsevier* 2005 Oct, Vol 28, 08.
- (21) Turrens JF. *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci Rep* 1997; 17:3-8.
- (22) Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. *The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr Pharm Des.* 2004; 10:1677-94.
- (23) Argelia López L, Carlos Fernando A., Zelmira Lazarova, Rómulo Bañuelos V, Sergio Hugo Sánchez R. *Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades Antioxidants, a paradigm for diseases treatment. Revista Anacem.* 2012 Vol 6 N°1 48-53.
- (24) Doba T, Burton GW, Ingold KU. *Antioxidant and co-antioxidant activity of Vitamin C. The effect of Vitamin C, either alone or in the presence of Vitamin E analogue, upon peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. Biochim Biophys Acta* 1985 835 298-303
- (25) Niki E, Traber MG. *A history of vitamin E. Ann Nutr Metab.* 2012; 61(3):207-12.
- (26) Tanyel MC¹, Mancano LD. *Neurologic findings in vitamin E deficiency. Am Fam Physician.* 1997 Jan; 55(1):197-201.
- (27) Ursini F, Sevanian A. *Postprandial Oxidative Stress. Bio Chem* 2002 383: 599-605
- (28) Srinivasan VS. *Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. J Nutr* 2001; 131: 1349S-1350S.
- (29) M. Quiñones, M. Miguel y A. Alexandre. *The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. Nutr Hosp* 2012 Jan-Feb 27 (1) 76-89.
- (30). D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R. *Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversias. Int J Mol Sci* 2010; 11: 1321-1342.

- (31) Mousavi Y, Adlercreutz H. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 615619.
- (32) Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol* 2008; 124: 295-298.
- (33) Friling RS, Bensimon A, Tichauer Y, Daniel V. Xenobiotic-induced expression of murine glutathione S-transferase Ya Subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proceedings National Academy of sciences, USA*. 1990; 87: 6258-6262.
- (34) <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-16048.pdf>
- (35) Bloom DA, Jaiswal AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 gene expression. *The journal of biological chemistry* 2003; 278 44675-44682.
- (36) Brigelius-Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidant & redox signaling* 2011 Oct. 15 (8) 2335-2381.
- (37) Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies.. *Oxid Med Cell Longev*. 2015 Nov 16. Art ID 6475624 17 pages.
- (38) Covarrubias-Pinto A, Acuña AI, Beltrán FA, Torres-Díaz L, Castro MA. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci*. 2015 Nov 27;16(12):28194-217
- (39) Balogum E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant responsive element. *Biochem J*. 2003, 371: 887-895.
- (40) Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology*. 2006; 72: 1439-1452.
- (41) Keys SA, Zimmerman WF, Antioxidant activity of retinol, glutathione and taurine in bovine photoreceptor cell membranes *EXP Eye Res* 1999; 68: 693-702
- (42) Eastern C, Cooper KH Marks A, Mitchell TL. Efficacy of a complex multivitamin supplement. *Nutrition* 2002: 180, 33-34
- (43) Arakawa, M., and Y. Ito. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 2007, 6:308–314
- (44) Lohr, J. B., and J. A. Browning. Free radical involvement in neuropsychiatric illness. *Psychopharmacol*. 1995, 31:159–165.
- (45) Adair, J. C., J. E. Knoefel, and N. Morgan. Controlled trial of N-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology* 2001, 57:1515–1517
- (46) Sian, J., D. T. Dexter, A. J. Lees, S. Daniel, Y. Agid, F. Javoy-Agid, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol*, 1994, 36:348–355.

- (47) Manfredini S, Pavan B, Vertuani S, Scaglianti M, Cinpagnone D, Biondi C, et al. Design, synthesis and activity of ascorbic acid prodrugs of nipecotic, kynurenic and diclophenamic acids, liable to increase neurotropic activity. *J of Med Chem* 2002, 45, 559-62.
- (48) Cray, P. N., P. C. May, L. Mundy, and J. Elkins. L-Glutamate toxicity in untington's disease fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 95:707–714.
- (49) Louwerse, E. S., G. J. Weverling, P. M. Bossuyt, F. Meyjes, and J. de Jong. Randomized, double-blind, controlled trial of acetylcysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch.Neurol.* 1995, 52:559.
- (50) Michael Y bonner, Jack L Arbiser. *The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer.* *Future Med Chem* 2014, 6(12) 1413-1422
- (51) Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free radical boil Med* 1988, 5113-124
- (52) Nishikawa T, Edekteub D, Du XL, Yamashigi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, and Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hiperglycaemic damage. *Nature* 2000, 404, 787-790.
- (53) Patel RS, Al Mheid I, Morris AA, Ahmed Y, Kavtaradze N, Ali S, Dabhadkar K, Brigham K, Hooper WC, Alexander RW et al. Oxidative stress is associated with impaired arterial elasticity. *Atherosclerosis* 2011; 218 90-5.
- (54) Davis C, Bryan J, Hodgson J, Murphy K. Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review. *Nutrients.* 2015 Nov 5; 7(11):9139-53
- (55) Eguaras S, Toledo E, Hernández-Hernández A, Cervantes S, Martínez-González MA. Better Adherence to the Mediterranean Diet Could Mitigate the Adverse Consequences of Obesity on Cardiovascular Disease: The SUN Prospective Cohort. *Nutrients.* 2015 Nov 5; 7(11):9154-62.
- (56) Ammar W. Achor, Mario Siervo, Jose Lara, Clio Oggioni and John C. Mathers. Antioxidant Vitamin Supplementation Reduces Arterial Stiffness in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The journal of Nutrition.* 2014. Oct 144(10) 1594-602.
- (57) Francesco Violi, Daniele Pastori, Pasquale Pignatelli and Lorenzo Loffredo. Antioxidants for prevention of atrial fibrillation: a potentially usefull future therapeutic approach? A review of the literature and meta-analysis. *Europance* 2014, 16, 1107-1116.
- (58) Seung-Kwon Myung, Woong Ju, Belong Cho, Seung-Won Oh, Sang Min Park, Bon-kwon Koo, Byung-Joo Park. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in preventioin of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ* 2013, 346, 10 pages.