



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Efecto del consumo de vino tinto de Castilla y León sobre el estrés oxidativo en ratas Wistar

Silvia Ruiz Crespo

Tesis de Master en Seguridad y Biotecnología Alimentarias

Septiembre de 2009



UNIVERSIDAD DE BURGOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Pilar Muñiz Rodríguez profesora del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos y profesora del Master Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en dicha Universidad,

INFORMA:

Que Doña Silvia Ruiz Crespo ha realizado un trabajo experimental fin de estudios en la Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe, titulado “**Efecto del consumo de vino tinto de Castilla y León sobre el estrés oxidativo en ratas Wistar**” tutelado por Dña. M^a Jesús Coma del Corral y Dña. Pilar Muñiz Rodríguez.

Asimismo, informa que tras revisar la realización y memoria de dicho trabajo, **considera que cumple los requisitos y características exigidos en la normativa vigente** para ser considerado como Trabajo Experimental Fin de Estudios correspondiente a la Tesis de Master Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en la Universidad de Burgos.

Informe que, a los efectos oportunos extiende en Burgos a 22 de septiembre de 2009.

Fdo: Pilar Muñiz Rodríguez

Fdo: M^a Jesús Coma del Corral

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, cada vez son más los estudios dirigidos hacia los hábitos alimenticios que están considerados como preventivos de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo tales como cáncer, diabetes, aterosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, enfermedades inflamatorias, envejecimiento, etc (Valko y cols. 2007). Así la llamada “dieta mediterránea” que incluye un consumo moderado de vino, es considerada una dieta saludable como consecuencia de su alto contenido de antioxidantes los cuales disminuyen el estrés oxidativo.

El interés por los beneficios saludables del consumo de vino, fue lo que impulsó los primeros estudios epidemiológicos que encontraron la relación del patrón de dieta tradicional asociada a un consumo moderado de vino, con la reducción de la mortalidad cardiovascular (Leger St. al 1979; Rimm et. al 1991; Renaud y Lorgeril, 1992). Renaud y Lorgeril en su artículo de 1992 enunciaron la Paradoja Francesa, que indicaba una baja tasa de la mortalidad coronaria entre los franceses a pesar del alto consumo (14-15 % de energía) de grasas saturadas en su dieta.

En la actualidad la acción de los radicales libres en distintas enfermedades asociadas al estrés oxidativo es un hecho conocido y suficientemente demostrado como resultado del incremento de ROS (especies oxigénicas reactivas), de NOS (especies reactivas del nitrógeno) o como consecuencia de una disminución de los mecanismos antioxidantes. La toxicidad radica en la capacidad de reaccionar con distintas biomoléculas generando daños oxidativos permanentes, como la interacción con proteínas (fragmentación, formación de grupos carbonilo), lípidos (peroxidación lipídica, oxidación las LDL) o el DNA (regiones abásicas, modificación de bases) (Valko y cols 2007; Cooke y cols 2003; Marnet 2000; Oliva y cols 1995).

La eliminación de los radicales libres por parte de los organismos vivos es llevada a cabo a través de antioxidantes endógenos como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GSH-PX), o los antioxidantes tiolicos no enzimáticos glutatión (GSH) y tioredoxina (TRX). Su función es eliminar los radicales libres como el superóxido, y peróxidos antes de que ellos reaccionen e interaccionen con distintas biomoléculas induciendo el daño celular (Halliwell y Gutteridge 1999). Bajo ciertas circunstancias de estrés oxidativo (envejecimiento, inflamación, enfermedad renal crónica, cáncer, etc) esta defensa endógena celular no es suficiente y juega un papel importante los antioxidantes de la dieta como vitaminas y polifenoles reforzando la actividad antioxidante endógena (Fang y cols 2002; Pulido y cols 2003).

El vino, bebida obtenida a partir del zumo de *Vitis vinifera*, está asociado a numerosos estudios epidemiológicos *in vitro*, y en menor número, *in vivo*, que relacionan su consumo moderado con la reducción de ciertas enfermedades como las cardiovasculares (Gago y cols. 2007; Arendt y cols 2005; Dell Agli y cols 2004; Leighton y cols 1999). Estos efectos beneficiosos del vino son atribuidos a la acción conjunta de sus compuestos bioactivos, más que a un único compuesto, y a un modelo inteligente de consumo, un consumo moderado, más que a un consumo de grandes cantidades. Entre estos compuestos bioactivos están los compuestos fenólicos cuyo efecto beneficioso es por actuar a través de distintos mecanismos bioquímicos como antioxidantes y scavenger de radicales libres (Rivero y cols. 2007; Modun y cols 2008; Fernández-Pachon y cols 2005). Entre los compuestos fenólicos que se encuentran en el vino y contribuyen a la capacidad antioxidante del mismo están los compuestos fenólicos de bajo peso molecular (ácido cafeico), estilbenos (resveratrol), flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, antocianos y taninos. Esta

composición varía dependiendo de la variedad de uva, proceso de vinificación, edad, etc. (Rivero y cols. 2008). *In vitro*, es sabido que estos polifenoles inhiben la peroxidación de las LDL, protegen frente a la peroxidación lipídica, alteran el estado antioxidante, decrecen la agregación plaquetaria y los sistemas de inflamación mientras incrementan la vasodilatación (Modum y cols. 2008; Rodrigo y cols. 2005). A nivel de experimentación con modelos animales, compuestos del vino como el resveratrol tienen acción antiinflamatoria, efectos antifibrogénicos y efectos antioxidantes, así como efectos inhibidores de la aparición de células tumorales y de progresión y desarrollo de tumores.

Pero los beneficios de los polifenoles para la salud dependen de la ingesta y de la biodisponibilidad, que pueden variar ampliamente de unos a otros. Los estudios sobre la biodisponibilidad de los polifenoles del vino son limitados, se han realizado principalmente con compuestos individuales y son pocos los realizados con muestras de vino. Generalmente la absorción y metabolismo de los polifenoles está influenciada por su solubilidad y su estructura química (Arend y cols, 2005; Stahl y cols 2002). Una porción importante de los flavonoides del vino son polímeros y deben de ser degradados para su absorción a nivel del intestino. Los flavonoides no tánicos aparecen glicosilados y sólo la mitad aparecen como agliconas, formas en la que son absorbidos. Por lo tanto la diferencia de unas variedades de vinos a otros en relación a su composición fenólica determinará la mayor o menor biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y posiblemente sus efectos saludables *in vivo*.

Entre los factores que inducen estrés oxidativo *in vivo* se encuentran agentes químicos como el tamoxifeno, un antiestrógeno no-esteroide de uso frecuente en el tratamiento de algunos tipos de cáncer pero con unos efectos secundarios, incluyendo nefrotoxicidad mediada por estrés oxidativo (Tabassum y cols 2007; Parvez y cols 2006). Este compuesto induce el estrés oxidativo a través de las mitocondrias generando radicales superóxido y peróxido nítrico a través de vías dependientes del óxido nítrico.

Aunque es sabido que los polifenoles del vino son biodisponibles y contribuyen a la actividad antioxidante endógena, esta se puede ver afectada por el contenido de polifenoles de esta variedad de vino como por el alcohol, siendo los resultados encontrados en la bibliografía contradictorios. El estudio de los antioxidantes en plasma es dinámico y puede ser modificado por varios factores entre ellos la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes como el vino, por lo tanto la relación entre capacidad antioxidante del plasma y daño oxidativo refleja el estrés oxidativo real. Por otro lado, el riñón es uno de los tejidos donde se acumulan y se metabolizan los polifenoles, durante el cual se pueden generar nuevos componentes que contribuyan incrementando su actividad antioxidante endógena o actuando sinérgicamente con otros antioxidantes, como vitaminas o GSH.

En base a lo anteriormente expuesto en este trabajo se realizó un estudio *in vivo* con animales de laboratorio, concretamente con ratas Wistar, con el objetivo de determinar los posibles efectos derivados de la ingesta de consumo moderado de vino monovarietal envejecido en barrica de DO Ribera del Duero, sobre la biodisponibilidad y contribución sobre la capacidad antioxidante endógena de plasma y riñón y la respuesta frente al estrés oxidativo inducido con tamoxifeno.

OBJETIVOS CONCRETOS

1. Estudiar en plasma de ratas Wistar el efecto de la ingesta moderada de vino sobre la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) y biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.
2. Estudiar en riñón el efecto de la ingesta moderada de vino sobre el estado antioxidante no enzimático y enzimático y biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.
3. Establecer el efecto del consumo moderado de vino sobre el estrés oxidativo inducido con tamoxifeno, mediante la evaluación del estado antioxidante y biomarcadores de estrés oxidativo, en plasma y riñón de ratas Wistar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipos y aparatos:

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Espectrofotómetros
- Centrífugas
- Baños termostatizados de temperatura regulable
- PH metro
- Balanzas y microbalanzas
- Agitadores magnéticos con calefacción
- Agitadores magnéticos de tubos vórtex
- Congelador a -80°C y congelador a -20°C

Reactivos

Ácido acético, L-acido ascórbico, ácido clorhídrico (HCl), Ácido fosforito (H_3PO_4), Ácido gálico, Ácido metafosfórico (MPA), Ácido tiobarbitúrico (TBA), Ácido tricloroacético (TCA), Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Acetato de etilo, Acetato de sodio, Ázida de sodio, ABTS (2, 2'- azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), n-butanol, Carbonato de sodio (CO_3Na_2), Cloruro férrico (FeCl_3), Cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de potasio (KCl), 2,4-dinitrobenzoin (CDNB) 2-desoxirribosa, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH), dodecilsulfato sódico (SDS), Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4), fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), fosfato de nicotinamida adeninucleótido (NADPH), Guanidina, Hidroxido de sodio (NaOH), Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), Nitroblue tetrazolium chloride (NBT), Patrón GSH, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), persulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Reactivo de Folin-Ciocalteu, Seroalbúmina bovina (BSA), Sulfato de cobre (II) (CuSO_4), Sulfato de hierro (II) (FeSO_4), TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-carboxilico ácido), TPTZ (2,4,6-Tris-(2-piridil)-S-triazina), TMP (1,1,3,3-tetrametoxipropano), Tartrato Na-K. Kits: Superóxido dismutasa K335-100 y Bioxytech® Catalasa-520™. Enzimas: Glutathion reductasa, Glutathion-S-transferasa.

Selección y caracterización de la muestra de vino

El estudio se realizó con un vino comercial monovarietal de la variedad de tinto del País, variedad característica de los vinos de Castilla y León, envejecido 18 meses en barrica francesa y americana. Esta variedad está situada en la zona del Alto Duero y el vino tinto obtenido con esta variedad es aromática y con gran riqueza en elegantes sensaciones olfativas que se ponen de manifiesto a lo largo de la evolución. El vino utilizado fue un vino comercial de las bodegas Emilio Moro de la Ribera de Duero, de la cosecha del 2006.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar machos, de 3-4 meses de edad y peso comprendido entre 250-300g a las que se alimentó con dieta estándar y agua *ad libitum*. Los animales fueron instalados en jaulas en las condiciones apropiadas del estabulario de la Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe.

Se establecieron cuatro grupos de animales:

- 1) Grupo de vino: Correspondiente al grupo de ratas que bebieron durante un mes vino. El consumo de vino se corresponde a la ingesta de 250 ml/día correspondiente a una persona de 70 Kg de peso. A estos animales se les suministra el vino utilizando una sonda gástrica.
- 2) Grupo control: durante los días de estudio las ratas ingieren agua mediante una sonda gástrica.
- 3) Grupo tamoxifeno: durante los 23 últimos días que dura el experimento, a los animales se les administra mediante una sonda gástrica tamoxifeno en una concentración de 100 mg/65 Kg de peso.
- 4) Grupo tamoxifeno-vino: la ingesta con vino se inicia 7 días antes del tratamiento con tamoxifeno. Las dos tomas se hacen a distinta hora.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados y se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos para separar plasma y eritrocitos. En plasma se determinó la actividad antioxidante total y los eritrocitos se hemolizaron para determinar antioxidantes.

El riñón fue lavado con suero fisiológico y homogenizado con tampón fosfato potásico 50mM, e inhibidor de proteasas (Roche) para determinar los antioxidantes y marcadores del daño oxidativo (Zhao, Gao, Li & Xu, 2004).

Determinación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante se evaluó siguiendo los métodos adaptados para las muestras de vino descrito por Rivero-Pérez et al. (2007), los resultados expresados en μM de Trolox.

- Método ABTS

Esta técnica mide la capacidad antioxidante para estabilizar el catión radical ABTS^{•+} generado por la adición de persulfato potásico. La mezcla de reacción fue preparada mezclando ABTS 7 mM con persulfato potásico 2,45 mM. Para un volumen

final de 1 ml de la mezcla de reacción se añaden 10 µl de muestra, se incuba 4 minutos y se lee la absorbancia a $\lambda = 735$ nm. Los resultados se expresan en µM de trolox.

- Método FRAP (Poder reductor de las muestras)

Este ensayo está basado en la capacidad de la muestra para reducir el Fe (III) hasta Fe (II) mediante cuantificación espectrofotométrica a 593 nm de color azul del complejo formado, tripiridiltrazina-Fe(II) (TPTZ-Fe (II)). La mezcla de reacción fue preparada mezclando 735 µl de tampón acetato sódico 0,3 M (a pH 3,6), 75 µl de tricloruro de hierro 20 mM, 75 µl de TPTZ 10mM y 95 µl de agua mili-Q. Posteriormente se añadieron alícuotas de 20 µl de muestra a la mezcla de reacción y se incuba a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se mide la absorbancia a 593 nm. Los resultados se expresaban en mM de Fe (II), utilizando el sulfato de hierro para realizar la recta de calibrado.

Determinación de la capacidad scavenging de hidroxilo

Se siguió el método de Halliwell y Gutteridge (1981), basado en la formación del radical hidroxilo que oxida desoxirribosa formando productos oxidados que por calentamiento con ácido tiobarbitúrico forman un cromóforo de color rosa cuantificable. Para las determinaciones se mezcló 10 µl de desoxirribosa 100 mM con la misma cantidad de ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno, hierro y EDTA, en presencia y ausencia de muestra, añadiendo tampón hasta alcanzar 1 ml de volumen final. Se dejó incubar a 37°C durante 60 minutos, se añadió ácido tricloroacético y tiobarbitúrico, se incubó a 100°C durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 532 nm.

Determinación cuantitativa de polifenoles totales

Se determinó la cantidad total de polifenoles siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) para las muestras de vino y con ligeras modificaciones para las muestras de plasma, para evitar la interferencia de proteínas (Serafine y cols,). Se mezclan 10µl de ácido metafosfórico (MPA) con 50 µl de plasma y se centrifuga a 2700 g durante 3 minutos. 5 µl del sobrenadante se mezclan con 95 µl de agua, 500 µl de Folin-Ciocalteu, 400 µl de carbonato de sodio y se incubó 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se evaluó la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm frente a un blanco. Los resultados se expresaban en µg/ml de equivalentes de ácido gálico, el calibrado se realizó con la solución estándar de este mismo ácido.

Determinación de proteínas

Se determinaron siguiendo el método de Lowry (1951). A 10 µl de homogenado de tejido o 10 µl de plasma se completó con agua mili-Q hasta 1 ml. Se añadieron 5 ml de reactivo A (carbonato de sodio al 3% en NaOH 0,1 M, sulfato de cobre al 2 % y tartrato de sodio-potasio). Posteriormente se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se añade 0,5 ml del reactivo Folin-ciocalteu (dilución 1:2), se agitó y se incubó durante 10 minutos. Se cuantifica midiendo la absorbancia de las muestras a 620 nm utilizando una recta de calibrado con BSA. La concentración de proteínas se expresa en µg seroalbúmina bovina/ml.

Valoración del daño oxidativo a biomoléculas

- Determinación de MDA

Los niveles de MDA se determinaron por HPLC siguiendo el método de Grotto y cols. (2007) con ligeras modificaciones, que se basa en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido generando un complejo coloreado formado por condensación de dos moléculas de TBA con una de MDA y la posterior determinación del complejo por HPLC utilizando una columna de fase reversa ODS2 y detección a 532nm. A 75 µl de muestra (plasma o riñón) se le añadieron 25 µl de agua mili-Q y 25 µl de NaOH 3M. Se incubó a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se añadió 125 µl de H₃PO₄ al 6% y 125 µl de TBA al 0,8% y se somete a incubación de 90°C durante 45 minutos. Se enfría la mezcla y se le añaden 50 µl de SDS al 10% y se realiza una extracción con 300 µl de n-butanol. Posteriormente se centrifuga a 3000g durante 10 minutos y se inyectan 20 µl del sobrenadante en el HPLC. Las condiciones del HPLC son: Fase móvil: Tampón fosfato 50 mM pH 6,8 + 35% de metanol; Fase estacionaria: ODS 5#61549; m (0,46x25cm); Flujo 1ml/min; Detector UV-Vis: λ=532nm; Volumen pinchado: 20µl. La curva de calibrado se realiza con TMP (1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano).

- Determinación de grupos carbonilo

El procedimiento utilizado fue desarrollado por Levine y cols (1990). Se basa en la reacción equimolecular de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas. La DNFH unida a proteínas se cuantifica espectrofotométricamente tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con un ácido y posterior solubilización con guanidina. Se mezclaron 10 µl de muestra (plasma o riñón) con 500 µl de DNFH al 0,2% (p/v) en HCl 2N, y se incubó 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 500 µl de TCA al 20% (p/v) se dejó actuar durante 15 minutos a 0-4°C y se centrifugo a 6000g durante 3 minutos, descartándose el sobrenadante. Para eliminar el exceso de reactivo libre, se lavó el precipitado tres veces con 1 ml de una mezcla de etanol:acetato de etilo (1:1) dejándolo a temperatura ambiente 10 minutos entre lavado y lavado. Posteriormente se redisuelve el precipitado con 1 ml de guanidina 6 M y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 373 nm frente a la solución de guanidina. El contenido de carbonilos se expresan como nmoles de grupo carbonilo/mg de proteína.

Determinación de antioxidantes endógenos

- Determinación de glutatión reducido (GSH)

Se siguió el método de Brigelius y cols (1983), basado en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro 2,4-dinitrobenzenu (CDNB). El GS-DNB formado absorbe a 340 nm de longitud de onda, siendo proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra. Se tomaron 25 o 500 µl de plasma o riñón, respectivamente. Se mezclaron con 750 µl de tampón fosfato potásico 0.1M, EDTA 1 mM, (pH 7), 10 µl de CDNB 10 mM y 5 µl de la enzima glutatión transferasa. Posteriormente se sigue la reacción espectrofotométricamente a 340nm.

- Determinación superóxido dismutasa (SOD)

El ensayo se determinó utilizando un Kit de BioVision, que utiliza WST-1 para generar una solución acuosa y coloreada de formazan tras reducirse con el anión superóxido. El resultado de la reducción con el anión superóxido está linealmente

relacionado con la actividad de la xantina oxidasa. Una unidad de actividad SOD es la cantidad de muestra necesaria para alcanzar el 50% de inhibición.

- Determinación de la catalasa

El ensayo de la actividad de la catalasa se realizó utilizando el kit, BIOXYTECH® Catalase-520™. El ensayo se basa en que resultado de la dismutación del peróxido de hidrógeno hasta agua y oxígeno molecular es proporcional a la concentración de catalasa. La cantidad de H₂O₂ que queda sin reaccionar, se determina después con una segunda reacción oxidativa del 4-aminofenazona (4-aminoantipireno, AAP), con el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico (DHBS) y la presencia del H₂O₂. Esta reacción es catalizada por la enzima HRP (peroxidada del rábano). La imina quinona coloreada resultante (N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinonamonoimina) es medida a 520 nm.

- Determinación de la Glutathion peroxidasa

La técnica está basada en la determinación de la oxidación del glutathion reducido (GSH) por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en una reacción catalizada por la GPx. El GSH se mantiene a una concentración constante durante la reacción mediante la adición de glutathion reductasa y NADPH; así, el glutathion oxidado (GSSG) se reduce formando GSH y el NADPH es oxidado y consumido durante la reacción. La tasa de formación de GSH es monitoreada mediante la disminución en la absorbancia a 340 nm producida por el consumo del NADPH a 37°C.

Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como la media ± desviación estándar. Para establecer la diferencia entre la media, se utilizó el test de "t de Student" siendo considerado significativo el valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico de los datos fue representado utilizando el análisis de varianza (ANOVA) con Staphgraphics.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los compuestos fenólicos del vino además de ser responsables de su color y aroma poseen propiedades antioxidantes que permiten actuar como estabilizadores de los radicales libres, y contribuyen a sus efectos saludables. Son numerosos los estudios *in vitro* que demuestran esta capacidad antioxidante, por ello en este trabajo se dio un paso más y se hizo este estudio *in vivo* donde se evaluó el efecto de la ingesta moderada de vino tinto monovarietal sobre el estrés oxidativo en ratas Wistar.

El origen varietal de los vinos así como el envejecimiento induce diferencias en el vino que se traducen en un perfil fenólico diverso. El vino utilizado en este estudio, es un vino monovarietal de la variedad de tinto del País, variedad característica de los vinos de Castilla y León, envejecido 18 meses en bodega francesa y americana, tal y como se señala en la metodología. El perfil de polifenoles totales y compuestos fenólicos más abundante en el vino antocianos (AT) las catequinas (CAT), los flavanoles (FT) y los ésteres tartáricos (ET) y los resultados se resumen en la tabla 1. Entre estos flavonoides los *antocianos* son los más abundantes en vino y se caracterizan por su contribución a la capacidad antioxidante. Los antocianos juegan un papel en la reducción de la peroxidación lipídica, en la oxidación de las LDL, en la

oxidación mediada por enzimas y por tanto retrasa la aparición y progreso de enfermedades comunes crónicas como son la aterogénesis, la trombosis y el cáncer.

Tabla 1. Polifenoles totales y caracterización fenólica del vino

| PT (mg/L ác. gálico) | AT (mg/L malvidin-3-Gl) | CAT (mg/L D-catequina) | FT (mg/L quercetina) | ET (mg/L ác. cafeico) |
|-------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 2927± 6,6 | 245± 15,9 | 607± 2,2 | 127± 6,4 | 15,82 ± 1,2 |

Los resultados se corresponden a una media ± desviación estándar (n=4)

La caracterización de la capacidad antioxidante del vino se realizó in vitro mediante ensayos químicos y se resumen en la tabla 2. En la tabla se presenta, la capacidad antioxidante total de la muestra de vino determinado por el método ABTS, expresada en μM de Trolox, el poder reductor de la muestra de vino determinado por el método FRAP expresado en mM de hierro (II), el porcentaje de inhibición de los radical hidroxilo que tiene la muestra de vino, que viene expresado en porcentaje de inhibición y el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica expresado en TBARS % inhibición que tiene el vino utilizado en nuestro estudio.

Los resultados muestran que esta variedad de vino presenta una *elevada capacidad antioxidante* con valores significativamente superiores a los obtenidos en otros trabajos de investigación (Rivero y cols 2007) donde obtuvieron valores de ABTS de 22.09 ± 8.30 y para el FRAP 35.08 ± 15.66 . Así mismo el vino mostró tener capacidad scavenger o estabilizadora frente al radical hidroxilo, esta actividad ha sido descrita previamente siendo debida principalmente a los antocianos y flavanoles presentes en los vinos. En relación a la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica inducida por el radical peroxilo, fue de un 30%, similar a la obtenida en otros trabajos.

Tabla 2. Capacidad antioxidante y de la actividad estabilizadora del radical hidroxilo (HRSA)

| ABTS (μM Trolox) | FRAP (mM Fe (II)) | HRSA (% Inhibición) | Peroxidación lipídica (TBARS % inhibición) |
|---|------------------------------|--------------------------------|---|
| 52,25 ± 2,18 | 93,10 ± 3,15 | 44,42±2,43 | 30 ±10 |

Los resultados se corresponden a una media± desviación estándar (n=4).

1.-Cuantificación de la capacidad antioxidante total y biomarcadores de estrés oxidativo en plasma

Los antioxidantes son necesarios para prevenir la formación de radicales libres y su inhibición para detener la acción de las especies reactivas del oxígeno que producen los daños a lípidos, proteínas y DNA (Parvez y cols. 2006). Con el objetivo de valorar como el consumo de vino afecta al estado antioxidante del plasma, evaluamos los niveles de polifenoles totales y la capacidad antioxidante total y se comparó con el grupo control.

En la figura 1 (A) se representan los resultados obtenidos al medir la cantidad de polifenoles totales en plasma. Los resultados muestran como la concentración de polifenoles totales en plasma del grupo que consumió vino son significativamente superiores a los niveles presentes en el plasma del grupo control. Estos resultados nos indican la biodisponibilidad de los polifenoles del vino, siendo estos resultados similares a los obtenidos por otros autores (Arend y cols 2005)

La capacidad antioxidante total de las muestras de plasma del grupo control y del grupo vino se muestran en la figura 1(B). Esta capacidad antioxidante ha sido evaluada por dos métodos distintos, el método ABTS que mide la capacidad de estabilizar un radical y el método FRAP que mide la capacidad reductora. Los resultados muestran que la capacidad antioxidante del plasma medida por ambos métodos, es superior en el grupo de ratas que consumieron vino que en el grupo control. Este incremento en la capacidad antioxidante del plasma puede ser debida al incremento observado de los polifenoles o como consecuencia que el consumo de vino incrementa la capacidad antioxidante de otros compuestos del plasma (Modum y cols 2008).

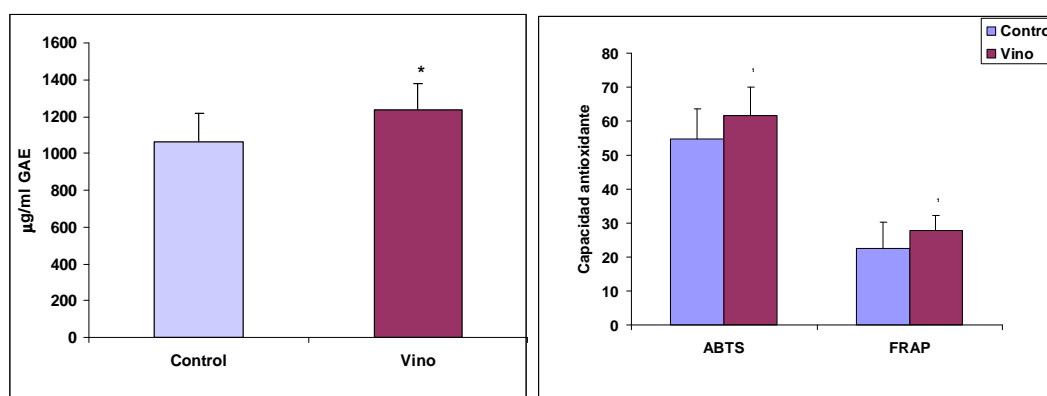


Figura 1. Polifenoles totales (A) y capacidad antioxidante (B) en plasma de ratas que consumieron agua (grupo control) y las que consumieron vino. Los resultados se expresan como media \pm desviación. Los resultados corresponden a una media \pm desviación estándar (n=6) y se expresan en μ M Trolox para el ABTS, mM Fe (II) (x100) para el FRAP y en μ g/ml ac. Gálico para los polifenoles totales * P<0.05.

Para evaluar el daño oxidativo a las biomoléculas determinamos la cantidad de grupos carbonilos y de malondialdehído en las muestras de plasma del grupo control y el grupo vino. Como se observa en la figura 2, la cantidad de grupos carbonilo disminuye de manera significativa en el grupo del vino con respecto al control. De la misma manera en el caso del daño a lípidos, se ve un descenso en los niveles de malondialdehído en el plasma del grupo que consumió vino frente al del grupo control, aunque en este caso la diferencia entre los dos grupos no es significativa posiblemente debido a la gran desviación obtenida.

Este descenso en el daño a proteínas y lípidos que se produce en el grupo de ratas que han consumido vino con respecto al grupo control puede ser explicada por el aumento de la capacidad antioxidante, debida a los compuestos fenólicos del vino, que se ha producido en el plasma tras la ingesta de vino.

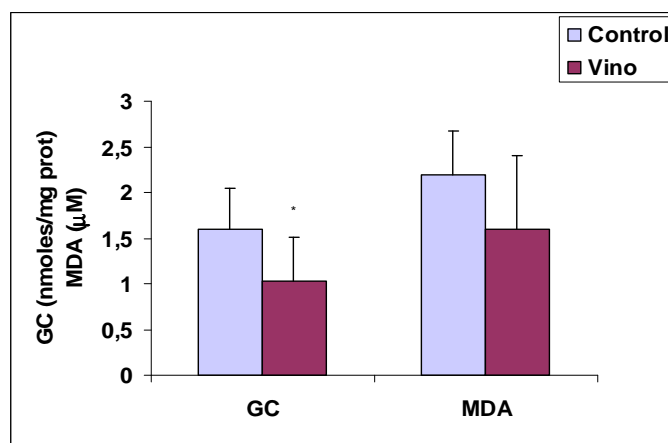


Figura 2. Grupos carbonilo y MDA en plasma de ratas que consumieron agua (grupo control) y las que consumieron vino. Los resultados se expresan como media \pm desviación. Los resultados corresponden a una media \pm desviación estándar (n=6) * P<0.05.

2.- Efecto del consumo de vino sobre biomarcadores de estrés oxidativo y antioxidantes en riñón.

El segundo objetivo de este estudio se lleva a cabo determinando el efecto del consumo del vino sobre la capacidad antioxidante y los biomarcadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas en riñón. El estrés oxidativo está implicado en diferentes fisiopatologías renales como el fallo renal agudo, así las células del glomérulo o del túbulo intersticial se ven dañadas por un incremento de ROS como el radical superóxido, radical hidroxilo, óxido nítrico (Rodrigo y cols 2002). Por lo tanto el vino puede tener efectos beneficiosos debido a la acción específica de sus compuestos fenólicos, entre ellos las procianidinas o el resveratrol, donde diferentes estudios muestran su papel en el riñón, contribuyendo a su capacidad antioxidante (Rodrigo y cols 2002; Corder y cols 2006)

El resultado del daño a proteínas medido como grupos carbonilo y a lípidos evaluado como niveles de MDA en las muestras de riñón se muestra en la figura 3. Como se puede observar, el grupo que consumió vino presenta un descenso significativo en los niveles de grupos carbonilo y malondialdehído respecto al grupo control. Este descenso en el daño oxidativo a biomoléculas en animales de experimentación que consumieron vino de otras variedades fue observado también por otros autores en distintos tejidos (Rodrigo R. y Catillo R. 2005; Assuncao y cols 2009).

Esta disminución es debida a que el vino induce el incremento de la capacidad antioxidante del plasma contribuyendo a la mejora del sistema de defensa antioxidante de distintos tejidos, entre ellos el riñón (Rodrigo R. y cols. (2005). Así nuestros resultados se corroboran con los de estos investigadores donde observaron una relación inversamente proporcional entre la peroxidación lipídica en el riñón y los valores de capacidad reductora en plasma (FRAP). Así, la prevención de la peroxidación lipídica por el vino tinto in vivo, está determinada principalmente por la presencia de polifenoles, que pueden prevenir reacciones celulares de peroxidación y a una disminución de las complicaciones ateroscleróticas por la inhibición de la oxidación de las LDL.

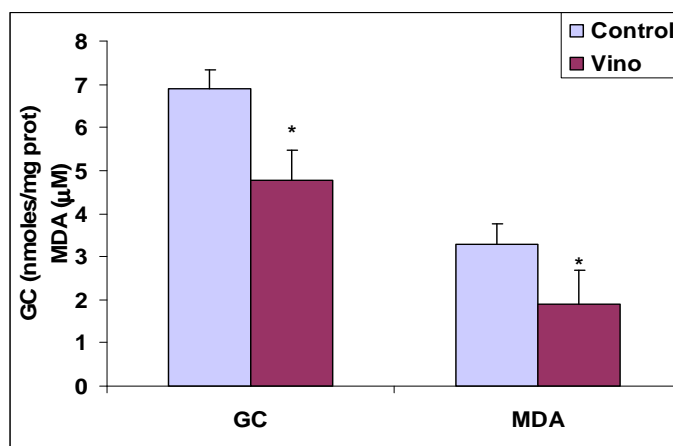


Figura 3. Grupos carbonilo y MDA en riñón de ratas que consumieron agua (grupo control) y las que consumieron vino. Los resultados se expresan como media \pm desviación. Los resultados corresponden a una media \pm desviación estándar (n=6) * P<0.05.

Entre los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo de las células se encuentran, el antioxidante no enzimático glutatión (GSH), y la triada de antioxidantes enzimáticos, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. El GSH juega un papel fundamental en la defensa celular contra los radicales libres y otras sustancias oxidantes (Meister y Anderson, 1983), además de actuar en la detoxificación del H_2O_2 (Parvez y cols. 2006).

Estos mecanismos de defensa pueden verse modificados como consecuencia de la ingesta de vino, tanto como consecuencia de los antioxidantes presentes en el mismo, como por el etanol. Por esta razón fue evaluada la actividad de las mismas en las muestras de riñón de nuestros grupos a estudio, para ver que efecto tiene el consumo moderado de vino en estos mecanismos de defensa.

Los resultados se muestran en la figura 4. La figura 4 (A) muestra niveles más altos del tripéptido en el grupo que consumió vino, incremento que puede ser como consecuencia de un aumento de la síntesis de glutatión o como consecuencia de un incremento en la reducción del glutatión oxidado (Roig y cols 1999). Este incremento en los niveles de glutatión puede contribuir a la marcada reducción observada en los niveles de MDA y grupos carbonilo.

Por otra parte la figura 4 (B), nos muestra el resultado de los antioxidantes enzimáticos superóxido dismutasa (SOD), catalasa (cat) y glutatión peroxidasa (GPX) en homogenizado de riñón después del consumo de vino. Nuestros resultados muestran un ligero aumento no significativo de la superóxido dismutasa, y un descenso de la catalasa y glutatión peroxidasa, siendo este descenso significativo solo en el caso de la catalasa. Estos resultados nos indican el papel protector mediado por los polifenoles del vino contribuyen disminuir las especies oxigénicas reactivas que inducen la actividad de estas enzimas. El incremento de la superóxido dismutasa puede ser resultado de un incremento del radical superóxido, posiblemente debido al metabolismo del etanol.

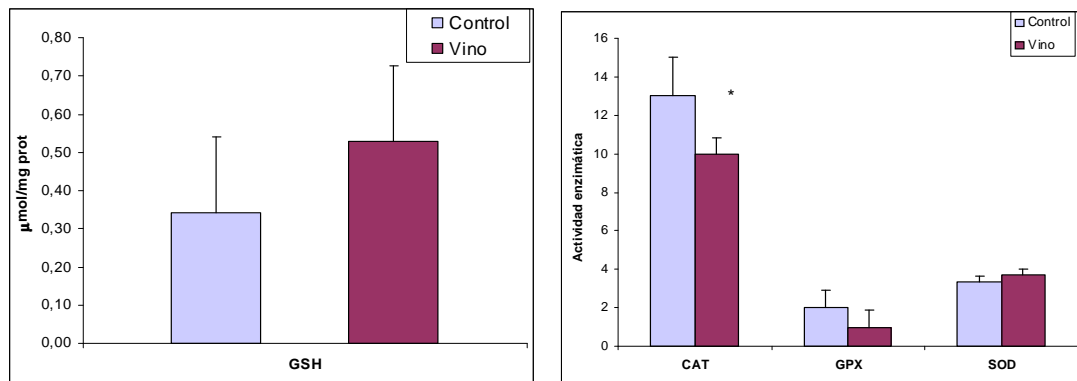


Figura 4. Antioxidantes no enzimáticos (A) y enzimáticos (B) en riñón de ratas que consumieron agua (grupo control) y las que consumieron vino. Los resultados se expresan como media desviación. Los resultados corresponden a una media \pm desviación estándar (n=6) * P<0.05. La actividad enzimática se expresa en unidades de (U/mg prot.) en el caso de CAT y SOD y en unidades de (U/dg prot.) para la GPx.

En resumen la disminución del daño oxidativo a proteínas y lípidos, la actividad enzimas antioxidantes con disminución de la actividad catalasa indican el papel protector mediado por los polifenoles de este vino monovarieta elaborado con uva tinta del país de Castilla y León.

3.- Efecto del estrés oxidativo inducido con tamoxifeno sobre biomarcadores de estrés oxidativo y antioxidantes.

El último objetivo fue estudiar el efecto del consumo de vino monovarietal, sobre el estrés oxidativo inducido. En nuestro estudio, como se ha citado previamente se utilizó el tamoxifeno como inductor del estrés oxidativo en las ratas.

El tamoxifeno es un compuesto utilizado como antitumoral (Ching et al., 1992) que produce toxicidad en algunos órganos como hígado o riñón (Parvez y cols. (2006). Aumentan las evidencias de que este daño en tejidos producido por el antitumoral está asociado al daño de los radicales libres y el estrés oxidativo (Conklin, 2004), Entre las especies reactivas que se ven incrementadas está el superóxido o el óxido nítrico mitocondrial, (Nazarewicz y cols. 2007). Este estrés oxidativo inducido resulta en un incremento de la peroxidación lipídica y por la alteración de los sistemas de defensa antioxidante enzimática y no enzimática (Parvez S.y cols 2006).

Con el objetivo de evaluar como el consumo moderado de vino ejerce un efecto sobre el estrés oxidativo inducido por el tamoxifeno se realizó un estudio con un grupo control (grupo de ratas que solo consume agua), un grupo control oxidado (grupo de ratas que consume tamoxifeno), y un grupo vino-tamoxifeno (grupo de ratas que consume tamoxifeno y además vino). La ingesta de vino se realizó 7 días previo a la ingesta de tamoxifeno con el objetivo de acondicionar a los animales para evaluar el efecto preventivo del consumo de vino.

Los distintos ensayos de capacidad antioxidante en plasma (ABTS y FRAP) o actividad enzimática y de daño a biomoléculas (daño a proteínas y lípidos) en estos dos grupos (control oxidado y vino-tamoxifeno), se determinó en muestras de plasma y

riñón. Este estudio es previo a un trabajo que se está realizando y representa los resultados de un solo estudio de n=3 ratas.

3.1 Estudio realizado en plasma

Al igual que se hizo para los grupos control y vino, se determinan la cantidad de polifenoles totales en las muestras de plasma de los grupos tamoxifeno y vino-tamoxifeno, y se comparan los resultados con los obtenidos en el grupo control para ver si existe variación dentro de los grupos.

Los resultados de la determinación de polifenoles totales se representan en la figura 5. Esta grafica nos indica, que entre los grupos control y grupo que fue tratado con tamoxifeno no existen diferencias en los niveles de polifenoles totales, resultado lógico si tenemos en cuenta que a ninguno de estos grupos se les administro vino.

Por otra parte, se observa un aumento significativo de los polifenoles totales en el grupo vino-tamoxifeno con respecto a los otros dos grupos siendo los resultados similares al grupo que consumió vino solo (figura 1). Estos resultados nos muestran que no existe interacción entre el tamoxifeno y los polifenoles.

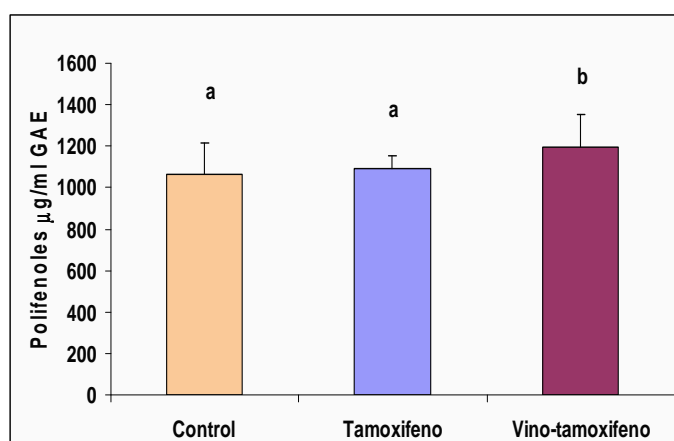


Figura 5. Polifenoles totales en plasma de los grupos control (ratas que consumieron agua), tamoxifeno (ratas que consumieron tamoxifeno) y vino-tamoxifeno (ratas que consumieron vino y tamoxifeno). Los resultados se expresan como media \pm desviación.

Además de los polifenoles totales, se evaluó la capacidad antioxidante del plasma de los grupos tamoxifeno y vino-tamoxifeno. Los resultados obtenidos de determinar la capacidad antioxidante por el método ABTS y FRAP se representan en la figura 6 y se expresan como % del incremento del estado antioxidante del plasma en el grupo vino-tamoxifeno con respecto al grupo tratado solo con tamoxifeno.

Como se puede ver en la figura, el incremento de la capacidad antioxidante en el plasma de las ratas que además de tamoxifeno consumen vino frente a las que no lo consumen es de un 9% en el caso del método ABTS y es mayor por el método FRAP con un incremento en el grupo que consumio vino del 19%.

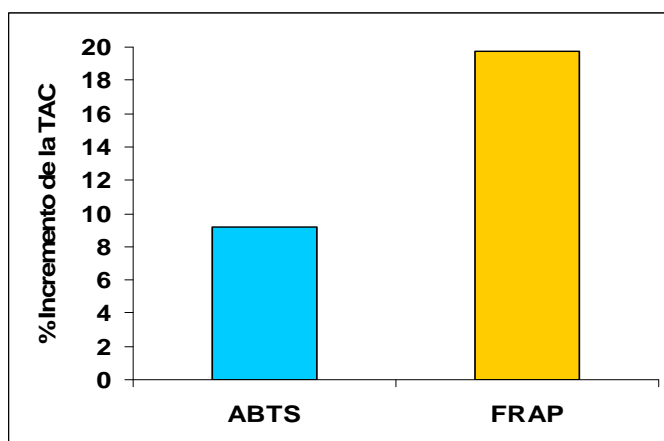


Figura 6. Incremento de la capacidad antioxidante en plasma de ratas tamoxifeno-vino. Los resultados se expresan como media \pm desviación. Los resultados se expresan con respecto al grupo del tamoxifeno.

Además se evaluó el daño que se producía en las proteínas y lípidos tras inducir el estrés oxidativo con el tamoxifeno en ambos grupos. En la figura 7 se muestran estas variaciones en las concentraciones para los distintos grupos. A la izquierda se muestra como el tamoxifeno incrementa la oxidación de las proteínas con respecto al grupo control, esto se puede justificar porque el tamoxifeno produce un incremento de radicales libres como el superóxido (Tabassum H. 2007). Por otro lado, el consumo de vino en el grupo de vino-tamoxifeno produce un descenso en los niveles de grupos carbonilo hasta niveles intermedios entre el grupo control y el grupo tamoxifeno.

A la derecha de la figura se muestra el daño a lípidos medido como niveles de MDA para los distintos grupos. Esta nos indica un aumento de malondialdehído tras la administración de tamoxifeno, Por otro lado se observa como disminuyen los niveles de MDA por el grupo de vino-tamoxifeno hasta niveles algo inferiores a los del grupo control. Las diferencias no son significativas entre los 3 grupos, probablemente por las grandes desviaciones de las medidas.

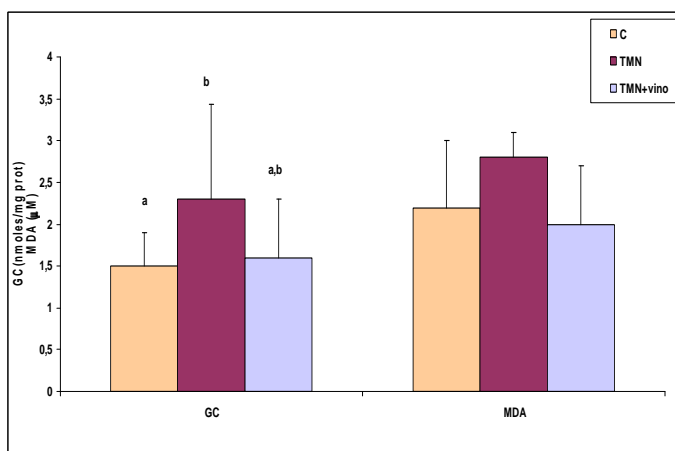


Figura 7. Grupos carbonilo y MDA en el plasma de ratas control, tamoxifeno y vino-tamoxifeno. Los resultados se expresan como media \pm desviación.

3.2 Estudio realizado en riñón

Ente los efectos del tratamiento con tamoxifeno está la nefrotoxicidad mediada por estrés oxidativo como resultado del incremento de especies oxigénicas reactivas como el superóxido, que como resultado de su dismutación generara el peroxido de hidrógeno que podrá interactuar con el oxido nítrico generando peroxido nitrito (Tabassum H. y cols (2007), (Nazarewicz R. R. y cols (2007) y (Parvez S. y cols, (2006).

La peroxidación lipídica de las membranas esta regulada por la disponibilidad de los sustratos en la forma de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), la disponibilidad de los inductores como los radicales libres y el estado de excitación de las moléculas para iniciar la propagación, el estado de la defensa antioxidante y estado físico de la membrana lipídica. La administración de tamoxifeno favorece la producción de radicales por encima de los niveles normales. (Parvez S. 2006). Así nuestros resultados sobre el estudio del daño oxidativo a lípidos de grupos de ratas con estrés oxidativo inducido con tamoxifeno se evaluó cuantificando los niveles de MDA y comparando el homogenizado de riñón de ratas control, ratas tratadas con tamoxifeno y aquellas que además de tamoxifeno que ingirieron vino.

Los resultados se muestran en la figura 8, donde se observa una concentración significativamente mayor de MDA en el grupo tratado con tamoxifeno comparado con el grupo control. El consumo de vino muestra una reducción significativa de los niveles de MDA por debajo incluso de los niveles obtenidos para el grupo control, está disminución por debajo del grupo control también se observó cuando se evaluó el consumo de vino sin inductor de estrés oxidativo.

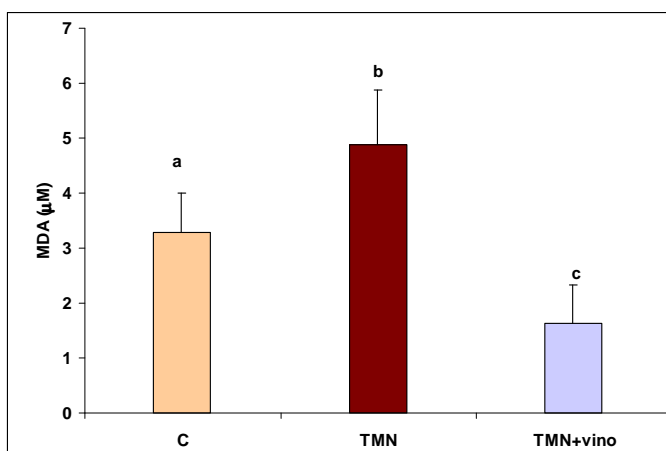


Figura 8. MDA en riñón de ratas control y aquellas tratadas con tamoxifeno y con vino-tamoxifeno. Los resultados se expresan como media \pm desviación.

El estado de la defensa antioxidante no enzimática se evaluó cuantificando los niveles del tripéptido tras la inducción del estrés. Los resultados se muestran en la figura 9, donde se observa un descenso en la concentración de GSH en aquellas ratas que han sido tratadas con el medicamento con respecto al grupo control (grupo que solo a consumido agua). Si se compara el grupo control oxidado frente al grupo vino-tamoxifeno se observan valores ligeramente inferiores en el grupo de ratas que consume vino aunque estas diferencias no son significativas.

Este descenso en el GSH del grupo tamoxifeno en comparación con el grupo control, aunque no es significativo, probablemente debido a la alta desviación de las medidas, se debe a la acción detoxificadora del GSH que interacciona con el tamoxifeno, lo que conlleva a una disminución del tripéptido que se puede ver incrementada por el estrés oxidativo. (Tabassum H. y cols. 2007).

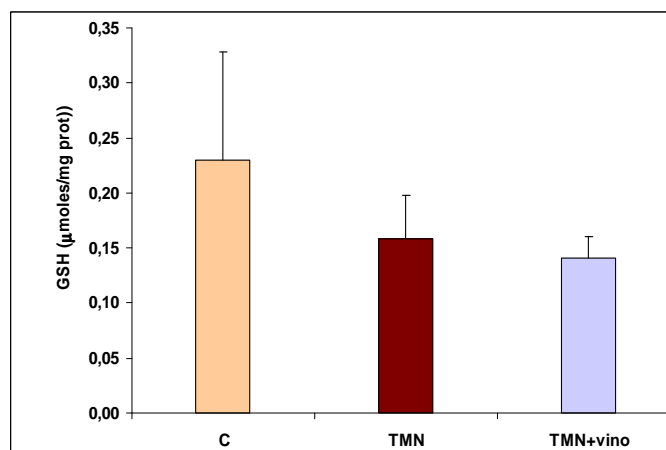


Figura 9. GSH en riñón de ratas control, tratadas con tamoxifeno y con vino-tamoxifeno. Los resultados se expresan como media \pm desviación.

Además de la evaluación en riñón de este antioxidante no enzimático, se evaluaron también las actividades de los mecanismos de defensa enzimáticos como son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Los resultados se muestran en la figura 10, donde se observa la evolución de estas enzimas en los distintos grupos de ratas, control, control oxidado y vino-tamoxifeno.

Los resultados muestran que la enzima SOD aumenta su actividad en las ratas que eran tratadas únicamente con tamoxifeno con respecto al grupo control (grupo de ratas que solo se consumían agua) y recupera a niveles basales en el grupo que consumió vino y era tratada con tamoxifeno, aunque las diferencias no fueron significativa. Estos resultados contradicen lo observado por otros autores donde observan una disminución en la actividad SOD de riñón, tras el consumo de tamoxifeno con respecto a un grupo control que no tomaban ningún tipo de medicamento (Parvez S. y cols (2007)).

La actividad de la enzima catalasa, sin embargo disminuye significativamente en el grupo de ratas sometidas al estrés oxidativo con respecto al grupo control. Este descenso de los niveles de CAT en riñón se debe a que la inducción de estrés oxidativo con tamoxifeno conduce a la interrupción de la actividad del enzima (Parvez S. y cols. 2006). Por otra parte en el grupo de vino-tamoxifeno se observó un descenso significativo de los valores con respecto al control oxidado, esto puede ser debido a los bajos niveles de H_2O_2 por la acción de antioxidantes del vino como los polifenoles o el GSH, que juega un importante papel en la detoxificación del H_2O_2 (Parvez S. 2006).

En relación a la actividad de la enzima glutatión peroxidada se pone de manifiesto la reducción de la actividad resultado del estrés oxidativo en las ratas con la administración del tamoxifeno. Estos valores de GPx son significativamente menores a

los del grupo control, siendo similares a los observados por otros autores que utilizan el tamoxifeno para reducir la actividad del GPx citoplasmático en ratas (Tabassum H. 2007). Al observar el efecto del consumo de vino tras la inducción del estrés oxidativo en las ratas, se comprueba un incremento de la actividad con respecto al control oxidado, pero no recuperan los valores del grupo control

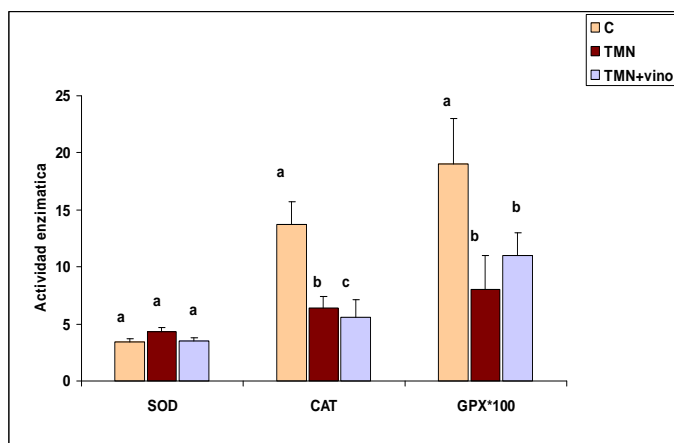


Figura 10. Antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) en riñón de ratas control, tratadas con tamoxifeno y vino-tamoxifeno. Los resultados se expresan como media \pm desviación. La actividad enzimática se expresa en unidades de (U/mg prot.) en el caso de CAT y SOD y en unidades de (U/dg prot.) para la GPx.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio sobre el efecto de la ingesta de vino tinto sobre el estrés oxidativo en ratas wistar nos permite establecer las siguientes conclusiones:

- La capacidad antioxidante en el plasma de rata aumenta tras el consumo moderado de vino monovarietal acompañado de una disminución del daño a lípidos y a proteínas.
- La ingesta moderada de vino sobre el riñón induce cambios en el estado antioxidante no enzimático y enzimático y muestra un efecto protector al reducir los niveles en los biomarcadores de daño oxidativo.
- Tras la inducción de estrés oxidativo mediante tamoxifeno se produce un aumento del daño a lípidos y proteínas además de disminuir los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en plasma y riñón. La ingesta de vino monovarietal en situaciones de estrés oxidativo produce una disminución muy importante de los daños a biomoléculas recuperándose a los niveles del grupo control, tanto en plasma como en riñón.

Al igual que en otros estudios este estudio proporciona nuevas pruebas bioquímicas que apoyan la contribución de los polifenoles del vino monovarietal para disminuir el riesgo de la progresión de enfermedades crónicas a nivel animal.

BIBLIOGRAFÍA

Arendt BM, Ellinger S, Kekic K, Geus L, Fimmers R, Spengler U, Müller WU, Goerlich R. (2005). Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial (ISRCTN68505294). *Nutr J.* 14;4:33.

Assunção M, Santos-Marques MJ, Monteiro R, Azevedo I, Andrade JP, Carvalho F, Martins MJ. (2009). Red wine protects against ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *J Agric Food Chem.* 57(14):6066-73.

Bertelli AA. (2007). Wine, research and cardiovascular disease: instructions for use. *Atherosclerosis.* 195(2):242-7.

Ching CK, Smith PG, Long RG. (1992). Tamoxifen-associated hepatocellular damage and agranulocytosis. *Lancet.* 339(8798):940.

Conklin KA. (2004). Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr.* 134(11):3201S-3204S.

Collins AR. (2005). Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl):261S-267S.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17(10):1195-214.

Corder R, Mullen W, Khan NQ, Marks SC, Wood EG, Carrier MJ, Crozier A. (2006). Oenology: red wine procyanidins and vascular health. *Nature.* 444 (7119):566.

Dell'Agli M, Buscialà A, Bosisio E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res.* 63(4):593-602.

Fang YZ, Yang S, Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18(10):872-9. Review.

Fernández-Pachón MS, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. (2005). Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers. *J Agric Food Chem.* 53(12):5024-9.

Gago B, Lundberg JO, Barbosa RM, Laranjinha J. (2007). Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. *Free Radic Biol Med.*43(9):1233-42.

German JB, Walzem RL. (2000). The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr.* 20:561-93.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. (2007). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 43(2):619-24.

Grønbaek M. (1999). Type of alcohol and mortality from cardiovascular disease. *Food Chem Toxicol.* 37(9-10):921-4.

Hwang ES, Bowen PE. (2007). DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 47(1):27-50.

Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Pérez DD, Strobel P, San Martín A, Urzua U, Díez MS, Foncea R, Castillo O, Mizón C, Espinoza MA, Urquiaga I, Rozowski J, Maiz A, Germain A. (1999). Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res.* 25(2-3):133-41.

Lodovici M, Guglielmi F, Casalini C, Meoni M, Cheynier V, Dolaro P. (2001). Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. *Eur J Nutr.* 40(2):74-7.

Meister A, Anderson ME. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 52:711-60.

Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Obad A, Palada I, Dujic Z, Boban M. (2008). The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis.* 197(1):250-6.

Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J, Ghafourifar P. (2007). Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res.* 67(3):1282-90.

Parvez S, Tabassum H, Rehman H, Banerjee BD, Athar M, Raisuddin S. (2006). Catechin prevents tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. *Toxicology.* 225(2-3):109-118.

Pulido R, Hernández-García M, Saura-Calixto F. (2003). Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr.*;57(10):1275-82.

Rodrigo R, Rivera G. (2002). Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med.* 33(3):409-22. Review.

Rodrigo R, Castillo R, Carrasco R, Huerta P, Moreno M. (2005). Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. *Life Sci.* 76(8):889-900.

Roig R, Cascón E, Arola L, Bladé C, Salvadó MJ. (1999). Moderate red wine consumption protects the rat against oxidation in vivo. *Life Sci.* 64(17):1517-24.

Russo A, Palumbo M, Aliano C, Lempereur L, Scoto G, Renis M. (2003). Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult. *Life Sci.*;72(21):2369-79.

Tabassum H, Parvez S, Rehman H, Banerjee BD, Raisuddin S. (2007). Catechin as an antioxidant in liver mitochondrial toxicity: Inhibition of tamoxifen-induced protein oxidation and lipid peroxidation. *J Biochem Mol Toxicol.* 21(3):110-7.

Tabassum H, Parvez S, Rehman H, Dev Banerjee B, Siemen D, Raisuddin S. (2007). Nephrotoxicity and its prevention by taurine in tamoxifen induced oxidative stress in mice. *Hum Exp Toxicol.* 26(6):509-18.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*;39(1):44-84.

Walzem R. L.. (2008). Wine and health: state of proofs and research needs. *Inflammopharmacology* 16:265-271.

Waterhouse A. L.. (2002). Wine Phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 957:21-36.

Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. (1995). Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem.* 41(1):32-5.

Zhao Y, Gao Z, Li H, Xu H. (2004). Hemin/nitrite/H₂O₂ induces brain homogenate oxidation and nitration: effects of some flavonoids. *Biochim Biophys Acta.* 1675(1-3):105-12.