

UNIVERSIDAD DE BURGOS



**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS
ALIMENTOS**

**EFFECTO DEL ÁCIDO 3-CAFEOILQUÍNICO EN
EL VOLUMEN DE INFARTO CEREBRAL Y EN
MARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN UN MODELO EN ANIMAL
EXPERIMENTAL**

**DESARROLLO DE UN MODELO PARA EL
ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO
CEREBRAL INFARTADO**

**SILVIA RUIZ CRESPO
BURGOS 2015**



UNIVERSIDAD
DE BURGOS



Fundación
Burgos por la Investigación de la Salud

Dña. Pilar Muñiz Rodríguez, profesora titular de la Universidad de Burgos y D. José M^a Trejo Gabriel y Galán, Jefe del Servicio de Neurología del Hospital Universitario de Burgos, en su calidad de directores de la Tesis Doctoral

CERTIFICAN

Que la memoria titulada “Efecto del ácido 3-cafeoilquínico en el volumen de infarto cerebral y en marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en un modelo en animal experimental. Desarrollo de un modelo para el estudio del estrés oxidativo en tejido cerebral infartado” que presenta Dña. Silvia Ruiz Crespo, licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Burgos.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Burgos, a 2 de Octubre de 2015.

Fdo. Dr. José María Trejo Gabriel y Galán

Fdo. Dra. Pilar Muñiz Rodríguez



UNIVERSIDAD DE BURGOS

PILAR MUÑIZ RODRIGUEZ EN SU CALIDAD DE COORDINADORA DEL
DOCTORADO EN AVANCES EN CIENCIA Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS

CERTIFICA

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado “*Efecto del ácido 3-cafeoilquínico en el volumen de infarto cerebral y en marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en un modelo en animal experimental. Desarrollo de un modelo para el estudio del estrés oxidativo en tejido cerebral infartado*” ha sido realizado Dña. Silvia Ruiz Crespo, bajo la dirección del Dr. José María Trejo Gabriel y Galán y la Dra. Pilar Muñiz Rodríguez y en representación de la Comisión de Doctorado, autoriza su presentación para ser defendida como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Burgos, a 2 de Octubre de 2015

Fdo. Pilar Muñiz Rodríguez

Agradecimientos

Me gustaría transmitir mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible que haya llegado aquí, en especial,

A la Dra. Pilar Muñiz, de la que sólo he obtenido facilidades para la realización de esta Tesis. Gracias por animarme a continuar, y por su trabajo y dedicación.

Al Dr. José M^a Trejo, por confiar en mí para llevar a cabo esta investigación. Gracias por su tiempo, paciencia y motivación.

Gracias a ambos, por su esfuerzo diario que ha hecho posible que este trabajo de investigación salga adelante.

A la Dra. Mónica Cavia, con la que compartí tantas cosas. Gracias por enseñarme y despertarme la curiosidad por la investigación.

A la Dra. M^a Jesús Coma, Jefa de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Burgos, por confiar en mí. Gracias por todas las facilidades dadas para realizar la parte experimental de esta tesis.

A todas las compañeras con las que he coincidido en la Unidad de Investigación, Carolina, Yolanda, Marta, Noemí, Celia, Teresa... por los buenos ratos compartidos y todo lo aprendido de vosotras. Gracias por vuestra ayuda y vuestro cariño.

A mis amigas y amigos, por estar siempre.

A mi FAMILIA, ejemplo de esfuerzo, humildad y superación. Gracias por TODO.

NO INTENTES BRILLAR, INTENTA CRECER Trabaja en silencio, el éxito hará todo el ruido por ti

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Burgos, y ha sido financiado por Caja Burgos-Banca Cívica a través de las ayudas a la investigación en los años 2010 y 2011.

A María

A mis padres

A mis hermanos

Al resto de mi familia

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
2.1 INFARTO CEREBRAL.....	5
2.1.1 Concepto y epidemiología de la isquemia cerebral.....	5
2.1.2 Factores implicados en la enfermedad.....	8
2.1.3 Prevención del ictus.....	12
2.1.4 Ictus, infarto de miocardio y efectos de la dieta sobre el tejido isquémico.....	22
2.2 ESTRÉS OXIDATIVO.....	24
2.2.1 Estrés oxidativo. Radicales libres. ROS NOS.....	24
2.2.2 Fuentes de los radicales libres.....	27
2.2.3 Efecto nocivo de los radicales libres.....	32
2.2.3.1 Daño oxidativo a proteínas.....	32
2.2.3.2 Daño oxidativo a DNA.....	33
2.2.3.3 Peroxidación lipídica.....	34
2.3 ANTIOXIDANTES.....	36
2.3.1 Definición.....	36
2.3.2 Antioxidantes Endógenos.....	37
2.3.3 Antioxidantes Exógenos.....	41
2.3.4 Biodisponibilidad de los antioxidantes.....	46
2.4 EFECTO DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS EN PREVENCIÓN DEL INFARTO CEREBRAL.....	49
2.4.1 Tipos de ácidos fenólicos. Ácido 3-cafeoilquínico.....	49
2.4.2 Efecto preventivo sobre la isquemia.....	51

2.5 METODOLOGÍA APLICADA PARA LA EVALUACIÓN DEL INFARTO CEREBRAL.....	51
2.5.1 Evaluación del infarto cerebral en humanos.....	51
2.5.2 Evaluación del infarto cerebral en el animal de experimentación.....	52
2.6 METODOLOGÍA APLICADA PARA EVALUAR EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	54
2.6.1 Conceptos y definiciones.....	54
2.6.2 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante.....	54
2.6.2.1 Método basado en la estabilización del ABTS ⁺	56
2.6.2.2 Método basado en la estabilización del DPPH.....	57
2.6.2.3 Método basado en la estabilización del DMPD ⁺	57
2.6.2.4 Actividad reductora del hierro férrico. Método FRAP.....	58
2.6.2.5 Método basado en la estabilización del radical peroxilo. Método ORAC.....	58
2.6.3 Determinación de polifenoles totales.....	59
2.6.4 Biomarcadores de estrés oxidativo.....	59
2.6.4.1 Biomarcadores de la oxidación a proteínas.....	59
2.6.4.2 Biomarcadores de oxidación a lípidos.....	60
2.6.4.3 Biomarcadores del daño al DNA.....	61
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
4.1 MATERIAL.....	69
4.2 ANIMALES Y DIETAS	71
4.3 MODELO DE ICTUS ISQUÉMICO.....	72
4.4 MEDIDA DEL VOLUMEN DE ISQUEMIA CEREBRAL.....	76

4.5 TRATAMIENTO CON EL ÁCIDO 3-CAFEOILQUÍNICO (3-CQA).....	78
4.6 EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL, TEMPERATURA Y SATURACIÓN.....	78
4.7 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	78
4.8 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES.....	79
4.9 DETERMINACIÓN DEL MDA.....	79
4.10 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	80
4.11 DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILO.....	80
4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	81
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
<i>Publicación 1: Coffee component 3-caffeoylquinic acid increases antioxidant capacity but not polyphenol content in experimental cerebral infarction.....</i>	<i>87</i>
<i>Publicación 2: Antioxidant coffee component 3-caffeoylquinic acid decreases infarct volume and plasma lipid oxidation-derived but not protein oxidation-derived products in an experimental model of cerebral infarct</i>	<i>105</i>
<i>Publicación 3: Localizing coordinates of cerebral ischemic tissue without the need of staining in a rat model of focal cerebral infarct.....</i>	<i>125</i>
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	139
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

ABREVIATURAS

Abreviaturas

- ABTS - 2,2-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)
- AC - Capacidad antioxidante total
- ACV - Accidente cerebrovascular
- ADP - Difosfato de adenosina
- ATP - Trifosfato de adenosina
- BSA - Seroalbúmina bovina
- CAT - Catalasa
- CDNB - Cloro 2,4-dinitrobenceno
- CGA - Ácido clorogénico
- 3-CQA - Ácido 3-cafeoilquínico
- 5-CQA - Ácido 5-cafeoilquínico
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- CuSO₄ - Sulfato de cobre (II)
- DMPD - N, N-dimetil-p-fenilendiamina
- DNPH - 2,4 Dinitrofenilhidrazina
- DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
- ECV - Enfermedad cerebrovascular
- EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético
- ELISA - Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- ET - Electron transfer
- FeSO₄ - Sulfato de hierro (II)
- FQA - Ácido feruloilquínico
- FRAP - Ferric reducing antioxidant power
- GAE - Ácido gálico
- GC - Grupos carbonilo
- GPx - Glutación peroxidasa
- GR - Glutación reductasa
- GSH - Glutación reducido
- GSSG - Glutación disulfuro u oxidado

- HAT - hydrogen atom transfer
- HDL - Lipoproteína de alta densidad
- H-E - Hematoxilina-eosina
- 4-HNE - 4-hidroxinonenal
- H₂O₂ - Peróxido de hidrógeno
- HPLC - Cromatografía líquida de alta resolución
- HTA - Hipertensión arterial
- I/R - Isquemia-reperfusión
- LDL - Lipoproteína de baja densidad
- LPO - Peroxidación lipídica
- MCAO - Oclusión de la arteria media cerebral
- µl - Microlitro
- MPA - Ácido metafosfórico
- NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- NADP - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
- NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
- NO[•] - Radical óxido nítrico
- NOX - NADPH oxidasas
- [•]OH - Radical hidroxilo
- 8-OHdG - 8-hidroxidesoxiguanosina
- ONOO[•] - Peroxinitrito
- ORAC - Oxygen radical absorbance capacity
- O₂^{•-} - Radical superóxido
- ¹O₂ - Oxígeno singlete
- PBS - Tampón fosfato salino
- PUFA - Ácidos grasos poliinsaturados
- ROO[•] - Radical peroxilo
- ROS - Sustancias reactivas de oxígeno
- RNA - Ácido ribonucleico
- RNS - Sustancias reactivas de nitrógeno

- SD - Desviación estándar
- SNC - Sistema nervioso central
- SOD - Superóxido dismutasa
- TAC - Capacidad antioxidante total
- TBA - Ácido tiobarbitúrico
- TBARS - Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
- TCA - Ácido tricloroacético
- TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity
- THS - Tratamiento hormonal sustitutivo
- TMP - (1,1,3,3-tetrametoxipropano)
- TPTZ - 2,4,6-Tris-2-piridil-s-triazina
- TROLOX - Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-cromán- 2-carboxílico
- TTC - Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
- XDH - Xantina deshidrogenasa
- XO - Xantina oxidasa

1. INTRODUCCIÓN

El infarto cerebral es una causa de muerte e invalidez de proporciones epidémicas. Los avances en su tratamiento se han producido previniendo la arteriosclerosis de las arterias que lo irrigan para evitar que acaben ocluyéndose y ello se ha llevado a cabo mediante medicamentos o por medio de modificaciones del estilo de vida, de las que la más importante es la alimentación.

Varios estudios epidemiológicos han mostrado que la ingesta diaria de alimentos ricos en antioxidantes naturales -y en particular los ricos en polifenoles- se asocia a una reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Bulló *et al.*, 2015; Widmer *et al.*, 2015; Hertog *et al.*, 1993; Stampfer *et al.*, 1993).

Esto se explica en parte porque los polifenoles interrumpen la peroxidación lipídica inducida por las especies reactivas de oxígeno (ROS) e impiden así la modificación de la fracción lipoproteica de baja densidad (LDL) del colesterol, que se acepta de forma general que está implicada en el inicio de la arterioesclerosis. Debido a la asociación negativa entre dieta mediterránea y tanto enfermedades cardiovasculares como ciertos tipos de cáncer, se considera que una dieta rica en frutas frescas, verduras, cereales integrales, legumbres y aceite de oliva tiene efectos beneficiosos sobre la salud humana (Saito *et al.*, 2015; Tripoli *et al.*, 2005). Algunos de los componentes de la dieta mediterránea, como la fibra, vitaminas, flavonoides y compuestos polifenólicos, juegan un papel importante en la prevención de estas enfermedades (Martínez-González *et al.*, 2015; Visioli, 2000).

El café es otro alimento que se asocia en estudios prospectivos con una menor incidencia de ictus (Kokubo *et al.*, 2013; Freedman *et al.*, 2012).

El compuesto fenólico más abundante en el café, es el ácido clorogénico y es el que más contribuye a su capacidad antioxidante (Bonita *et al.*, 2007). Una taza de café contiene de 70 a 350 mg de ácido clorogénico (Wang and Ho, 2009). Pertenece a la familia de ésteres y es el resultado de la interacción entre el ácido trans-cinámico y ácido quínico (Chen *et al.*, 2009). Su estructura polifenólica lo dota de una gran capacidad antioxidante y estabilizadora de radicales libres (Gonthier *et al.*, 2003; Bonita *et al.*, 2007; Ferruzzi, 2010; Yoshida *et al.*, 2008; Pulido *et al.*, 2003; Lopez-

García *et al.*, 2009; Góngora-Alfaro, 2010) y sus efectos no son citotóxicos sino preventivos de daño oxidativo celular y estabilizadores de las membranas.

El ácido clorogénico (CGA), incluye una familia de isómeros entre ellos el ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), y se detecta en plasma después de la ingesta de café en humanos (Crozier *et al.*, 2009). Además, este y otros compuestos relacionados, pueden contrarrestar el efecto de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y de los radicales libres 'in vivo' (Ong *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2007; Kono *et al.*, 1997).

Además de las medidas para prevenir la arteriosclerosis, el único otro tratamiento de utilidad en el infarto cerebral también es sobre las arterias y consiste en destruir el trombo en el momento que ocluye el flujo de sangre al cerebro. Sin embargo, hasta la actualidad no se conoce ningún tratamiento que actúe sobre el propio tejido cerebral. Conocemos que al menos parte de los eventos bioquímicos que se producen en dicho tejido cuando sufre isquemia están mediados por radicales libres, por lo que su estudio tiene gran importancia. De particular interés son los compuestos contenidos en los alimentos, pues su consumo habitual acredita su seguridad.

Por todo ello, esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio del efecto del ácido 3-cafeoilquínico, un componente del café de la familia del ácido clorogénico, en un modelo animal de infarto cerebral experimental. Las mediciones aplicadas en esta Tesis Doctoral para medir este efecto son el volumen de infarto en el tejido cerebral y en el plasma, marcadores de la capacidad antioxidante, contenido en polifenoles y biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas como son el malondialdehído y grupos carbonilo.

Asimismo, se ha desarrollado un método para localizar el tejido cerebral infartado por medio de coordenadas, sin necesidad de teñirlo con la finalidad de poder realizar los estudios de estrés oxidativo en el propio tejido cerebral y sin la interferencia de tinciones del infarto.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 INFARTO CEREBRAL

2.1.1 Concepto y epidemiología de la isquemia cerebral

El concepto de enfermedad cerebrovascular se refiere a todo trastorno en el cual un área del encéfalo sufre de forma transitoria o permanente isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por un proceso patológico (Díez-Tejedor *et al.*, 2001). ‘Ictus’ es un término latino que, al igual que su correspondiente anglosajón – stroke–, significa ‘golpe’, ambos describen perfectamente el carácter brusco y súbito del proceso (Díez-Tejedor *et al.*, 2001).

El accidente cerebrovascular es la cuarta causa principal de muerte en los EE.UU, por detrás de las enfermedades cardíacas, el cáncer y las enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores. Además es la causa más común de incapacidad permanente en los adultos de todo el mundo (Go *et al.*, 2014). En 2012, 12.436 hombres y 17.084 mujeres murieron en España a causa de enfermedades cerebrovasculares, siendo globalmente la segunda causa de defunciones (la primera causa en las mujeres), por detrás de las enfermedades isquémicas del corazón (Instituto Nacional de Estadística, 2012). Los ictus son además la primera causa de invalidez en los países occidentales.

La importancia de la enfermedad cerebrovascular, no sólo radica en la morbilidad y la mortalidad, sino también en el alto coste en servicios sociales y de salud que supone: el 47% de los pacientes con accidente cerebrovascular que sobreviven sufren de moderada a severa discapacidad física y disfunciones psicológicas que requiere la presencia de un cuidador (Vega Alonso *et al.*, 2006).

Los ictus se pueden clasificar según la naturaleza de la lesión en ictus isquémico (infarto cerebral) y hemorrágico (Figura 1). El accidente cerebrovascular isquémico representa aproximadamente el 87%, mientras que los ictus hemorrágicos suponen el 13% de todos los accidentes cerebrovasculares (Grysiewicz *et al.*, 2008). Sin embargo, tiene un riesgo de mortalidad mayor el ictus hemorrágico que el ictus isquémico (Lavados *et al.*, 2005). La correcta categorización etiológica del ictus

isquémico es fundamental para seleccionar el tratamiento preventivo más adecuado, y con ello disminuir el riesgo de recurrencias (Sobrino García *et al.*, 2013).

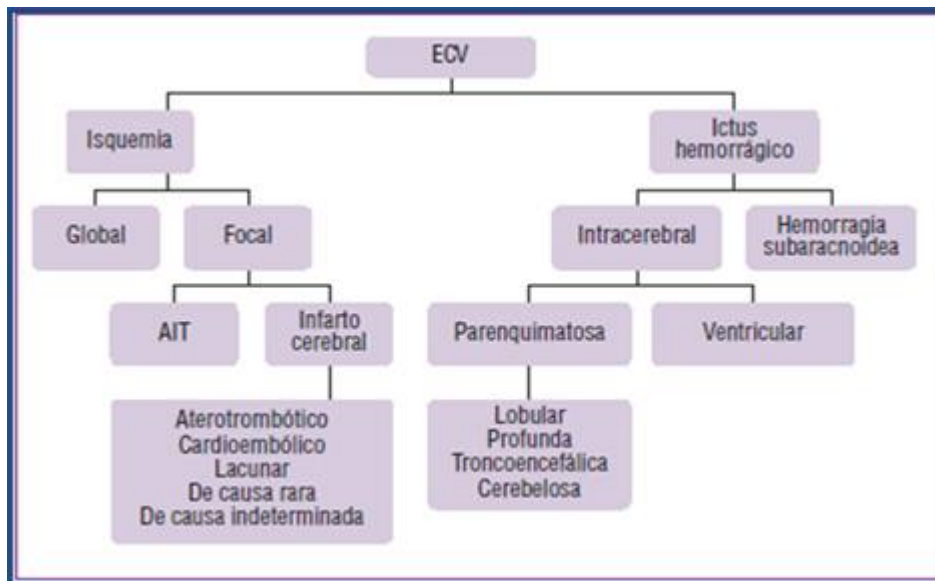


Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular (ECV) según su naturaleza (Díez-Tejedor *et al.*, 2001).

❖ Isquemia cerebral

La isquemia se produce como consecuencia de la falta de aporte sanguíneo al encéfalo, mientras que la hemorragia se debe a la extravasación de sangre por la rotura de un vaso sanguíneo intracraneal.

En función de la superficie afectada se clasifica en focal o global.

▪ Isquemia cerebral focal

Si la isquemia afecta solo a una zona del encéfalo, se llama isquemia focal, y se debe a que se ocluye una arteria cerebral. La isquemia focal es la forma más frecuente de afectación vascular del cerebro.

Dentro de la isquemia focal se consideran dos tipos:

- Ataque isquémico transitorio:

Episodio breve (menos de una hora) de disfunción neurológica causado por isquemia focal cerebral o retiniana que no deja lesión (infarto) en las pruebas de neuroimagen (Easton *et al.*, 2004).

Según el territorio vascular afectado, se clasifica en carotideo, vertebro basilar e indeterminado.

- Infarto cerebral:

Se habla de infarto cerebral cuando el déficit neurológico focal produce una necrosis tisular que se observa en neuroimagen.

El infarto cerebral es el conjunto de manifestaciones clínicas, de neuroimagen o patológicas que aparecen como consecuencia de la alteración en el aporte sanguíneo a una zona del encéfalo, lo que produce una necrosis tisular y determina un déficit neurológico focal habitualmente de duración mayor de una hora (Martínez-Vila *et al.*, 2011).

- Isquemia cerebral global

Cuando la isquemia compromete a todo el encéfalo de forma simultánea, estamos ante una isquemia global. Las posibles causas de isquemia cerebral global son variadas: paro cardíaco, arritmias, shock sistémico, cirugía cardíaca, etc.

Está ocasionada por un descenso importante y rápido del aporte sanguíneo al conjunto del encéfalo. La gravedad y extensión del daño isquémico dependerá de la intensidad y duración de la alteración hemodinámica responsable de la isquemia, pero comprometerá a ambos hemisferios cerebrales de forma difusa, pudiendo asociarse a lesiones en el tronco cerebral y el cerebelo. Cuando dura más de 5 minutos provoca estado vegetativo persistente o muerte.

❖ Ictus hemorrágico o hemorragia cerebral

El ictus hemorrágico consiste en la extravasación de sangre en el interior del parénquima cerebral o en el espacio subaracnoideo, como consecuencia de la rotura espontánea, no traumática, de un vaso sanguíneo, arterial o venoso, por diversos mecanismos (Arboix *et al.*, 2006).

Dependiendo de dónde se produzca primariamente el sangrado se distingue entre la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea.

2.1.2 Factores implicados en la enfermedad

Los factores de riesgo en el accidente cerebrovascular se dividen generalmente en factores de riesgo no modificables y modificables. Los más destacables en los factores de riesgo no modificables son la edad, sexo, etnia, enfermedades hereditarias, bajo peso al nacer (Goff *et al.*, 2014). Sobre estos no se puede actuar, pero deben tenerse en cuenta a la hora de identificar a las personas de mayor riesgo. Entre los factores de riesgo modificables están la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares, el tabaquismo, la dislipidemia, el abuso del alcohol, la obesidad, el síndrome metabólico, el uso de medicamentos anticonceptivos orales, tratamiento hormonal en mujeres postmenopáusicas, estenosis carotídea, enfermedad arterial periférica, el abuso de drogas, migraña y otras (Arboix, 2015), y sobre estos es posible un tratamiento y pueden ser modificados.

Factores de riesgo no modificables:

El accidente cerebrovascular puede ocurrir a cualquier edad, incluyendo las etapas fetales (Weir and Dennis, 1997), pero la edad supone un incremento exponencial en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular, pues un 95% de los accidentes cerebrovasculares ocurren en personas mayores de 45 años (Allen and Bayraktutan, 2009). Además con el aumento de la esperanza de vida, la prevalencia de ictus se prevé que aumente.

En cuanto al sexo, a una misma edad, los hombres muestran una mayor incidencia de enfermedad vascular cerebral que las mujeres (Arboix, 2015).

Con respecto a la etnia, se ha demostrado que los pacientes negros tienen una mayor incidencia de accidente cerebrovascular que los pacientes blancos (Furie *et al.*, 2011).

La historia familiar de ictus en familiares de primer grado también aumenta la probabilidad de sufrir un evento cerebrovascular agudo, incluso después de controlar otros factores de riesgo vascular. Este aumento del riesgo puede ser debido a distintos mecanismos, incluyendo la predisposición hereditaria a los factores de riesgo de accidente cerebrovascular (ACV), la transmisión genética de la susceptibilidad a un ACV, el estilo de vida en la familia, factores culturales y ambientales, e interacciones entre genes y factores ambientales (Dichgans, 2007).

El peso al nacer se asocia inversamente con la enfermedad coronaria y el accidente cerebrovascular (Goldstein *et al.*, 2006).

Factores de riesgo potencialmente modificables para el ictus isquémico

El factor más importante de riesgo modificable en el accidente cerebrovascular es la hipertensión arterial (HTA). La hipertensión, multiplica por 4 las probabilidades de sufrir un ictus. En estudios realizados en España (Vega *et al.*, 2009) se observó que de los pacientes que sufrían un accidente cerebrovascular en más del 50% de los casos existía hipertensión. Se considera hipertensión, cuando la presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg y / o presión arterial diastólica ≥ 90 mm Hg.

Las enfermedades del corazón son la segunda causa de accidentes cerebrovasculares agudos y se diagnostican en un tercio de los pacientes con accidente cerebrovascular (Arboix and Alió, 2010).

La estenosis carotídea asintomática también ha sido identificado como un factor de riesgo en el ictus (Goldstein *et al.*, 2006). Su prevalencia aumenta con la edad.

La fibrilación auricular está asociado al 50% de los casos de ictus de origen cardioembólico. Este riesgo de ictus se incrementa con la edad, y es hasta cinco veces mayor que en el resto de la población (Martínez-Vila *et al.*, 2011).

La terapia hormonal sustitutiva aumenta el riesgo de ictus. El riesgo parece aumentar en relación con la duración del tratamiento (Martínez-Vila *et al.*, 2011).

La dieta está fuertemente asociada con el riesgo de accidente cerebrovascular (Dearborn *et al.*, 2015). Un alto consumo de sal (Strazzullo *et al.*, 2009), está asociado a un aumento del riesgo de ictus. Por el contrario, un abundante consumo de frutas y verduras está relacionado con una menor incidencia (Hu *et al.*, 2014).

El sobrepeso y la obesidad son importantes factores de riesgo en las enfermedades cardiovasculares y el ictus entre otras (Klein *et al.*, 2004; Poirier, 2006). La obesidad abdominal, calculada mediante la circunferencia de la cintura o a través de la relación cintura-cadera, parece ser una medida muy sensible del riesgo vascular. Se considera obesidad cuando el índice de masa corporal (IMC) es ≥ 30 . Clínicamente, la obesidad abdominal está definida por una circunferencia de la cintura > 102 cm en hombres y 88 cm en las mujeres (Gustafson, 2006). Una reducción del peso y de la grasa abdominal se asocia con una disminución de la presión arterial, y puede por lo tanto, reducir el riesgo de accidente cerebrovascular (Arboix, 2015).

Se diagnostica diabetes mellitus cuando hay niveles altos de glucosa basal, (concretamente valores en ayunas ≥ 126 mg/dl). La diabetes y el metabolismo alterado de la glucosa es otro factor de riesgo, ya que las personas diabéticas tienen mayor susceptibilidad a la aterosclerosis y una mayor prevalencia de factores de riesgo aterogénico, especialmente hipertensión, obesidad y niveles de lípidos sanguíneos anormales. La influencia de la diabetes como potenciadora del riesgo de accidente cerebrovascular es mayor en las mujeres que en los hombres (Adrià Arboix *et al.*, 2006).

El aumento colesterol total y el asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) es otro de los factores de riesgo importante de las enfermedades cardiovasculares,

mientras que los triglicéridos tienen una influencia menor y el colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) parece tener un efecto protector (Expert Panel on Detection, Evaluation, 2001; National Cholesterol Education THProgram (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, 2002). El riesgo cardiovascular empieza a aumentar cuando los niveles de colesterol total son ≥ 220 -250 mg/dl pero si además existen otros factores de riesgo se aconseja mantenerlo por debajo de 200 mg/dl.

El tabaquismo es un factor de riesgo importante en las enfermedades cardiovasculares y el ictus (United States Surgeon General, 2004). Los fumadores tienen un riesgo relativo de ictus isquémico 1,92 veces mayor a los no fumadores. Fumar aumenta el riesgo de formación de trombos en los vasos arteriales estrechos y contribuye a aumentar la carga de la placa aterosclerótica. Además, aumenta la viscosidad de la sangre, el fibrinógeno y la agregación plaquetaria, y disminuye el colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c), causa daños directos al endotelio y aumenta la presión arterial (Burns, 2003).

La inactividad física es otro factor asociado a las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Artinian *et al.*, 2010). Puede considerarse inactividad física cuando el deporte o el trabajo físico en las actividades de la vida diaria ocupan menos de 3 horas a la semana (Vega *et al.*, 2009).

La actividad física regular tiene beneficios bien establecidos para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, la muerte prematura y el accidente cerebrovascular (Goldstein *et al.*, 2006). El efecto protector de la actividad física puede ser debido en parte por su papel en la reducción de la presión arterial y el control de otros factores de riesgo como la diabetes, el sobrepeso corporal y las enfermedades cardiovasculares (Smajlović, 2015).

El consumo excesivo y crónico de alcohol (> 60 g / día) se asocia con un aumento en el riesgo relativo de ictus de 1,69 (Belvis and Martí-Vilalta, 2012). El abuso crónico de etanol provoca diferentes procesos neurodegenerativos, incluyendo la demencia (Peters *et al.*, 2008).

El consumo de drogas (principalmente heroína, cocaína y anfetaminas) también se ha identificado como un factor de riesgo para el accidente cerebrovascular a través de diferentes mecanismos, como la presión arterial, aumento de la agregación plaquetaria y la viscosidad de la sangre (Allen and Bayraktutan, 2008).

2.1.3 Prevención del ictus

La detección y modificación de los factores de riesgo es fundamental para prevenir un primer ictus o accidente cerebrovascular transitorio (prevención primaria), y también para prevenir recurrencias después de un primer episodio (prevención secundaria). A menudo estos factores de riesgo se presentan de forma asociada, potenciándose entre sí (Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009).

Por lo tanto, es clave reconocer los factores de riesgo cardiovascular y tratarlos adecuadamente para establecer estrategias de prevención primaria en pacientes que no han sufrido ictus o tomar medidas de prevención secundaria para evitar la recurrencia de víctimas de accidentes cerebrovasculares (Arboix, 2015).

Para ello es fundamental un control estricto sobre la hipertensión arterial, el principal factor de riesgo modificable. Además se debe actuar sobre los niveles de colesterol. Aumentar la actividad física ayuda a reducir el sobrepeso y además se sabe que mejora los niveles de presión arterial y colesterol. Por tanto se deben fomentar hábitos de vida saludables que mejoren o retrasen su aparición, como puede ser aumentar la actividad física, controlar el peso corporal y la reducción del consumo de alcohol y tabaco, así como el consumo de sal (Montaner, 2008).

Prevención primaria

El objetivo de la prevención primaria es reducir el riesgo de accidente cerebrovascular en personas asintomáticas (Armario *et al.*, 2015), identificar a aquellos sujetos que tienen más riesgo de padecer ictus para reducirlo, tratando los factores de riesgo vascular modificables.

Este tratamiento se centra principalmente en la hipertensión arterial, trastornos del metabolismo de los lípidos, la diabetes mellitus y en estrategias no farmacológicas y cambios de estilo de vida, incluyendo el dejar de fumar, limitar el consumo de alcohol, y en la reducción del peso corporal elevado, aumentando regularmente actividad física aeróbica, y la adopción de una dieta saludable, con más frutas y verduras y menos sal (Polívka *et al.*, 2014). La influencia de la dieta sobre la salud y la enfermedad es enorme: mientras que solo los sujetos con enfermedad o factores de riesgo para desarrollarla toman medicinas, todos estamos influenciados, tanto antes como durante y después de estar enfermos por los componentes de la dieta, que por lo tanto está justificado estudiar.

Hipertensión arterial

Después de la edad, la hipertensión es el factor de riesgo que más significativamente se correlaciona con el accidente cerebrovascular.

La modificación de los estilos de vida puede reducir las cifras de presión arterial, pero muchos pacientes requieren, además, tratamiento con fármacos. El tratamiento antihipertensivo reduce sustancialmente el riesgo de accidente cerebrovascular, así como la muerte por ictus y la discapacidad (Gaciong *et al.*, 2013).

El objetivo general es mantener la presión arterial por debajo de 140/90 mmHg. Una combinación de dos o más agentes antihipertensivos es a menudo necesario para alcanzar estos objetivos. En los casos de diabetes mellitus, se incide más en el control de la presión arterial, y se recomienda tener valores por debajo de 130/80 mm Hg (Mancia, 2007).

Diabetes Mellitus

Un control regular de la glucemia reduce las complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía), pero no hay evidencias que reduzca la incidencia de ictus en pacientes con diabetes mellitus (Smajlović, 2015). Las complicaciones macrovasculares (cardiopatía isquémica, arteriopatía en piernas y enfermedades cerebrovasculares) dependen más de la presencia asociada de otros factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, dislipemia, tabaquismo y obesidad)

que del grado de hiperglucemia (Klein and Klein, 1998). Se recomienda una modificación del estilo de vida y una terapia farmacológica individualizada.

Hiperlipidemia

A pesar de que la relación entre los niveles elevados de colesterol en plasma y el riesgo cardiovascular está bien establecida, existía controversia sobre la asociación con el riesgo de sufrir un episodio de ictus (Abilleira Castells *et al.*, 2008). Estudios posteriores han mostrado que su reducción disminuye la recurrencia de ictus. Por este motivo y para prevención de enfermedad coronaria debe llevarse un control periódico del colesterol en sangre. Una modificación en el estilo de vida, y en particular de la alimentación, es la estrategia inicial. El tratamiento con estatinas se recomienda en pacientes con alto riesgo cardiovascular (Smajlović, 2015).

Tabaco

Los datos epidemiológicos indican una fuerte relación con el ictus, sobretodo en la edad joven (Feigin *et al.*, 2005) pero además tiene un efecto sinérgico con otros factores como la hipertensión, diabetes, el uso de anticonceptivos orales y la inactividad física. Por todo ello, y los varios cánceres a los que se asocia, se recomienda la abstinencia del tabaco.

Alcohol

El consumo excesivo de alcohol incrementa el riesgo de enfermedad vascular en general, y de ictus en particular (Abilleira Castells *et al.*, 2008). Se recomienda evitar el alcohol, o hacer un consumo moderado, no más de dos bebidas al día en varones y una en mujeres.

Otras drogas

El uso de diferentes drogas se ha relacionado con el riesgo de sufrir ictus y otras enfermedades vasculares. Se deben adoptar medidas para evitar y abandonar este tipo de adicciones en la población, sobre todo entre los más jóvenes (Abilleira Castells *et al.*, 2008).

Actividad física

Los individuos físicamente activos tienen un menor riesgo de accidente cerebrovascular o muerte que aquellos con baja actividad. Esta asociación puede ser debida, en parte, a un mecanismo multifactorial, a través del efecto beneficioso sobre el peso corporal, la presión arterial, el colesterol sérico, y la tolerancia a la glucosa. Se recomienda realizar ejercicio físico moderado, de forma regular y de tipo aeróbico entre 30-60 minutos cinco veces a la semana.

Dieta

Las dietas y alimentos ricos en antioxidantes, se consideran interesantes enfoques para la prevención de varias enfermedades crónicas (enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, varios tipos de cánceres, etc.), y en particular de la resistencia a la insulina que es la base de la diabetes tipo 2 (Mirmiran *et al.*, 2009; Bahadoran *et al.*, 2012).

En los estudios observacionales, la alta ingesta de frutas y hortalizas se asoció con un menor riesgo de accidente cerebrovascular, en comparación con los de ingestas menores (Joshi *et al.*, 1999). Se recomiendan dietas bajas en grasas saturadas y sal, alta en frutas y verduras y rica en fibra.

Obesidad

Un alto índice de masa corporal y la obesidad abdominal (medido por el diámetro de cintura o el índice cintura-cadera) se asocia con un aumento del riesgo de accidente cerebrovascular en hombres y mujeres, mediada principalmente por hipertensión arterial concomitante y diabetes mellitus.

Se recomienda a los sujetos con un índice de masa corporal elevado, dietas de reducción de peso. En casos puntuales se considerarán tratamientos farmacológicos o quirúrgicos de la obesidad (Abilleira Castells *et al.*, 2008) .

Anticonceptivos orales y terapias hormonales

Las tasas de ictus aumentan rápidamente en las mujeres después de la menopausia, pero además se ha visto que la terapia hormonal sustitutiva con

estrógenos incrementa el riesgo de ictus en las mujeres postmenopáusicas (Abilleira Castells *et al.*, 2008).

Por ello, no se recomienda las terapias de reemplazo hormonal en la prevención primaria del ictus en mujeres postmenopáusicas (Ringleb *et al.*, 2008).

Fibrilación auricular

La arritmia por fibrilación auricular es la causa más frecuente de ictus de origen cardioembólico (Sacco *et al.*, 1997). En los pacientes con fibrilación auricular los anticoagulantes tienen mayor eficacia que los antiagregantes para prevenir los ictus, aunque también tienen más complicaciones hemorrágicas (Abilleira Castells *et al.*, 2008).

Se recomienda tratamiento anticoagulante en todos los pacientes con fibrilación auricular, excepto en los menores de 60-65 años con fibrilación auricular aislada (sin otros factores de riesgo), en los que se recomienda en ocasiones no aplicar tratamiento (Diez Tejedor, 2006). Como alternativa en aquellos en los que esté contraindicada la anticoagulación oral se puede optar por antiagregantes (ácido acetilsalicílico) (Atrial Fibrillation Investigators, 1997).

Vitaminas

El déficit de determinadas vitaminas se ha asociado a un mayor riesgo de ictus (Marniemi *et al.*, 2005), aun así no se recomienda la suplementación.

Hiperhomocisteinemia

Es uno de los nuevos factores de riesgo relacionados con el desarrollo de aterosclerosis, enfermedad vascular e ictus (Lee *et al.*, 2003). En pacientes con hiperhomocisteinemia podría obtenerse beneficio con suplementos de ácido fólico (Diez Tejedor, 2006).

Prevención secundaria

La prevención secundaria está encaminada a evitar las recurrencias en pacientes que ya han sufrido algún episodio de ictus. Se ha demostrado que el 3% - 4% de todos los pacientes que sufren un accidente cerebrovascular experimentará un segundo accidente cerebrovascular dentro de los 5 años siguientes. La tasa de recurrencia en adultos jóvenes es mayor que en adultos mayores (Putala *et al.*, 2010).

En todos los tipos de accidente cerebrovascular isquémico es importante actuar sobre los factores de riesgo generales que llevaron a la enfermedad, como son el tratamiento de la presión sanguínea, agentes antidiabéticos, la terapia antiplaquetaria y agentes reductores de lípidos en el caso de la aterosclerosis, enfermedad cardíaca o trastornos metabólicos. Además se recomienda llevar una estilo de vida saludable, realizando actividad física regular, llevando una dieta baja en sal y grasas saturadas y rica en frutas y verduras, reduciendo el sobrepeso, y eliminando el tabaco y alcohol (Benjamin *et al.*, 2003).

Hipertensión arterial

También en prevención secundaria la hipertensión arterial es el factor más importante susceptible de intervención: su relación con el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares ha sido bien establecida en diversos estudios (Law *et al.*, 2009).

En general, se recomienda la reducción paulatina de la presión arterial en los pacientes con ictus (hipertensos o normotensos), después de la fase aguda, con fármacos antihipertensivos según la tolerancia del paciente y las enfermedades asociadas, situando el objetivo terapéutico de la presión arterial en valores inferiores a 130/80 mmHg, y siendo el óptimo inferior a 120/80 mmHg, según algunas guías de tratamiento de la HTA (Rothwell *et al.*, 2003; European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee, 2003).

Diabetes Mellitus

La diabetes es un factor de riesgo independiente muy importante para el ictus. Los pacientes con ictus diabéticos, tienen un peor pronóstico y una mayor mortalidad, así como mayores tasas de recurrencia de ictus en 6 meses (Jia *et al.*, 2011). Estos pacientes también tienen una alta prevalencia de otros factores de riesgo, como la hipertensión, hiperlipidemia, obesidad y resistencia a la insulina, que elevan el riesgo, por lo tanto, se requiere un tratamiento más agresivo de estas comorbilidades (Smajlović, 2015).

Hiperlipidemia

Las estatinas se consideran indicadas en la prevención secundaria del accidente isquémico transitorio y del ictus isquémico en pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica, o equivalentes de riesgo coronario o estenosis de carótida superior al 70%, diabetes mellitus o múltiples factores de riesgo con riesgo coronario a 10 años superior al 20%, con el objetivo terapéutico de LDL-c <100 mg/dl y <70 mg/dl en pacientes con riesgo muy alto (Diez Tejedor, 2006).

Dieta

Se aconseja seguir una dieta de tipo mediterráneo. Esta se caracteriza por un alto consumo de verduras, frutas y granos enteros e incluye productos lácteos bajos en grasa, aves, pescado, legumbres, aceite de oliva y frutos secos, limitando el consumo de dulces y carnes rojas. Este patrón de dieta puede proteger frente al ictus (Fung *et al.*, 2004). Además se recomienda reducir el consumo de sodio a menos de <2.4 g/d. También se recomienda una alimentación en general con bajo índice/carga glucémica. No se recomienda la suplementación de vitaminas.

Sobrepeso

La obesidad se asocia con un mayor riesgo de ictus (Kernan *et al.*, 2013). Esta asociación es más evidente para la obesidad central (circunferencia de la cintura) que para la obesidad general (índice de masa corporal), y más para el accidente cerebrovascular isquémico que para el accidente cerebrovascular hemorrágico. El riesgo se cree que está mediado sustancialmente por dislipidemia, hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes mellitus y las vías inflamatorias (Kernan *et al.*, 2013).

A pesar de los efectos beneficiosos demostrados de la pérdida de peso sobre los factores de riesgo cardiovascular, la utilidad de la pérdida de peso en el accidente cerebrovascular es incierto (Kernan *et al.*, 2013).

Síndrome metabólico

Se denomina síndrome metabólico a la confluencia de varias anormalidades fisiológicas que aumentan el riesgo de enfermedades vasculares, como el sobrepeso, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión e hiperglicemia.

Aunque todavía hay pocos datos, la terapia preventiva secundaria, debe centrarse en el asesoramiento para la modificación del estilo de vida (dieta, ejercicio y pérdida de peso). Además, debe incluir un tratamiento adecuado para los componentes individuales del síndrome, que también son factores de riesgo de accidente cerebrovascular, especialmente la dislipidemia y la hipertensión (Arenillas *et al.*, 2007).

Actividad física

No está claro el mecanismo por el cual el estilo de vida sedentario actúa como un probado factor de riesgo vascular, pero existen evidencias abrumadoras acerca de que el ejercicio físico practicado de forma regular disminuye las posibilidades de sufrir enfermedades vasculares y aumenta las probabilidades de sobrevivir si el evento se produce. El ejercicio parece tener un efecto positivo sobre otros factores de riesgo: incrementa la sensibilidad periférica a la insulina, reduce los niveles plasmáticos de triglicéridos, aumenta los niveles plasmáticos de colesterol HDL, disminuye la presión arterial moderadamente elevada y favorece el descenso de peso. Todos estos beneficios conducen a recomendar que todo paciente -dentro de sus limitaciones- inicie en un plan regular de actividad física (Warburton *et al.*, 2006).

Apnea obstructiva del sueño

La apnea está presente en un alto porcentaje de los pacientes con ictus (Arzt *et al.*, 2005). Se asocia con malos resultados en los pacientes con ictus, incluyendo una mortalidad más alta (Parra *et al.*, 2004). Se recomienda el tratamiento de la apnea del sueño para mejorar los resultados (Kernan *et al.*, 2014).

Tabaco

Los datos obtenidos de la asociación del tabaquismo y el riesgo de sufrir el primer ictus son numerosos, y aunque, son escasos en el caso de esta asociación de los ictus recurrentes (Kernan *et al.*, 2014), se debe aconsejar a los pacientes que han sufrido un ictus dejar de fumar.

Alcohol

Resultados similares se obtienen en el caso del alcohol, hay estudios que asocian el alcohol con un mayor riesgo de sufrir un ictus, pero son pocos que lo asocien a ictus recurrentes. Aun así la recomendación es eliminar o reducir el consumo de alcohol en pacientes bebedores, y no aconsejarlo a los no bebedores (Kernan *et al.*, 2014).

Tratamiento hormonal sustitutivo y anticonceptivo

El tratamiento hormonal sustitutivo (THS) en las mujeres postmenopáusicas está asociado a un incremento del riesgo de muerte relacionada con ictus. Lo mismo se observó en el caso de los anticonceptivos orales. Por todo ello se recomienda no utilizar el THS en la prevención secundaria del ictus y desaconsejar los anticonceptivos orales en mujeres con antecedentes de ictus transitorio o establecido (Diez Tejedor, 2006).

Pero debido a la heterogeneidad etiológica y del pronóstico y a la variación en el riesgo de recurrencia, la gestión de la prevención secundaria varía entre los subtipos, donde hay tratamientos específicos ya indicados (Sonderer and Katan Kahles, 2015).

Tratamientos farmacológicos:

Además de la modificación de los factores de riesgo, se recomienda el uso de antiagregantes plaquetarios y, ocasionalmente, endarterectomía o angioplastia transluminal percutánea.

Antiagregantes

Ácido acetilsalicílico: es un inhibidor de la ciclooxigenasa. En pacientes con antecedentes de ictus previo, la reducción del riesgo de ictus no mortal es del 23% y

de muerte vascular del 14% (Johnson *et al.*, 1999). Su toxicidad principal es la hemorragia gastrointestinal.

Ticlopidina: actúa bloqueando los receptores de difosfato de adenosina (ADP).

Clopidogrel: es una tienopiridina. Se indica sobre todo en pacientes con alto riesgo vascular, o en casos de intolerancia a ácido acetilsalicílico.

Triflusal: es un ácido acetilsalicílico trifluorado que actúa inhibiendo la ciclooxigenasa plaquetaria con eficacia similar a la del ácido acetilsalicílico, del que es un derivado.

Anticoagulantes

No se recomienda la anticoagulación oral en la prevención secundaria de los pacientes con infarto cerebral de origen aterotrombótico, ya que no aporta ventajas sobre el tratamiento antiagregante con ácido acetilsalicílico y aumenta el riesgo hemorrágico, pero en pacientes con contraindicación o intolerancia a ácido acetilsalicílico u otros antiagregantes, se puede considerar la anticoagulación oral, como una alternativa adecuada (Diez Tejedor, 2006).

Endarterectomía carotídea

Según algunas guías de prevención, (Diez Tejedor, 2006) se considera la endarterectomía carotídea (intervención quirúrgica para extirpar la placa) indicada en pacientes con estenosis carotídea del 70% - 99% sintomática (ictus transitorios o establecidos en los seis meses anteriores). Con estenosis del 50%-69% se podría considerar la realización, pero teniendo en cuenta otras variables clínicas. La cirugía carotídea, mostró una reducción del riesgo del 16% (Rerkasem and Rothwell, 2011).

Angioplastia transluminal percutánea

Se puede considerar una alternativa a la endarterectomía carotídea en aquellos casos en los que se crea necesaria una intervención y/o no pueda realizarse la endarterectomía carotídea: pacientes de alto riesgo quirúrgico, rechazo de

intervención quirúrgica o elección del paciente, reestenosis postendarterectomía (Diez Tejedor, 2006).

Con la colocación de stent (endoprótesis vascular) entre los pacientes con estenosis carotídea sintomática, la tasa de recurrencia de accidente cerebrovascular o muerte fue reducida a un 8,0% en 4 años. En el caso de una endarterectomía al 6,4% (Brott *et al.*, 2010).

Isquemia cerebral de etiología cardioembólica

Si el ictus se debe a un evento cardioembólico en pacientes con fibrilación auricular, se ha demostrado en varios estudios que estos pacientes se benefician claramente de la anticoagulación oral. Los anticoagulantes orales que llevan varias décadas utilizándose son el acenocumarol y la warfarina (McBride, 1994) que reduce la aparición de ictus en pacientes con fibrilación auricular en un 64% (Sonderer and Katan Kahles, 2015). Varios estudios, demuestra una reducción relevante de riesgo de recurrencia de ictus también para nuevos anticoagulantes orales como dabigatrán, apixaban, rivaroxaban y endoxaban (Connolly *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2011).

2.1.4. Ictus, infarto de miocardio y efectos de la dieta sobre el tejido isquémico

Hay una necesidad urgente de un tratamiento neuroprotector para el ictus isquémico que sea eficaz, con baja toxicidad y que se pueda administrar fácil y rápidamente (Aronowski *et al.*, 2003), pues la única terapia eficaz en humanos es la recanalización de la arteria cerebral obstruida mediante trombólisis con activador del plasminógeno tisular recombinante (rtPA) o mediante trombectomía mecánica. Y aun consiguiendo la recanalización se produce un daño en el tejido cerebral, en el que se encuentra tanto necrosis celular como muerte celular retardada.

La recanalización tras isquemia (isquemia/reperfusión) se ha estudiado en intestino de animal experimental (Schoenberg *et al.*, 1985), donde se ha encontrado que el sistema hipoxantina-xantina oxidasa es una importante fuente (y probablemente la inicial) de radicales libres. Durante la reperfusión, entra gran

cantidad de oxígeno con la sangre, activando la xantina oxidasa y produciendo el anión superóxido (Sato *et al.*, 2011). En esta situación pueden ser de utilidad los polifenoles, componentes inevitables en la dieta humana que obtenemos de frutas, verduras, cereales, semillas, legumbres, especias, aceites y de todos los productos alimenticios a base de estos componentes básicos. En general se acepta que el consumo de polifenoles puede aportar una serie de beneficios a la salud, incluyendo la función cardiovascular y el cerebro (Kennedy, 2014).

El aumento de permeabilidad vascular que se produce en la isquemia/reperfusión del intestino es atenuado por un polifenol que se deriva del ácido cafeico en el intestino: el ácido clorogénico (Sato *et al.* 2011).

En otro estudio (E Ahn *et al.*, 2011), utilizando CGA a concentraciones similares al nuestro, vieron que el CGA aumenta el efecto neuroprotector frente a daño isquémico en el tejido de las proteínas ribosomales PEP-1-RPS3. En ensayos de intervención en humanos, en los que se administraba un polifenol no flavonoide, como es el resveratrol, en dosis agudas y/o crónica, se mostró un aumento del flujo sanguíneo cerebral en la corteza frontal (Kennedy *et al.*, 2010). Después de su suplementación dietética, los flavonoides y sus metabolitos, están presentes en el cerebro a bajas concentraciones (10-300 nM) pero suficientes para que ejerzan sus efectos farmacológicos sobre los receptores y sobre las vías de señalización (Spencer, 2010). Su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica parece estar dictada tanto por la lipofilia de la molécula individual como por sus interacciones con transportadores que expulsan moléculas fuera de la barrera hematoencefálica como es la glicoproteína-P (Williams and Spencer, 2012).

Los efectos de los polifenoles dentro del sistema nervioso central, se pueden atribuir principalmente a las interacciones con las rutas de transducción de señal, que tienen un efecto directo sobre la función cognitiva y un efecto indirecto a través de la atenuación de los procesos inflamatorios y la mejora de la función cerebrovascular (Kennedy, 2014). Al igual que con otros tejidos, la inflamación del tejido cerebral puede ser una reacción natural beneficiosa, a corto plazo, como defensa ante una lesión, (infección, accidente cerebrovascular). Sin embargo, de manera sostenida, la

inflamación puede contribuir al daño neuronal asociado con las enfermedades neurodegenerativas, así como al deterioro en la función cognitiva observada con el envejecimiento. La evidencia sugiere que diferentes flavonoides y sus metabolitos, pueden suprimir actividad neuroinflamatoria de la microglía mediante la inhibición de cada etapa del proceso inflamatorio de señalización en glía activada (Frank-Cannon *et al.*, 2009).

2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

2.2.1 Estrés oxidativo. Radicales libres. ROS NOS

El estrés oxidativo se ha definido como una alteración en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) y el sistema de defensa antioxidante establecido para contrarrestarlos (Sies, 1985)(Halliwell, 1994).

El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia, bien de un incremento en las especies prooxidantes, bien de un descenso de las antioxidantes.

Los radicales pueden existir como cationes radicales o aniones radicales. Debido a su configuración electrónica, los radicales libres son inestables y extremadamente reactivos, al extraer electrones o donarlos a las moléculas cercanas; por lo tanto presentan una vida media corta y una concentración en estado estacionario baja.

Actualmente además de radicales libres, se utilizan los términos especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS) haciendo referencia a las especies reactivas derivadas del oxígeno o nitrógeno respectivamente. Los términos ROS y RNS son términos globales que incluyen tanto especies reactivas radicales como no radicales (Halliwell, 1996).

Las ROS, están representados por moléculas de radicales libres y no libres radicales oxigenados tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete (1O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Pisoschi and Pop, 2005). Entre las

especies reactivas del nitrógeno se encuentran los radicales nitroxilo (NO^{\bullet} y NO_2^{\bullet}) y peroxinitrito (ONOO^{\bullet}). También se encuentran especies reactivas derivadas de hierro, cobre y azufre que contribuyen a la propagación y mantenimiento de las reacciones conducentes a la formación de los radicales libres (Halliwell *et al.*, 1992).

Las ROS y RNS son bien reconocidas por jugar un papel dual; como especies perjudiciales y beneficiosas. A bajas o moderadas concentraciones, las ROS se requieren para la regulación de muchos procesos celulares, incluyendo la señalización celular, la diferenciación, proliferación, el crecimiento, la apoptosis y la regulación del citoesqueleto. El efecto dañino de los radicales libres se produce cuando hay una sobreproducción de ROS / RNS o una deficiencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Shah *et al.*, 2014).

Cuando tiene lugar el exceso de producción de los pro-oxidantes, causa eventos perjudiciales en la célula tales como la peroxidación de lípidos, el daño oxidativo del DNA y daños en las proteínas.

Entre las especies reactivas más relevantes que se producen en los sistemas biológicos pueden destacarse, las siguientes:

Radical superóxido

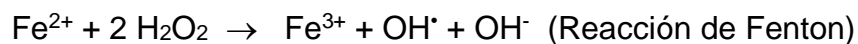
El radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ se forma cuando la molécula de oxígeno molecular adquiere un electrón adicional, dejando la molécula con un solo electrón desapareado (Miller *et al.*, 1990). Este proceso está mediado por enzimas pro-oxidantes tales como nicotina adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa, la xantina oxidasa, lipoxigenasas y algunas peroxidasas (Konigsberg-Fainstein, 2008). El sitio principal para la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ es en las mitocondrias, que son la maquinaria de las células para producir trifosfato de adenosina (ATP).

Peróxido de hidrogeno

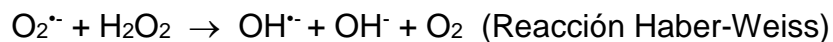
Cuando dos electrones reducen la molécula de oxígeno se produce el ión peróxido (O_2^{2-}), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno.

Tanto el O_2^{2-} como el H_2O_2 son compuestos que interaccionan poco con los compuestos celulares. Sin embargo, ambos son tóxicos, en parte, porque generan oxígeno singlete (1O_2) y $\cdot OH$.

Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo de una metal de transición como el Fe (II) o el Cu (I) entonces se fragmenta y forma el $\cdot OH$ y el ion hidroxilo OH^- , a través de la reacción de Fenton. El OH^- se protona para formar agua, y el $\cdot OH$ interacciona con cualquier compuesto vecino.



La reacción del $O_2^{\cdot -}$ con el H_2O_2 catalizada con el hierro (Haber Weiss) equivale a la estimulación de la reacción de Fenton con el $O_2^{\cdot -}$, ya que este funciona para reducir el Fe (III) en Fe (II).



Esta reacción posiblemente no ocurre *in vivo*, pues hay otros compuestos reductores en la célula, como el glutatión, que están en mucho mayor concentración que el $O_2^{\cdot -}$ y que puede reducir el Fe (III).

El H_2O_2 es muy peligroso para las células porque generalmente no está ionizado y puede difundir a través de la membrana plasmática. En presencia de iones cloruro, H_2O_2 se convierte en ácido hipocloroso (HOCl). El HOCl puede reaccionar con el DNA, inducir interacciones proteína-DNA, producir productos de oxidación de pirimidina y añadir cloruro a las bases de DNA (Kulcharyk and Heinecke, 2001).

El H_2O_2 no es un radical libre y es más estable que $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ y otras ROS, por lo que persiste por más tiempo después de la reperusión, produciendo daño neuronal (Jae-Chul and Moo-Ho, 2014).

Radical hidroxilo

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es un radical altamente reactivo, responsable del daño oxidativo de la mayoría de las biomoléculas (Pisoschi and Pop, 2005). Los radicales hidroxilo se caracterizan por una corta vida útil y una alta reactividad, que implica abstracción de hidrógenos y adicción y transferencia de electrones (Kohen and Nyska, 2002). Estos radicales hidroxilo, altamente perjudiciales, se produce principalmente a partir de las reacciones de tipo Fenton, y Haber-Weiss. Igualmente pueden formarse por radiólisis del agua, o por radiaciones de la energía (rayos X, rayos γ) (Gutteridge, 1994). Algunos metales de transición, aceleran la producción de radicales hidroxilo.

Óxido nítrico

El óxido nítrico presenta electrones no apareados, y por lo tanto puede considerarse como un radical libre (Gutteridge, 1994). El óxido nítrico endógeno, es biosintetizado a partir de L-arginina, oxígeno y NADPH, por las enzimas que pertenecen a la clase óxido nítrico sintasa, o por reducción de nitrato inorgánico, es una de las pocas moléculas de señalización gaseosas involucradas en la vasodilatación y la neurotransmisión (Pisoschi and Pop, 2005). Sus reacciones con el anión radical superóxido, forma especies reactivas altamente tóxicas y oxidantes de moléculas biológicas, como el peroxinitrito. El peroxinitrito puede descomponerse para producir radicales hidroxilo, independientemente de la presencia de metales de transición (Gutteridge, 1994).

2.2.2 Fuentes de los radicales libres

Los ROS y RNS se producen de manera continua como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidativo o a través de otras fuentes, incluyendo el medio ambiente (ozono y dióxido de nitrógeno) y variados procesos biológicos y bioquímicos (Jacob *et al.*, 2013) (Figura 2).

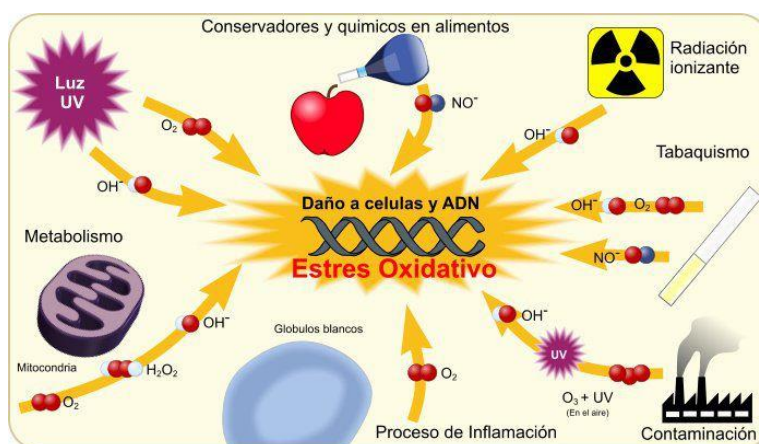


Figura 2. Distintas fuentes de radicales libres (Marzocchi, 2015)

Entre las diferentes fuentes a través de las cuales se pueden generar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se encuentran las fuentes exógenas y/o endógenas:

- Fuentes exógenas:

Como la radiación ionizante y ultravioleta son fuentes de radicales libres por transferir su energía a componentes celulares como el agua. Estas radiaciones causan la fisión heterolítica del agua para producir átomos de hidrógeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo y, en presencia de oxígeno, radical superóxido y peróxido de hidrógeno. Además distintos compuestos entre los que se encuentran pesticidas, contaminantes atmosféricos, el humo del tabaco, anestésicos, antimicrobianos, fármacos anticancerígenos y otros medicamentos, cuando son metabolizados en el organismo, dan lugar a radicales libres. Realmente, muchos de estos xenobióticos ejercen su efecto tóxico mediante su activación metabólica a productos intermediarios que son radicales libres (Gil, 2010) .

- Fuentes endógenas:

La cadena de transporte de electrones mitocondrial. La mayor contribuyente a la generación de ROS celulares es la mitocondria (Figura 3). La mayoría de ROS celulares son formas parcialmente reducidas de oxígeno molecular y sus derivados y

son originadas de la reacción de reducción de un electrón dando el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esta reacción de reducción incompleta se produce como resultado de las fugas de electrones durante la respiración normal en la cadena de transporte electrónico mitocondrial o por reducción enzimática del oxígeno molecular (Staniek and Nohl, 1999).

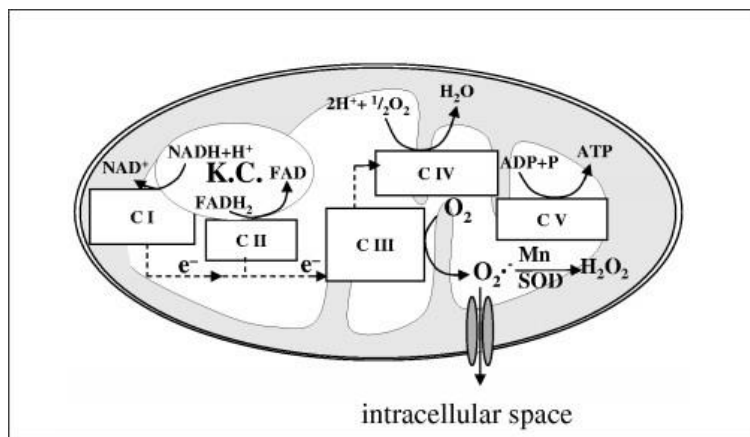


Figura 3. Generación de ROS en la mitocondria (Szocs, 2004).

Se ha estimado que aproximadamente el 1% del consumo de O_2 mitocondrial total se utiliza para producir superóxido (Handy and Loscalzo, 2012). La mitocondria cuenta con las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) que transforma al $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , y la glutatión peroxidasa (GPx), que a su vez convierte al H_2O_2 en H_2O . Si las concentraciones de las ROS son muy altas o las concentraciones de enzimas antioxidantes son insuficientes, el H_2O_2 podría convertirse en el radical $\cdot OH$ mediante la reacción de Fenton catalizada por los Fe o Cu presentes en las enzimas mitocondriales (Konigsberg-Fainstein, 2008). Otras fuentes son las **oxigenasas**, enzimas que insertan un átomo de oxígeno en el sustrato a oxidar, generando una molécula de agua. Una de las monoxigenasas más importantes, contiene un grupo hemo como grupo prostético la **citocromo P₄₅₀** componente de la cadena de transporte electrónico del retículo endoplasmático. Esta tiene dos funciones principales, por un lado se encarga del metabolismo de los xenobióticos y por otro de la biosíntesis de moléculas de señalización, donde se incluyen las ROS (Konigsberg-Fainstein, 2008).

Otras enzimas cuya función principal es la de producir radicales libres y otras especies reactivas son las **NADPH oxidasas** (NOX) (Figura 4). Son una de las principales fuentes intracelulares, y catalizan la producción de superóxido a partir de O_2 y NADPH (Sullivan and Chandel, 2014). Se activan cuando hay una amenaza por agentes patógenos, produciendo ROS y matando a los agresores (Babior, 1999). Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos) utilizan este sistema de la NADPH oxidasa, generando directamente radical superóxido (Conner and Grisham, 1996), llegando a ser de hasta veinte a treinta veces superior al que existe previo a la activación.

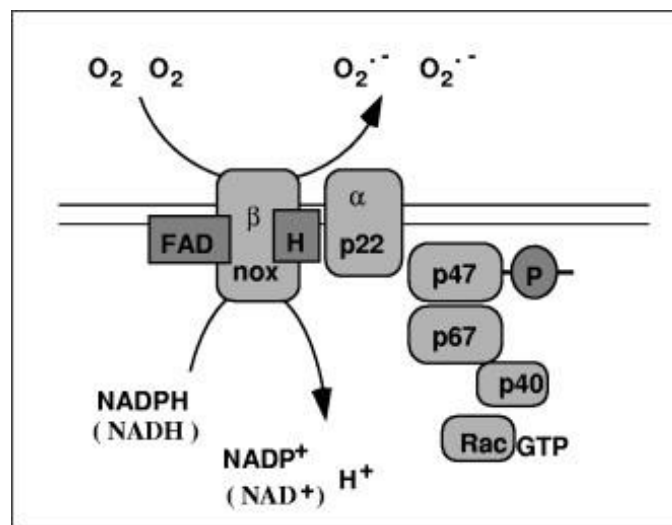


Figura 4. Estructura de la NAD(P)H oxidasa (Szocs, 2004).

Por último, otras enzimas a destacar es el **sistema hipoxantina/xantina oxidasa**. Participan en el catabolismo de los compuestos nitrogenados, particularmente en la degradación de las purinas (adenina y guanina), catalizando la oxidación de la hipoxantina en xantina y de la xantina en ácido úrico, que *in vivo* posee tanto actividad antioxidante (principalmente en el plasma) como pro-oxidante (principalmente dentro de la célula) (Glantzounis *et al.*, 2005).

Pueden encontrarse como dos formas interconvertibles, como xantina deshidrogenasa (XDH) y como xantina oxidasa (XO) (Corte and Stirpe, 1972). La

diferencia entre ellas es que la XDH prefiere NAD^+ como aceptor de electrones y la XO transfiere los electrones directamente al oxígeno molecular con la consiguiente producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y peróxido de hidrógeno (Battelli and Polito, 2014). La tasa de producción de ROS depende de la tensión de O_2 , pH y concentración de las purina. La formación de peróxido de hidrógeno se ve favorecida cuando los niveles de O_2 y pH son reducidos como ocurre en las condiciones de isquemia y/o hipoxia (Cantu-Medellin and Kelley, 2013).

Esta enzima juega por tanto, un papel muy importante en la isquemia/reperfusión producida en el cerebro tras un ictus, cuando se interrumpe la oxigenación del tejido (isquemia) y se reestablece después de un periodo (reperfusión) (Figura 5).

Se ha observado, que la actividad de la enzima XO, como productora de radicales libres, aumenta durante la reperfusión en los órganos isquémicos. Durante la isquemia, también hay una ruptura masiva de la reserva de nucleótidos de adenosina a inosina y después a hipoxantina. Así, después de un periodo de isquemia, hay una acumulación de XO y de su sustrato, la purina hipoxantina. Después de la reperfusión, el oxígeno molecular reingresa a los tejidos y se produce un estallido en la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Konigsberg-Fainstein, 2008).

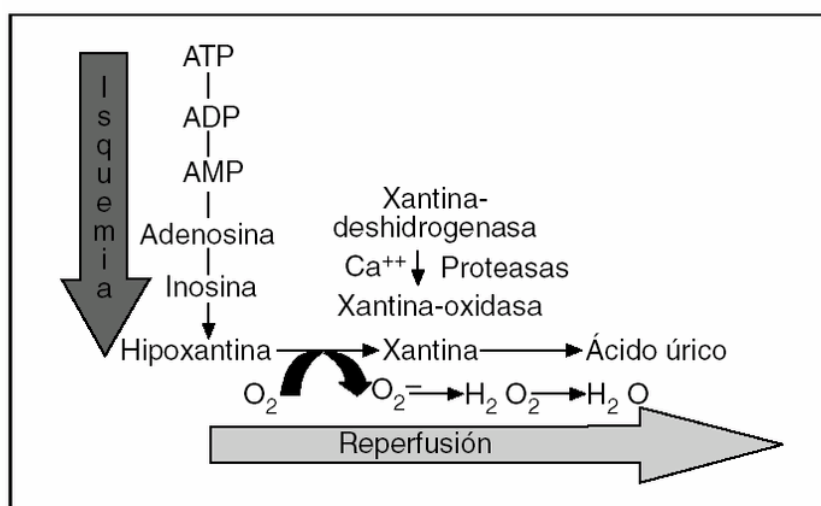


Figura 5. Catabolismo del ATP durante la fase de isquemia y producción de especies reactivas de oxígeno por el sistema xantina-oxidasa en la fase de la reperfusión (Grande *et al.*, 2006).

Enzimas como la **óxido nítrico sintasa**, que en las células produce óxido nítrico. La combinación del superóxido con el óxido nítrico da lugar a la formación del ONOO⁻ capaz de inducir la peroxidación lipídica en las lipoproteínas y destruir así las membranas celulares (Nathan and Xie, 1994).

2.2.3 Efecto nocivo de los radicales libres

Los radicales libres son capaces de interaccionar con casi cualquiera de las biomoléculas que constituyen las células. Varios de ellos, como el superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo ([•]OH), el óxido nítrico (NO[•]) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) son reconocidos como iniciadores de la peroxidación lipídica y causantes de la oxidación de proteínas y el daño del DNA en las células (Jae-Chul and Moo-Ho, 2014).

2.2.3.1 Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas son, después del agua, el componente más abundante de cualquier sistema biológico, ya sean células aisladas o tejidos. El daño a proteínas por estrés oxidativo puede afectar tanto a las cadenas laterales de los aminoácidos que la integran, como a la columna vertebral de la proteína. Un importante mecanismo de daño a las proteínas es la carbonilación. La carbonilación es una modificación post translacional irreversible, que a menudo conduce a la pérdida de la función de la proteína y puede ser un componente de múltiples enfermedades (Stadtman, 2001).

Los grupos carbonilo de las proteínas se pueden generar directamente (por la oxidación de aminoácidos y la vía α-amidación) o indirectamente pueden ser introducidos en las proteínas por reacciones con aldehídos (malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la peroxidación lipídica (Madian and Regnier, 2010). Asimismo, se puede incorporar un grupo carbonilo a una proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus productos de oxidación.

Por tanto la presencia de grupos carbonilo en las proteínas se ha empleado como un marcador de oxidación de proteínas mediada por ROS, que con los métodos de cuantificación de los grupos carbonilo en las proteínas, se ha permitido asociar la oxidación de las proteínas al estrés oxidativo y a determinadas enfermedades (Konigsberg-Fainstein, 2008).

2.2.3.2 Daño oxidativo al DNA

Tanto las ROS como las RNS, así como otros agentes endógenos y exógenos, pueden modificar el DNA. El daño al DNA tiene consecuencias biológicas serias como mutaciones y transformaciones carcinogénicas, e incluso la muerte celular. A pesar de que el DNA es un blanco biológico importante para las ROS, el $O_2^{\cdot-}$ es relativamente poco reactivo con el DNA. Sin embargo, la mayor parte de los radicales $O_2^{\cdot-}$ sufren un proceso de dismutación dentro de las células, y este proceso genera H_2O_2 que por sí misma presenta una actividad de oxidación muy baja hacia la mayor parte de las biomoléculas. En presencia de metales de transición reducidos, como el Fe^{2+} o el Cu^+ , el H_2O_2 es convertido, mediante la reacción de Fenton en el radical $\cdot OH$ que tiene un poder altamente oxidante y es muy reactivo, por lo que tiene la capacidad no sólo de abstraer átomos de hidrogeno de la molécula de DNA, sino también de pegarse a las bases formando aductos, lo cual produce una gran diversidad de daños. Otras moléculas que puede propiciar daño en el DNA son el peroxinitrito ($ONOO^-$), un producto de la reacción del óxido nítrico ($NO\cdot$) con el $O_2^{\cdot-}$ y el oxígeno singlete (1O_2) (Evans *et al.*, 2004; von Sonntag, 2006).

En cuanto al daño a las bases, la guanina es la base nitrogenada más susceptible de ser oxidada por diferentes componentes oxidantes como los radicales $\cdot OH$, 1O_2 y $ONOO^-$. Una de las principales vías de descomposición de los segmentos de guanina del DNA, comprende la adicción del $\cdot OH$ en el C8 de 2'-desoxiguanosina, produciendo un radical de aducto C8-OH que puede llevar a la formación de 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG), que se utiliza como uno de los biomarcadores de la oxidación del DNA (Konigsberg-Fainstein, 2008; Carochó and Ferreira, 2013).

Asimismo, la exposición del DNA al estrés oxidativo puede dar lugar a la rotura de sus hebras, o generar sitios apúricos o apirimidínicos que han de ser reparados para que el proceso de replicación no quede bloqueado. En cualquier caso, las modificaciones químicas del DNA pueden provocar reacciones de entrecruzamiento entre bases y/o azúcares de la misma cadena de DNA o de la complementaria, dando lugar a diferentes aberraciones cromosómicas que causan citotoxicidad.

2.2.3.3 Peroxidación lipídica

La participación de radicales libres y otras ROS con los lípidos de las membranas biológicas ocasiona la producción de diversos compuestos tóxicos, altera su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las proteínas, las enzimas, los receptores o canales iónicos asociados a ellas, situación que compromete la estructura y función celular. Los ácidos grasos saturados o los monoinsaturados que forman parte de la membrana, son poco susceptibles al ataque de las ROS, mientras que los poliinsaturados linoleico, linolénico y araquidónico, son rápidamente atacados debido a la presencia de sus enlaces dobles conjugados, los cuales debilitan la energía de unión del átomo de hidrogeno presente en el carbono adyacente a los enlaces.

La peroxidación de los lípidos de las membranas puede ocurrir tanto por vía enzimática como no enzimática. Durante la peroxidación no enzimática las ROS inician el daño oxidativo en los lípidos de la membrana y los radicales libres de los lípidos resultantes propagan el proceso de peroxidación, permitiendo la acumulación de hidroperóxidos que finalmente se descomponen en una gran variedad de productos terminales. Los principales son el malondialdehído (MDA), el hexanal y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Durante la peroxidación enzimática los ácidos grasos oxidados son liberados de los fosfolípidos de la membrana, catalizados por la fosfolipasa A2 en respuesta a una gran variedad de estímulos, entre otros la participación de agentes proinflamatorios y la isquemia (Companioni-Gásquez, 1995).

La peroxidación lipídica transcurre en 3 etapas (Konigsberg-Fainstein, 2008) (Figura 6):

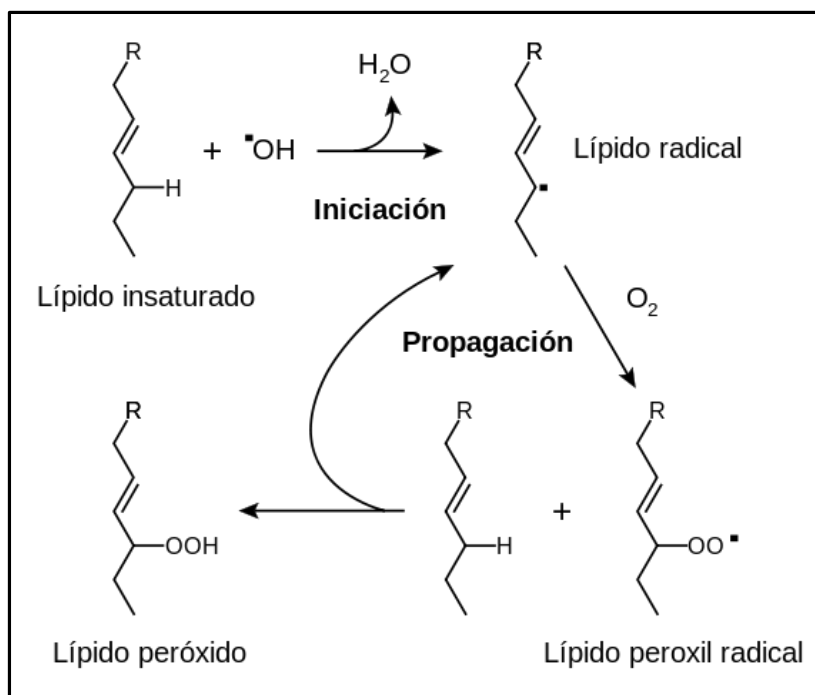


Figura 6. Mecanismo de la peroxidación lipídica

Iniciación. Se desencadena cuando una ROS que es capaz de retirar un átomo de hidrógeno entero (electrón y protón) de un metileno ($-\text{CH}_2-$), de un ácido graso quedando el residuo como radical libre en el carbono. Este carbono es generalmente estabilizado mediante una reorganización molecular que da lugar a un dieno conjugado que reacciona con el O_2 molecular y forma el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), molécula con el suficiente poder oxidante para atraer un hidrogeno metilénico del ácido graso adjunto para quedar como hidroperóxido, llamado lipopéroxido (ROOH).

Propagación. El radical formado reacciona con otros hidrógenos de cadenas laterales de ácido graso poliinsaturado adyacente, estableciéndose una reacción en cadena, y propagando la peroxidación lipídica a través de la membrana.

Terminación. La peroxidación lipídica puede finalizar cuando el radical lipídico reacciona con otra molécula, la cual puede ser un segundo radical lipídico, para formar un agregado o un dímero que queda dentro de la membrana y altera sus funciones,

principalmente la fluidez y la permeabilidad generando productos como el MDA y el 4-HNE.

2.3 ANTIOXIDANTES

2.3.1 Definición

Para equilibrar el efecto dañino de los radicales libres existe una gran diversidad de sustancias, de naturaleza enzimática y no enzimática, que constituyen los denominados sistemas de defensa antioxidante.

Halliwell y Gutteridge definieron antioxidante, como *“cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con el sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de ese sustrato”* (Halliwell and Gutteridge, 1989).

El antioxidante ideal debe ser absorbido fácilmente y debe prevenir o extinguir la formación de radicales libres, y quelar metales redox a niveles fisiológicamente relevantes (Rahman, 2007). La defensa del organismo frente al daño oxidativo tiene lugar por distintas vías según se desarrolla la reacción en la cadena de oxidación.

Como primera línea de defensa antioxidante se encuentran los antioxidantes preventivos que previenen la formación de nuevos radicales. Esta línea de defensa consiste en la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres a través del secuestro de iones metálicos, por reducción de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno y por captación de superóxido y oxígeno singlete.

A continuación, intervienen los antioxidantes secundarios, que inhiben la iniciación de la cadena de oxidación y previenen su propagación, como una segunda línea de defensa (incluyendo la terminación de la cadena de reacción por la reacción de dos radicales) (Willcox *et al.*, 2004). Los principales representantes son la vitamina liposoluble E y la hidrosoluble vitamina C, además de los compuestos polifenólicos.

Y finalmente, la tercera línea de defensa, está constituida por los mecanismos de reparación de *novo* de eliminación de lípidos, proteínas y DNA modificados por la oxidación (Willcox *et al.*, 2004). Entre ellos se encuentran enzimas, como las lipasas, proteasas y enzimas reparadoras del DNA.

Los antioxidantes se pueden clasificar en base a su fuente, en antioxidantes endógenos que son aquellos que pueden ser sintetizados *in vivo*, y antioxidantes exógenos, aquellos aportados a través de la dieta (Kasote *et al.*, 2015).

2.3.2 Antioxidantes Endógenos

Los compuestos antioxidantes endógenos en las células pueden ser clasificados como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, constituidos estos últimos principalmente por antioxidantes de bajo peso molecular (Kohen, 1999). Los principales antioxidantes endógenos enzimáticos son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD cataliza la dismutación del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para producir oxígeno y peróxido de hidrógeno. Esta reacción protege a las células de la toxicidad del superóxido (Carocho and Ferreira, 2013). Está presente en casi todas las células aeróbicas y en los fluidos extracelulares y se encuentra como una familia de metaloenzimas (Figura 7).

La SOD Cu/Zn, que tiene en su centro catalítico un átomo de cobre, esencial para la actividad catalítica de la enzima, y un átomo de cinc, que proporciona estabilidad y se ubica en el citoplasma, en los lisosomas y en los compartimentos nucleares de las células (Crapo *et al.*, 1992). La SOD Mn, está ubicada en la matriz mitocondrial y se caracteriza por tener un ión manganeso en su centro catalítico (MnSOD). La SOD EC se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular.

Estas enzimas se regulan en función de la sobreproducción del radical superóxido en los tejidos en los que se encuentran, principalmente en hígado, glándulas suprarrenales, riñón y bazo (Valko *et al.*, 2007).

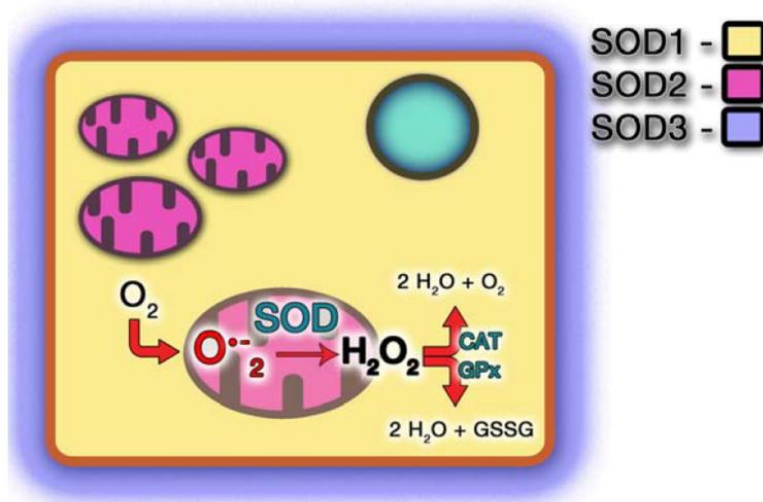
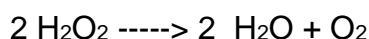


Figura 7. Función de las superóxido dismutasas. Esquema de una célula que muestra la localización y función de las 3 isoformas de superóxido dismutasa. SOD1 se localiza principalmente en el citosol de la célula (amarillo), mientras que SOD3 es secretada al espacio extracelular (azul). La isoforma SOD2 se localiza específicamente en la matriz mitocondrial interna en el sitio de la producción de superóxido a partir de la cadena de transporte mitocondrial (púrpura) (Flynn and Melov, 2013).

Catalasa

La catalasa es una hemoproteína que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

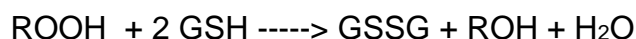
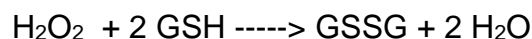


Esta enzima tiene constantes de velocidad relativamente elevadas, pero su afinidad es baja; de ahí que su papel resulte fundamental en condiciones de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Glutación peroxidasa

La enzima glutación peroxidasa (GPx) es una selenoproteína antioxidante. El selenio (Se) es un elemento traza esencial que participa en muchos procesos biológicos.

La GPx es una enzima que requiere de un tripéptido de bajo peso molecular, llamado glutación reducido (GSH), para reducir el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de hidroperóxidos orgánicos a agua. El GSH es el donador de equivalentes reductores en dicha reacción; de esta manera, la reducción del H₂O₂ a agua y la oxidación de glutación reducido (GSH) a glutación oxidado (GSSG) ocurren simultáneamente.



Además de las enzimas, existe otra línea de defensa antioxidante que funciona sin intervención enzimática secuestrando los radicales libres que escapan de las enzimas antioxidantes. Dentro de los antioxidantes endógenos no enzimáticos se encuentran diversas proteínas y moléculas de bajo peso molecular como el glutación, el ácido úrico, la taurina, bilirrubina, coenzima Q, etc. (Hayes *et al.*, 2005; Carochó and Ferreira, 2013).

Glutación (GSH)

El glutación (L - γ- glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) es un tripéptido de bajo peso molecular soluble en agua, presente en altas concentraciones en todas las células. Se sintetiza a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina.

Las funciones biológicas del GSH son varias: la detoxificación de xenobióticos o de sus metabolitos a través de proteínas tiólicas (glutarredoxina y tiorredoxina), el mantenimiento del equilibrio redox intracelular y estatus de los tioles proteínicos esenciales, almacenamiento de la cisteína y además tiene función antioxidante (Matill, 1947; Lobo *et al.*, 2010).

El glutatión se puede encontrar en dos formas, como glutatión reducido (GSH) o glutatión oxidado (GSSG). Principalmente se encuentra en las células en su forma reducida y gran parte de sus funciones se deben a la presencia del grupo tiólico reducido que le confiere la cisteína.

La función antioxidante es una de las principales del GSH, ya que es capaz de interaccionar con los radicales libres y estabilizar radicales como el hidroxilo, el superóxido y los peróxidos, bien reaccionando directamente con los radicales libres, o bien por medio de la glutatión peroxidasa para reducir los peróxidos formados (Sies, 1999; Flora, 2009).

Ácido úrico

Es producido en las células animales durante el catabolismo de las bases púricas. Este compuesto puede funcionar como un antioxidante puesto que, en las concentraciones que generalmente mantiene en el plasma, es capaz de interaccionar directamente con radicales libres de oxígeno como el $\cdot\text{OH}$. Además puede acomplejar metales de transición como el hierro y el cobre, y así preservar el ascorbato del plasma (Gil, 2010).

Taurina

Este β -aminoácido se encuentra en la mayoría de las células eucariotas y, extracelularmente, en distintos fluidos corporales. Forma parte de algunos ácidos biliares y tiene una función importante en las reacciones de conjugación para la eliminación de los distintos xenobióticos. Además puede reaccionar con algunas ROS convirtiéndolas en menos reactivas (Gil, 2010).

Bilirrubina

La bilirrubina exhibe una actividad citoprotectora eficaz (Sedlak and Snyder, 2004). Es lipofílica y previene la peroxidación de la membrana lipídica. A pesar de encontrarse en el tejido en cantidades muy pequeñas comparado con el glutatión, el antioxidante tetrapirrólico puede actuar de manera eficiente, debido al ciclo de biosíntesis que permite su regeneración a partir de la biliverdina. Después de su

oxidación a biliverdina, puede ser rápidamente reducida por la biliverdina reductasa, de vuelta a la bilirrubina.

La bilirrubina demostró ser un eliminador activo hacia los radicales peroxilo y también confirmó su capacidad para reducir la influencia mutagénica de las especies oxidativas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas heterocíclicas (Pisoschi and Pop, 2005).

Coenzima Q

La coenzima Q 10 (ubiquinona) es un potente antioxidante liposoluble presente en todas las células del cuerpo. Es sintetizado en el organismo a partir de tirosina, fenilalanina y acetil CoA. Se encuentra en todas las membranas celulares, principalmente en la de la mitocondria, donde participa en la cadena de respiración aeróbica. Además potencia la respuesta del sistema inmune (su capacidad de producir anticuerpos), y como antioxidante es capaz de proteger el DNA de la acción de radicales libres y también de impedir la peroxidación lipídica (Jacob and Sotoudeh, 2002).

Melatonina

La melatonina, es la principal neurohormona de la glándula pineal. Es un derivado de la serotonina, cuya producción y secreción máxima tienen lugar durante la noche, es decir, en la oscuridad, y cuya misión es entrar en todas las células del organismo para realizar en ellas su función más básica, que consiste en actuar como un potente neutralizador de ROS y RNS, como los radicales hidroxilo, el radical superóxido y el óxido nítrico (Arnao and Hernández-Ruiz, 2006). La melatonina además estimula la SOD, GPx y GR, por lo que es considerada actualmente como un importante antioxidante (Melatonin Monograph., 2005).

2.3.3 Antioxidantes Exógenos.

La dieta juega un papel vital en la producción del sistema de defensa antioxidante, proporcionando nutrientes esenciales antioxidantes, tales como las vitaminas E, C y

β -carotenos, y minerales esenciales que forman parte de las enzimas antioxidantes. Además aportan compuestos antioxidantes entre los que se incluyen los ácidos fenólicos y flavonoides (Baradaran *et al.*, 2014; Willcox *et al.*, 2004).

Vitamina C (Ácido ascórbico)

Es una molécula que se encuentra en la mayor parte de los sistemas biológicos en concentraciones elevadas en muchos tejidos y plasma. En el plasma es uno de los principales antioxidantes hidrosolubles. El papel antioxidante radica en su capacidad para reaccionar directamente con el radical superóxido, el radical hidroxilo y diversos hidroperóxidos lipídicos. Cuando el ascorbato, forma predominante a pH fisiológico, reduce estos radicales libres, se convierte en dehidroascórbico a través de la formación de un intermediario radical libre, el semidehidroascorbato.

El ácido ascórbico se puede regenerar a partir del deshidroascorbato por la deshidroascorbato reductasa que utiliza GSH oxidándolo a GSSG, o bien, a partir de semideshidroascorbato por la NADH-semideshidroascorbato reductasa que oxida el NADH a NAD⁺.

Otra función importante de la vitamina C, es la de restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E. En determinadas condiciones el ascorbato puede funcionar como pro-oxidante, a altas concentraciones y en presencia de metales de transición, este antioxidante puede inducir la generación de radicales libres de oxígeno por su capacidad para reducir los iones metálicos que están implicados en las reacciones de formación de radicales hidroxilo (Gil, 2010).

Vitamina E

Es una vitamina liposoluble existente como una familia de tocoferoles y tocotrienoles. En los seres humanos, el α -tocoferol es la forma más activa, y es de los más potentes antioxidantes a nivel de membrana (Hensley *et al.*, 2004). Puede interactuar con diferentes especies reactivas como el oxígeno singlete, el superóxido, radical hidroxilo y radical peroxilo.

Una de las funciones más importantes de la vitamina E es proteger contra la peroxidación lipídica de las membranas celulares y puede detener la cadena radical mediante la formación de un derivado de baja reactividad incapaz de atacar sustratos lipídicos (Descamps-Latscha *et al.*, 2001). Por lo tanto, la vitamina E cumple su papel en la preservación de la membrana contra el daño de los radicales libres promovido por las lipoproteínas de baja densidad (Pisoschi and Pop, 2005).

También existe evidencia que sugiera que α -tocoferol y ácido ascórbico funcionan juntos en un proceso cíclico. Durante la reacción antioxidante, el α -tocoferol se convierte en un radical α -tocoferol por la donación de un hidrógeno lábil a un lípido o un lípido radical peroxilo, y el radical α -tocoferol se puede reducir a la forma original, α -tocoferol, por el ácido ascórbico (Kojo, 2004).

Carotenoides

Son un grupo de pigmentos naturales que se encuentran como polienos conjugados que aportan actividad antioxidante. Entre los grupos principales se encuentran los carotenos como el β -caroteno, el licopeno y las xantofilas.

Los carotenoides presentan una elevada actividad antioxidante debido a su número elevado de dobles enlaces conjugados. Además de secuestrar oxígenos singlete, es capaz de reaccionar con los radicales peroxilo que se generan durante la peroxidación lipídica, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas (Young and Lowe, 2001).

Compuestos fenólicos

Constituyen uno de los diferentes grupos de biomoléculas presentes en frutas, verduras, granos enteros y otros tipos de alimentos y bebidas como el té, el café, el chocolate y el vino (Tsao, 2010; Carocho and Ferreira, 2013). Son sustancias químicas que poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos (OH) unido a él, incluyendo derivados funcionales ésteres, metil ésteres y glucósidos, entre otros. Son miles los metabolitos fenólicos secundarios identificados y estos varían desde moléculas simples (como los ácidos fenólicos), hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. La forma más común de encontrarlos en las frutas y

vegetales es como glucósidos, en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un anillo aromático (Konigsberg-Fainstein, 2008).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en función de su esqueleto carbonado en clases o familias, siendo las más importantes los ácidos fenólicos, estilbenos, los flavonoides y lignanos dependiendo del número de anillos fenólicos que constituyen la molécula y de los sustituyentes a estos anillos.

Ácidos fenólicos: Poseen en su estructura un solo anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Pueden dividirse en dos clases principales, en derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico basados en columnas vertebrales de C1-C6 y C3-C6 respectivamente (Tsao, 2010). Tienen un anillo aromático y una cadena lateral acida de tres carbonos. Por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra unido mediante un enlace éster con el ácido quínico, formando el ácido clorogénico y sus isómeros, entre ellos el ácido 3-cafeoilquinico (3-CQA).

Dentro de los derivados de los ácidos hidroxibenzoico los principales son el ácido gálico, siringico, protocatéquico y vanílico. Su contenido en plantas comestibles es bajo, aunque se encuentra en vino, cebollas, y algunos frutos rojos. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes y tienen como componentes principalmente a los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Los ácidos fenólicos suponen el 75% de la ingesta total de polifenoles en la dieta, principalmente consumidos a través de ácido clorogénico del café (Ovaskainen *et al.*, 2008).

Estilbenos: Tienen dos anillos aromáticos conectados por un doble enlace de carbono. Su estructura es C₆-C₂-C₆. Son sintetizados por las plantas como respuesta al ataque de microorganismos patógenos. Son poco abundantes en la dieta humana, y su principal representante es el resveratrol cuya fuente mayoritaria es la uva.

Flavonoides: Los flavonoides son un gran grupo de compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes, sobre todo en las

angiospermas, y sólo algunos se han detectado en hongos y algas. Se encuentran en las diferentes partes de la plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre, como agliconas-flavonoides, glucósidos, sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros (Pietta, 2000).

Los flavonoides son metabolitos secundarios sintetizados través de la vía de fenilpropanoides. Poseen 15 átomos de carbono y comparten un esqueleto común (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Figura 8). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. La actividad de los flavonoides como antioxidante depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química.

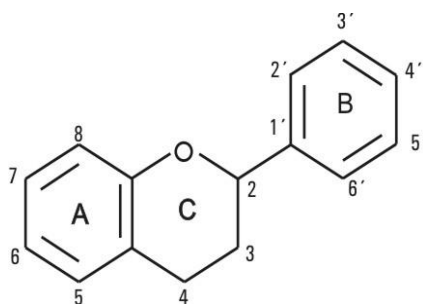


Figura 8. Estructura básica de los flavonoides

Las diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B (Rice-Evans *et al.*, 1996). Los flavonoides contribuyen a los tonos brillantes azul, púrpura y naranja, en hojas, flores y frutas (Rice-Evans *et al.*, 1996). Aparte de en frutas y verduras, los flavonoides se encuentran en semillas, frutos secos, cereales, especias, así como en bebidas, como el vino y el té.

En función del grado de oxidación de las cadenas de átomos de carbono, se pueden clasificar en flavonoles, flavan-3-ols, flavonas, flavanonas, isoflavonas,

calconas y antocianidinas, y se dividen en subclases dependiendo de los sustituyentes en el anillo B y por la sustitución en los diferentes hidroxilos de la molécula.

Lignanos: Los lignanos se forman de 2 unidades de fenilpropano. Los lignanos son metabolizados a enterodiol y enterolactona por la microflora intestinal (Manach *et al.*, 2004). Este término se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol.

2.3.4 Biodisponibilidad de los antioxidantes

La biodisponibilidad es la fracción de un nutriente ingerido que puede utilizarse en las funciones fisiológicas normales y/o para su almacenamiento (Van Lieshout *et al.*, 2001).

Hay factores que afectan la biodisponibilidad de los antioxidantes, en concreto para el caso de los compuestos flavonoides, su peso molecular, la glicosidación y la esterificación desempeñan papeles fundamentales (Scalbert *et al.*, 2002).

Carotenoides

Los carotenoides se ingieren con la dieta en forma libre, como ésteres o unidos a proteínas. Las proteasas intestinales liberan a los carotenos de su unión con las estructuras de los alimentos. Los carotenos, en especial el β -caroteno y el licopeno, se solubilizan junto con otros lípidos de la dieta en las micelas formadas con las sales biliares. Por su parte, los ésteres de xantofilas deben ser hidrolizados para poderse absorber (Konigsberg-Fainstein, 2008).

Los carotenoides se absorben de forma pasiva a través del borde en cepillo del epitelio intestinal a partir de las micelas mixtas junto con los lípidos de la dieta, los productos de hidrólisis de los lípidos, los esteroides y las sales biliares. Además la absorción puede ocurrir por transporte facilitado por la proteína transportadora SR-BI.

Una vez absorbidos a través del enterocito desde el lumen hasta la serosa donde son excretados en forma de quilomicrones en el conducto torácico que termina desembocando en los vasos sanguíneos (Pokorny *et al.*, 2005) y son transportados al hígado.

Vitamina C

En las especies que no pueden sintetizar la vitamina (primates, cobayas y otros), los dos vitámeros se absorben en forma eficaz en el intestino delgado, principalmente en el íleon. Se absorbe mejor el L-dehidroascórbico que el L-ascórbico.

Ambos pasan al interior del enterocito mediante un mecanismo de transporte activo, dependiente de sodio y de energía, saturable, por lo que su absorción es inversamente proporcional a la cantidad ingerida. Existe también una forma de transporte pasivo que opera si la cantidad que se ingiere de la vitamina es muy elevada. Una vez en el interior del enterocito, el ácido dehidroascórbico se reduce y se convierte en ácido ascórbico.

Vitamina E

Por su carácter liposoluble, los tocoferoles se ingieren junto con los triacil gliceroles de la dieta. No se conoce en la membrana del enterocito ningún vector específico para absorber tocoferoles, se absorben disueltos en los ácidos grasos que se liberan durante la digestión. Este proceso es inespecífico, se absorben en la misma proporción que oscila entre 15 y 45% de la cantidad ingerida, que disminuye conforme la cantidad que se ingiere es mayor.

Así, la absorción de los tocoferoles depende de la digestión adecuada de triacil gliceroles en la que participan la lipasa pancreática, los fosfolípidos, las sales biliares, los ácidos grasos y los monoacilgliceroles que forman las micelas durante la digestión (Konigsberg-Fainstein, 2008).

Compuesto fenólicos

Aunque son los más comunes en la dieta humana no son necesariamente los más activos dentro del cuerpo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca o

porque se absorben mal en el intestino, porque son rápidamente metabolizados, o eliminados (Manach *et al.*, 2004).

Una parte importante de los polifenoles que se ingieren (75-99%) no son encontrados en la orina. Esto implica que no han sido absorbidos a través de la mucosa intestinal, han sido absorbidos y excretados de nuevo con la bilis o metabolizados por la microflora del colon o de nuestros tejidos (Scalbert and Williamson, 2000).

Los polifenoles suelen estar presentes en los alimentos en forma de ésteres, glucósidos, o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa. Estas sustancias deben ser hidrolizadas por enzimas intestinales o por la microflora del colon antes de que puedan ser absorbidos.

Un ensayo experimental utilizando ratas tratadas quirúrgicamente, en el que la absorción se limitaba al estómago, mostró que la absorción a nivel gástrico es posible en algunos flavonoides, pero no para sus glucósidos (Crespy *et al.*, 2002). La mayoría probablemente resistan la hidrólisis ácida en el estómago y por lo tanto llegan intactos al duodeno (Gee *et al.*, 1998). Una vez alcanzan el intestino delgado solo las agliconas y algunos glucósidos pueden ser absorbidos.

La mayoría de polifenoles son demasiado hidrófilos para penetrar en la pared intestinal por difusión pasiva. El único mecanismo de transporte activo que se ha descrito hasta la fecha es un mecanismo de transporte saturable dependiente de sodio (Scalbert and Williamson, 2000).

Durante el curso de la absorción, los polifenoles se conjugan en el intestino delgado y más tarde en el hígado. Este proceso incluye principalmente la metilación, sulfatación y glucuronidación.

Por otra parte, los polifenoles que han alcanzado el intestino y que no han sido absorbidos, o aquellos que han sido metabolizados en el hígado y excretados a la bilis, alcanzan el intestino grueso, donde son metabolizados por las bacterias de la

microbiota intestinal (Del Rio *et al.*, 2010) ejerciendo también su efecto protector a nivel del duodeno. Cuando la flora está implicada, la eficiencia de la absorción a menudo se reduce, debido a que la flora también degrada las agliconas que libera y produce diversos ácidos aromáticos simples en el proceso y también a que el área de intercambio es menor que en intestino delgado. Los compuestos fenólicos y sus derivados se eliminan principalmente en la bilis y orina.

2.4 EFECTO DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS EN PREVENCIÓN DEL INFARTO CEREBRAL

2.4.1 Tipos de ácidos fenólicos. Ácido 3-cafeoilquínico.

Los **ácidos fenólicos**. Son abundantes en frutas y vegetales (Herrmann, 1989). Entre ellos se encuentra una importante familia de compuestos fenólicos vegetales, los ésteres formados entre el ácido hidroxicinámico y el ácido quínico, colectivamente conocidos como ácidos clorogénicos (CGAs) (Clifford 1999).

Los principales grupos de CGAs que se encuentran en las semillas de café, incluyen los ácidos cafeoilquínicos (CQAs), representados por tres isómeros principales (3, 4 y 5-CQA), los ácidos dicafeoilquínico (diCQAs), también con tres isómeros principales (di 3,4 -CQA, di 3,5-CQA y di 4,5-CQA) y los ácidos feruloilquínicos con dos isómeros principales (4 y 5-FQA) (Joët *et al.*, 2010). Los ácidos 3-O-, 4-O-, y 5-O-cafeoilquínico, constituyen el 10% del grano de café verde Robusta (*Coffea canephora*) (Del Rio *et al.*, 2013).

El ácido clorogénico se caracteriza por una rápida absorción, una distribución relativamente lenta y una fase de eliminación más lenta que la anterior (Ren *et al.*, 2007). Los metabolitos del ácido clorogénico formados por la microflora intestinal, aparecen tarde en el plasma y dependiendo de la dosis administrada la vida media de eliminación varía entre 3.85 h y 7 horas (Ren *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2013).

Los consumidores habituales de café pueden tener una ingesta diaria de 1 g de ácido clorogénico, esto supone para mucha gente la principal fuente dietética de compuestos fenólicos. Nosotros estudiamos uno de estos isómeros, el ácido 3-cafeoilquinico ($C_{16}H_{18}O_9$) (Figura 9), que se caracteriza por tener un peso molecular de 354,31 g/mol.

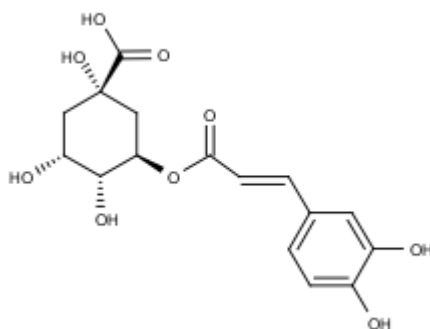


Figura 9. Estructura del ácido 3-cafeoilquinico (Extrasynthese, n.d.)

Estos compuestos tienen varias propiedades beneficiosas para la salud, en gran medida explicadas por su actividad antioxidante (Grace *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2011; Montagnana *et al.*, 2012; Ong *et al.*, 2013), ya que contiene una cierta cantidad del grupo R-OH en su estructura (figura 6), que puede unirse a los radicales hidroxilo y superóxido para proteger las células de la lesión oxidativa (Ozyürek *et al.*, 2008).

Es conocido que el ácido clorogénico posee multitud de propiedades beneficiosas para la salud, antioxidantes (EH Ahn *et al.*, 2011), anti-inflamatorias (EH Ahn *et al.*, 2011), anti-diabéticas (EH Ahn *et al.*, 2011), como agente anti-artrítico (Chauhan *et al.*, 2012), como antibacteriano (Ozçelik *et al.*, 2011), supresor del asma alérgico inducido por ovoalbúmina en ratones (Kim *et al.*, 2010), inhibe compuestos responsables del shock anafiláctico en ratones (Qin *et al.*, 2010), tiene actividad contra la artritis séptica causada por *Candida albicans* (Lee *et al.*, 2008), y como neuroprotector (Mikami and Yamazawa, 2015)

2.4.2 Efecto preventivo sobre la isquemia

Ha habido un creciente interés en la investigación de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos debido a sus potenciales beneficios para la salud en la prevención de enfermedades crónicas, entre ellos el ácido clorogénico.

El ácido clorogénico puede jugar un papel en la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y por extensión a las cerebrovasculares, ya que influye en algunos de sus factores de riesgo, tales como la hipertensión (Iwaoka *et al.*, 2007; Negishi *et al.*, 2007), hiperlipidemia (Chen *et al.*, 1995; Jurikova *et al.*, 2012), hipercolesterolemia (Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011) y en la insuficiencia cardíaca. Los estudios al respecto (espino, ciruelas, café, etc.) (Chang *et al.*, 2005), atribuyen a los compuestos fenólicos, entre los que se encuentra el ácido clorogénico (Jurikova *et al.*, 2012) efectos beneficiosos, como son evitar el daño isquemia/reperfusión, e inducir los efectos antiarrítmico, hipolipemiantes e hipotensores.

Los hallazgos sugieren que los alimentos ricos en ácido clorogénico pueden contribuir a la prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares y sus factores de riesgo (Negishi *et al.*, 2007).

2.5 METODOLOGÍA APLICADA PARA LA EVALUACIÓN DEL INFARTO CEREBRAL

2.5.1 Evaluación del infarto cerebral en humanos

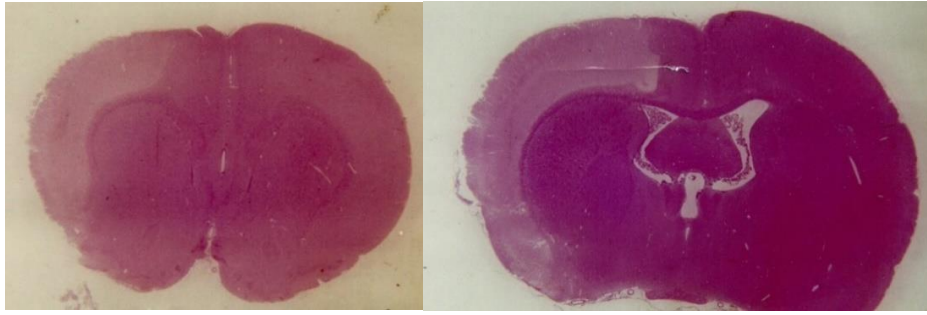
En humanos el infarto cerebral se evalúa indirectamente a través de sus consecuencias funcionales, para lo que se han desarrollado escalas específicas de exploración que evalúan diferentes funciones que se pierden parcial o completamente debido al infarto cerebral. La escala más utilizada es la NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale; Brott *et al.*, 1989) que valora el nivel de vigilancia, movilidad facial y de extremidades, sensibilidad, lenguaje y habla, visión y heminegligencia pudiendo

ser la puntuación de 0 (exploración normal) a 30. Para la evaluación del tejido cerebral *in vivo* se usan diferentes pruebas radiológicas que visualizan el tejido cerebral infartado o necrótico (tomografía axial computarizada, resonancia magnética), que pueden distinguir el área del tejido que ha sufrido una disminución de flujo sanguíneo pero puede recuperarse del área necrótica que no puede recuperarse (algunas técnicas de resonancia magnética). En la necropsia cerebral se puede estudiar directamente el tejido infartado para lo cual, y debido a la friabilidad del cerebro, es necesario fijarlo durante varias semanas (en formol al 4% u otro fijador), incluir las zonas a mirar al microscopio en bloques de parafina que luego se cortarán, teñirán y visualizarán.

2.5.2 Evaluación del infarto cerebral en el animal de experimentación

En el animal experimental también existen escalas funcionales para evaluar las repercusiones del infarto (Fenny *et al.*, 1982; Menzies *et al.*, 1992) pero no tienen la sensibilidad ni especificidad que las que se utilizan en humanos y su pequeño tamaño tampoco permite pruebas radiológicas por lo que se utiliza sobre todo la tinción “*post mortem*” del infarto cerebral y su medición. Las tinciones histológicas habituales como pueden ser la de la Hematoxilina-Eosina y otras, precisan que el tejido sea fijado en formol, posteriormente incluido en parafina y tras las secciones en el micrótopo se aplican las tinciones que permiten distinguir la estructura del tejido, sus células y las alteraciones de las mismas (Figura 10 (A) y 10 (B)).

En el caso del infarto cerebral de horas de evolución no hay tiempo para que se produzcan alteraciones estructurales ni celulares y el formol destruye las enzimas que pueden señalar el tejido isquémico por lo que este procedimiento estándar imposibilitaría el estudio. Por ello se ha recurrido a una tinción enzimática de las secciones sin fijar en una solución a 37°C de trifeniltetrazolio al 2% (Bederson *et al.*, 1986) durante 30 minutos. La tinción nos permitirá comprobar si se ha producido el infarto y en ese caso el procedimiento será considerado adecuado para el análisis.



Figuras 10 (A) y 10 (B). Secciones cerebrales coronales (imagen izquierda más anterior que la derecha, en la que se pueden ver los ventrículos laterales) teñidas con hematoxilina-eosina en las que el área de infarto tiene más de 24 horas de evolución y se distingue por la palidez de la corteza cerebral izquierda.

El TTC es una sal de tetrazolio que tiene la capacidad de ser reducido por la cadena respiratoria mitocondrial de forma que cambia de incoloro a rojo (Bederson *et al.*, 1986). La zona necrosada, al carecer de actividad mitocondrial, no podrá reducir el tetrazolio y no tendrá coloración alguna (Figura 11).



Figura 11. Tras un corte coronal el cerebro está sujeto entre los dedos pulgar e índice, lo que nos da idea de su tamaño. La mitad izquierda, sin tinción enzimática por TTC, tiene un área pálida que se corresponde con el área de infarto.

El modelo de infarto cerebral en animal de experimentación más utilizado es la oclusión de la arteria cerebral media en la rata, que tiene un sistema de irrigación cerebral bastante parecido al humano, incluidas las anastomosis entre las arterias carótidas y basilar en la base del cerebro que forma el polígono de Willis. Además el infarto cerebral más grave y frecuente en humanos se produce por oclusión de dicha arteria cerebral media.

2.6 METODOLOGÍA APLICADA PARA EVALUAR EL ESTRÉS OXIDATIVO

2.6.1 Conceptos y definiciones

Es sabido que la cooperación entre diferentes antioxidantes proporciona una mayor protección contra el ataque de las ROS, que cualquier compuesto por separado (Packer *et al.*, 1979). La medida de la capacidad antioxidante se considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en el plasma y los fluidos del cuerpo, proporcionando así un parámetro integrado, en lugar de la simple suma de los antioxidantes medibles (Ghisellia *et al.*, 2000). Por lo tanto, la capacidad antioxidante total (AC) puede dar más información biológica que la obtenida a partir de la medición de concentraciones de antioxidantes individuales.

Aunque capacidad antioxidante y actividad antioxidante, se suelen utilizar indistintamente, sus significados reales son muy diferentes. Por un lado, la capacidad antioxidante es la medida de los moles de un radical libre dado, capturado por una solución de antioxidantes, independientemente de la actividad antioxidante de los componentes individuales. Y por otro, la actividad antioxidante corresponde a la relación constante de un solo antioxidante frente a un radical libre.

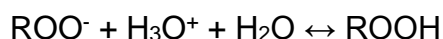
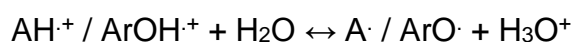
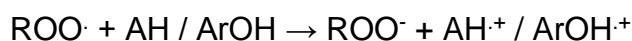
2.6.2 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras, se suele recurrir a ensayos químicos. Estos métodos miden la capacidad de una muestra de estabilizar

un radical libre, donde se incluyen los métodos que evalúan la llamada capacidad antioxidante total frente a radicales estables generados químicamente y los que miden la capacidad “scavenger” (capacidad para estabilizar o apagar) frente ROS y RNS.

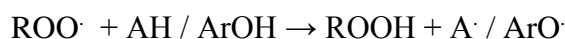
Estos ensayos que evalúan la capacidad antioxidante se pueden clasificar como (Huang *et al.*, 2005) (Figura 12):

- **SET** (Single electron transfer) que se basa en la capacidad de un antioxidante de transferir un electrón para reducir un compuesto, que cambia de color. Un ejemplo sería el ensayo FRAP. El mecanismo de acción antioxidante SET se basa en las reacciones:



Las reacciones son más lenta que las de los ensayos HAT, y son dependientes del solvente y el pH. Se miden los resultados por espectrofotometría, debido a que el grado de cambio de color, a una longitud de onda dada, es proporcional a la concentración de antioxidantes en la muestra (Apak *et al.*, 2007).

- **HAT** (hydrogen atom transfer) que se basa en la capacidad de un antioxidante de estabilizar los radicales libres (generalmente radicales peroxilo) mediante donación de átomos de hidrógeno, y un ejemplo de este tipo sería el ensayo ORAC. Los mecanismos de la reacción en la que el átomo de hidrogeno (H[·]) de un fenol (Ar-OH) se transfiere a un radical peroxilo (ROO[·]) se puede resumir:



Donde se forma el radical ariloxi (ArO[·]) estabilizado por resonancia (Apak *et al.*, 2007).

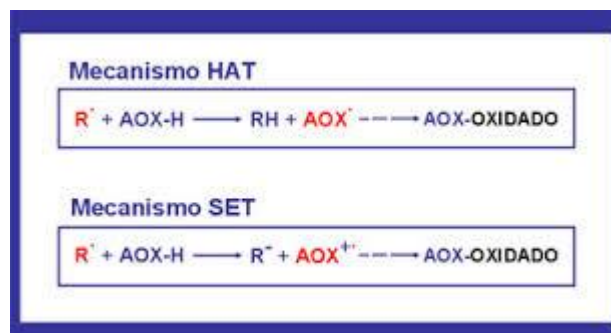


Figura 12. Tipos de mecanismos antioxidante

La captación de radicales es el principal mecanismo de acción de los antioxidantes en los alimentos. Se han desarrollado muchos métodos en los que se mide la capacidad antioxidante a través de la captación de radicales libres sintéticos en solventes orgánico polares, por ejemplo metanol, a temperatura ambiente. Los radicales usados son del tipo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico) (ABTS).

2.6.2.1 Método basado en la estabilización del ABTS^{•+}.

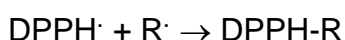
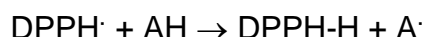
El ensayo del ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid)) fue descrito por Miller *et al.*, (1993). Se trata de una reacción SET, basada en la capacidad antioxidante del compuesto para reducir el radical ABTS^{•+}. El radical ABTS tiene una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm. En presencia del antioxidante, disminuye la absorbancia debido a la reducción del radical (decoloración) (Carocho y Ferreira, 2013).

Se trata de un método ampliamente utilizado al ser un método rápido y sencillo. Además el ABTS es soluble en solventes acuosos y orgánicos como etanol, diclorometano o acetona lo cual lo hace un método para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de los extractos o alimentos (Pulido *et al.*, 2003).

Desde que se describió el método, la forma de generar los radicales catiónicos ha cambiado, el más reciente consiste en el uso de persulfato potásico para oxidar el ABTS a su radical catiónico (Re *et al.*, 1999). La actividad de captación de radicales por el método del ABTS se expresa en la mayoría de los casos como valor TEAC (capacidad antioxidante equivalente trolox; trolox equivalent antioxidant capacity).

2.6.2.2 Método basado en la estabilización del DPPH•

Este método se basa en la reducción del radical estable DPPH• (2,2-difenilo-1-picril-hidrazilo) a través de la dismutación de la absorbancia, medida a 515 nm, que se produce por reducción de un antioxidante (AH) o por reacción con especies radicales (R•) (Brand-Williams *et al.*, 1995).



En la mayor parte de los casos el método se ha usado para medir la captación de radicales después de 15 o 30 minutos de iniciada la reacción. El mecanismo de reacción de este método es fundamentalmente ET, ya que la reacción de tipo HAT tendría poca contribución ya que se produce lentamente en disolventes como el metanol o el etanol. El dato se expresa normalmente como valor EC₅₀, esto es, la concentración de antioxidante necesaria para captar el 50% de los radicales DPPH en un periodo de tiempo determinado.

2.6.2.3 Método basado en la estabilización del DMPD•+

Es un método propuesto por Fogliano (Fogliano *et al.*, 1999) que mide la actividad antioxidante utilizando N, N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD). El catión radical N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD•⁺), que se forma tras la adición de cloruro férrico, da una solución de color estable medible por espectrofotometría a 506 nm de

absorbancia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o μ M) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/l o mg/100 g).

2.6.2.4 Actividad reductora del hierro férrico. Método FRAP

Este método fue desarrollado por Benzie (Benzie and Strain, 1996) para poder medir el poder reductor del plasma, aunque posteriormente ha sido adaptado para el análisis de la capacidad antioxidante de distintos tipos de muestra. Los cambios de absorbancia son lineales dentro de un amplio intervalo de concentración con mezclas de antioxidantes, incluyendo el plasma, y con soluciones que contienen un antioxidante en forma purificada.

El método, mide la capacidad de una muestra para reducir el complejo férrico con la molécula de 2,4,6-tripiridiltriazina (TPTZ - Fe (III)) a su forma ferrosa (Fe (II)) que conduce al desarrollo de un color azul intenso que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 593 nm. Los resultados son expresados en equivalentes de Fe (II).

2.6.2.5 Método basado en la estabilización del radical peroxilo. Método ORAC

El método ORAC (del inglés oxygen radical absorbance capacity) consiste en la medida de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (Cao *et al.*, 1993). Y evalúa la capacidad de un antioxidante para inhibir el radical peroxilo generado a partir de la molécula orgánica AAPH, mediante un mecanismo de acción HAT. El radical peroxilo reacciona con una sonda fluorescente dando un producto que puede ser cuantificado por fluorescencia. En presencia del antioxidante estabiliza el radical peroxilo y se mantendrá la fluorescencia. Por lo tanto, se lleva a cabo una comparación entre el descenso de fluorescencia producido en presencia y en ausencia de un compuesto o alimento con capacidad antioxidante. El método usa la medición del área

bajo la curva, combinando así el tiempo de inhibición y el grado de inhibición de la acción de los radicales libres por un antioxidante a una determinada concentración.

2.6.3 Determinación de Polifenoles Totales

El ensayo Folin-Ciocalteu (FC) se utiliza como una medida de los fenoles totales en productos naturales. El mecanismo básico es una reacción de oxidación / reducción. Singleton y Rossi (Singleton and Rossi, 1965) mejoraron con un nuevo reactivo el método original que era poco específico y lento a pH ácido. Con este, la reducción de fenoles era más específica; Las muestras se miden por espectrofotometría a una λ_{\max} de 765 nm. Los resultados se expresarán en $\mu\text{g/ml}^{-1}$ de equivalentes de ácido gálico.

2.6.4 Biomarcadores de estrés oxidativo

La medición directa del estrés oxidativo en los sistemas biológicos es extremadamente difícil, ya que los radicales libres son muy reactivos y tienen una vida media muy corta. Por lo que los principales avances se han hecho en el desarrollo de ensayos indirectos, que se basan generalmente en la medición de diferentes compuestos oxidados o anticuerpos (Vassalle *et al.*, 2015).

Un biomarcador ideal debe tener alta especificidad, y debe ser medido mediante un procedimiento rápido, fácil, barato y que no sea invasivo (De Zwart *et al.*, 1999).

2.6.4.1 Biomarcadores de la oxidación a proteínas

El biomarcador preferentemente usado para evaluar las alteraciones producidas en proteínas es la formación de grupos carbonilos (Halliwell, 1997). Los grupos carbonilo se introducen en la cadena aminoacídica en el transcurso de un proceso oxidativo, principalmente en los residuos de lisina, arginina, prolina e histidina.

Por otra parte pueden ser introducidos en las proteínas por reacciones con aldehídos producidos durante la lipoperoxidación. Estos derivados carbonilos pueden detectarse mediante métodos colorimétricos, espectrofotométricos, y con el empleo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). O la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Cuando la oxidación de proteínas es mediada por las RNS, ocurre la nitración de los residuos de tirosina que generan 3-nitritirosina como producto. Su determinación semicuantitativa en fluidos se logra aplicando la técnica de ELISA de competencia (Rimbach *et al.*, 1999).

2.6.4.2 Biomarcadores de oxidación a lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) tales como ácido linoleico y araquidónico son lípidos notablemente abundantes en la membrana neuronal y otros lugares, sin embargo, también son los objetivos principales de la oxidación atribuido a la presencia de uno o varios dobles enlaces insaturados; La oxidación de los PUFA desencadena un ciclo redox que va a generar una oxidación adicional de los PUFA (Shichiri, 2014). Sin embargo, si disminuye o se agotan las capacidades antioxidantes de la célula, la oxidación y el daño de los PUFA aumentarán sin cesar, iniciando la muerte celular.

Las ROS derivadas de las células cerebrales, junto con las condiciones estresantes pueden inducir la formación de productos de la LPO, cambiando la homeostasis redox. Una vez que el desequilibrio del estado redox se produce, a menudo referido como compensación al estrés oxidativo, varios mecanismos intentan mejorar el cambio permitiendo que la célula maneje el flujo de las ROS. En los trastornos neurodegenerativos, estos mecanismos compensatorios pueden conducir a una descompensación, dando como resultado la acumulación de los productos de la LPO que son característicos de varias enfermedades del sistema nervioso central (SNC), lo que provoca más transformaciones en la maquinaria antioxidante, degradación de proteínas, disfunción mitocondrial, o activación glial.

Hidroperóxidos y aldehídos son algunos de los productos resultantes de la LPO. Y entre ellos destacamos:

Acroleína

La acroleína es un α , β -aldehído insaturado, soluble en agua y altamente reactivo, formado a partir de la autoperoxidación de lípidos, que requiere de una escisión del enlace carbono-carbono, o puede ser encontrado como un subproducto natural (Shichiri, 2014).

4-HNE

4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) es un α , β -aldehído insaturado, difusible, citotóxico, y principal producto final de la peroxidación lipídica. El 4-HNE reacciona a través de la adición de Michael, formando enlaces covalentes a los aminoácidos cisteína, histidina y lisina, así como los ácidos nucleicos (Shichiri, 2014).

MDA

El malondialdehído (MDA) es un mutagénico α , β -aldehído insaturado, que se usa comúnmente como un biomarcador para LPO a través del ensayo de la sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ayala et al., 2014).

El ensayo mide la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico través de la formación de un producto coloreado medible por espectrofotometría.

2.6.4.3 Biomarcadores del daño al DNA

Los ROS pueden interaccionar con el DNA o RNA y producir su oxidación resultando diferentes modificaciones como ruptura de cadena simple o doble o la oxidación de las bases nitrogenadas o de la pentosa.

Como biomarcador del daño oxidativo a las bases nitrogenadas del DNA se utiliza la base modificada, 8-OH-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), que mide una de las lesiones más críticas del daño oxidativo al DNA y sus niveles *in vivo* están relacionados con los procesos patológicos. La continua reparación que sufre el DNA

elimina los nucleósidos oxidados que se excretan por vía urinaria. Entre diferentes métodos propuestos, el diseño de anticuerpos monoclonales específicos, acoplados a una técnica de ELISA, ha permitido la detección y cuantificación del 8-OHdG urinario (Rimbach *et al.*, 1999).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

1.- El ácido 3-cafeoilquínico puede disminuir el volumen del infarto cerebral antagonizando el daño por radicales libres en la fase aguda del infarto cerebral experimental.

2.- Es posible desarrollar un método para localizar el tejido infartado sin necesidad de teñirlo en un modelo de infarto cerebral experimental en la rata.

Objetivos

Determinar si el ácido 3-cafeoilquínico, a las dosis estudiadas en un modelo de infarto cerebral experimental y respecto a controles que no lo han recibido:

1.- Modifica el volumen de infarto cerebral experimental.

2.- Modifica la capacidad antioxidante del plasma.

3.- Modifica el contenido en polifenoles del plasma.

4.- Modifica el daño oxidativo a lípidos (MDA) y proteínas (grupos carbonilo) del plasma.

5.- Desarrollar un método para localizar el tejido infartado sin necesidad de teñirlo en un modelo de infarto cerebral experimental en la rata.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Reactivos: Ácido acético, L-ácido ascórbico, ácido clorhídrico (HCl), ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido gálico, ácido metafosfórico (MPA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), acetato de etilo, Acetato de sodio, azida de sodio, ABTS (2, 2'- azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), n-butanol, carbonato de sodio (CO₃Na₂), cloruro férrico (FeCl₃), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), 2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) 2-desoxirribosa, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH), dodecilsulfato sódico (SDS), etanol (C₂H₆O), fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄), fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), fosfato de nicotinamida adenindinucleótido (NADPH), guanidina, hidróxido de sodio (NaOH), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), nitroblue tetrazolium chloride (NBT), patrón GSH, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), persulfato potásico (K₂S₂O₈), reactivo de Folin-Ciocalteu, seroalbúmina bovina (BSA), sulfato de cobre (II) (CuSO₄), sulfato de hierro (II) (FeSO₄), TROLOX (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid), TPTZ (2,4,6-Tris-(2-pyridyl)-S-triazine), TMP (1,1,3,3-tetrametoxipropane), tartrato Na-K. Kits: Superóxido dismutasa K335-100 y Bioxytech® Catalasa-520™. Enzimas: Glutación reductasa, glutación-S-transferasa.

Los productos empleados en esta Tesis se obtuvieron de:

Atropina: B.Braun Medical S.A (Barcelona, Spain)

Ácido 3- cafeoilquínico (ácido clorogénico): Extrasynthese (Lyon, France)

Diazepam: Roche (Madrid, Spain).

Ketamina: Parke-Davis Grupo Pfizer (Madrid, Spain).

Cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio (TTC): Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA).

Equipos y aparatos:

- Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters compuesto por
 - Sistema de bombas de solventes e inyector automático modelo Alliance 2695

- Detector electroquímico Coulochem II ESA y detector ultravioleta Waters 2487
- Espectrofotómetros
 - ULTROSPEC 1100 (Pharmacia Biotech)
 - HITACHI modelo U-2000
 - UVICOM 922 con baño termostatzado (Kontron)
- Centrífugas:
 - Centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-HC
 - Centrífuga refrigerada modelo Kubota Corporation 2010
 - Centrífuga de mesa Biofuge, modelo 13 (HERAUS)
- Sistema Millipore de filtración bajo vacío, equipados con filtros para solventes y soluciones acuosas
- Baños termostatzados de temperatura regulable Precistern modelo S387 y Unitronic 100
- PH metro, modelo 2001 (CRISON)
- Balanzas y microbalanzas electrónica Sartorius
- Agitadores magnéticos con calefacción
- Agitadores manuales de tubos vórtex
- Agitador orbital, modelo G2FC (New Brunswick)
- Cámaras, frigoríficos y arcones de refrigeración (4°C), congelación (-20°C), y ultracongelación (-80°C) modelo Revco
- Material habitual de laboratorio
- Aparato de cirugía Martin Elektrotom MC-20 BI_CO_MATIC.

- Fresa dental Dril-Kaar
- Aparato de pulsioximetría SpaceLabs
- Microscopio de operación Wild Heerbrugg M650
- Planímetro X-PLAN 360d
- Poligrafo. Polygraph 4006/6006
- Material de cirugía

4.2 ANIMALES Y DIETA

Los protocolos experimentales utilizados en esta tesis fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación de Bienestar Animal, del Hospital Universitario de Burgos.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos con un peso comprendido entre 250-350 g, estabuladas en jaulas individuales en el animalario de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Burgos (animalario debidamente registrado, supervisado por la Junta de Castilla y León), con unos ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura constante de 19°C y a las que se alimentó con dieta estándar para ratas de experimentación y agua 'ad libitum' que se interrumpió 12 horas antes de la cirugía. Se establecieron 4 grupos de ratas. La asignación de los animales al grupo experimental o al grupo control se hizo de forma aleatoria, mediante la utilización de una tabla de números aleatorios.

- 1) Grupo 1. Grupo de ratas a las que se le administró 100 µg/ml de ácido clorogénico.
- 2) Grupo 2. Grupo de ratas a las que se les administró 25 µg/ml de ácido clorogénico.
- 3) Grupo 3. Grupo de ratas a las que se le administró 4 µg/ml de ácido clorogénico.

- 4) Grupo 4 (Control). Grupo de ratas a las que se les administró suero fisiológico (NaCl) al 0.9%.

El ácido clorogénico –a los tres primeros grupos- o el mismo volumen de suero fisiológico al 0,9% a los animales del grupo control, fue administrado mediante inyección intraperitoneal inmediatamente antes de la oclusión de la arteria cerebral media. Antes del procedimiento se anestesiaron a los animales para evitar producirles dolor. La anestesia consistió en una inyección intramuscular de 3 ml de una mezcla que contiene 15 mg de Ketamina, 6 mg de Diacepam y 0,3 mg de Atropina.

4.3 MODELO DE ICTUS ISQUÉMICO

Oclusión de la arteria media cerebral de rata (OACM/MCAO)

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media utilizado fue el descrito por Chen (Chen *et al.*, 1986).

Consiste en la oclusión de la arteria cerebral media, distal a la fisura rinal justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal, junto a la vena cerebral inferior (Chen *et al.*, 1986), tras la exposición de la arteria mediante una craneotomía bajo visión de microscopio quirúrgico.

Cateterización de las arterias femorales

Para la cateterización fue necesario depilar la zona de las arterias femorales con una maquinilla eléctrica, posteriormente se rasuró con una cuchilla. Por incisión de la piel se localizó la arteria femoral y se seleccionó con una pinza, posteriormente se le puso el catéter lo más profundo posible, para evitar que se saliese.

De una de las arterias femorales se extrajeron las muestras de sangre para el análisis de marcadores de estrés oxidativo a tiempo basal y en la otra arteria femoral se introdujo un catéter para medir la presión arterial sistólica durante la cirugía de

forma continua. Las muestras de sangre se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos con el fin de obtener el plasma, que se alicuotó y se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

Las ratas con una caída o aumento de la presión a tiempo basal de más de un 20% fueron descartadas.

La temperatura rectal se midió continuamente durante la cirugía y a las 24 horas previas al sacrificio. Durante todo el proceso se mantuvo al animal a 37°C con una manta térmica para evitar la hipotermia que produce la anestesia.

La presión arterial y temperatura se midió de forma continua por medio de sondas conectadas a un polígrafo. Asimismo, se midieron los gases arteriales oxígeno y glucosa.

Oclusión de la arteria cerebral media

El siguiente paso fue la localización de la arteria media cerebral izquierda a través de una craneotomía en la región temporal. Para ello, se afeitó la zona cercana al ojo izquierdo (Figura 13), la zona ventral del cuello y la zona de las dos carótidas y se aplicó yodo para desinfectarlo. Se dio un punto quirúrgico para cerrar el párpado del ojo izquierdo y evitar que se viese afectado.

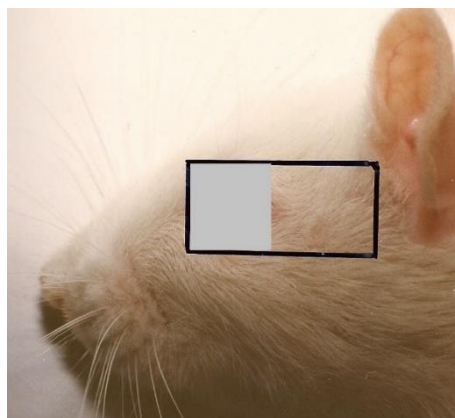


Figura 13. Campo quirúrgico entre el canto posterior del ojo y el conducto auditivo externo

Posteriormente se hizo una incisión de 1 cm en la piel del animal perpendicular a la línea ósea que conecta el canto lateral del ojo y el canal auditivo externo y se extrajo el músculo de la zona. Para evitar un aumento de la temperatura local ocasionado por la fricción de la fresa, se bañó la zona continuamente con suero salino. Cuando se ablandó suficientemente el hueso se retiró la capa fina con ayuda de unas pinzas. Para acceder a la arteria cerebral media hubo que retirar la *dura mater* que la protege externamente.

Una vez realizada la pequeña craniectomía sobre la región, se ligó con dos puntos de sutura de 10 ceros la arteria cerebral media, que se encuentra justo antes de la bifurcación de la rama frontal y parietal y se cortó entre los dos puntos (Figura 14).

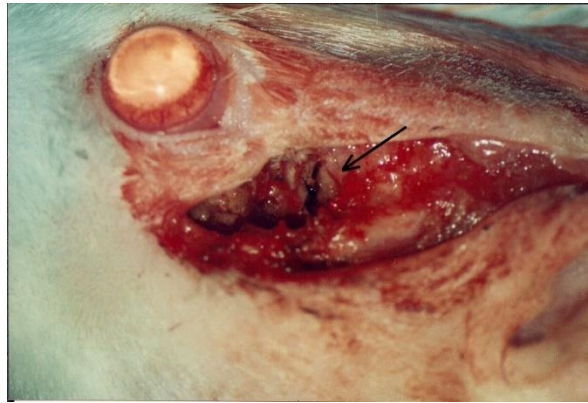


Figura 14. La flecha señala la arteria cerebral media coagulada, ligada con seda quirúrgica y posteriormente seccionada. Para acceder a ella se ha hecho una pequeña apertura en el cráneo y ha sido necesario retirar parte del músculo temporal (Cortesía de Trejo Gabriel y Galán 1996).

Sobre la superficie cerebral, ocluimos la arteria en su punto de cruce con la cintilla olfatoria (Figura 15), poco después de su salida del polígono de Willis (Figura 16 (A) y 16 (B)).

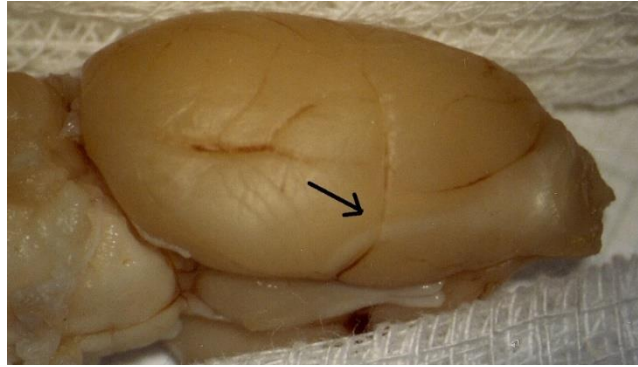


Figura 15. Dorsal del cerebro. La flecha señala la arteria cerebral media que discurre verticalmente en su cruce con la cintilla olfatoria (estructura blanca en sentido horizontal). (Cortesía de Trejo Gabriel y Galán 1996).

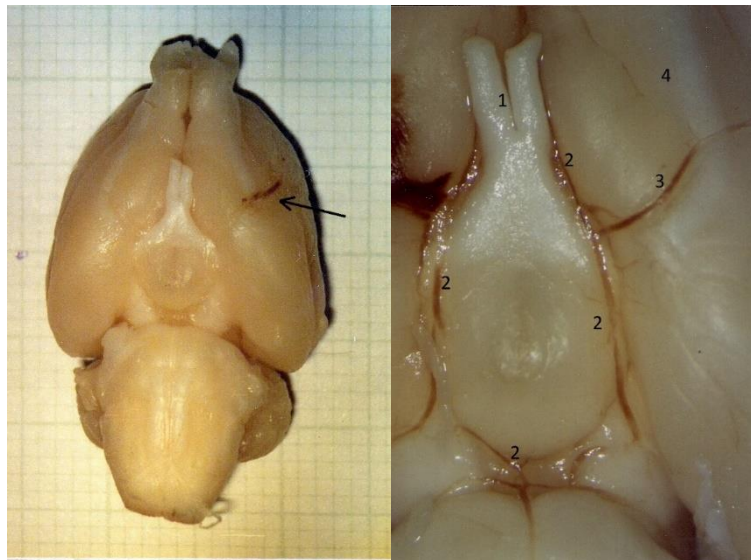


Figura 16. (A) Cerebro volteado, visto desde la base. La flecha señala la arteria cerebral media coagulada a su paso por la cintilla olfatoria. **(B)** Ampliación de la figura anterior en la que se han marcado los nervios ópticos (1), las arterias que conectadas entre sí forman el polígono de Willis (2) y de las que se origina la arteria cerebral media (3) que distalmente cruza la cintilla blanca olfatoria (4).

Ligadura de la arteria carótida común

Se ligaron las arterias carótidas comunes para mejorar la reproducibilidad del infarto. Las arterias carótidas se encuentran al lado de la tráquea y profundas, justo

detrás de los músculos del cuello. Para ello, se localizó la arteria carótida homolateral a la arteria cerebral media ocluida y se ligó permanentemente con un punto de sutura de 3/0, mientras que la carótida del lado contrario se ocluyó con la ayuda de un ocluidor-pinza ("clamp"). Al ser una oclusión temporal se revirtió a las 2.5 horas de la oclusión de la arteria cerebral media, retirando el clamp para dar lugar a la reperfusión cerebral por la carótida contralateral a la arteria cerebral media ocluida.

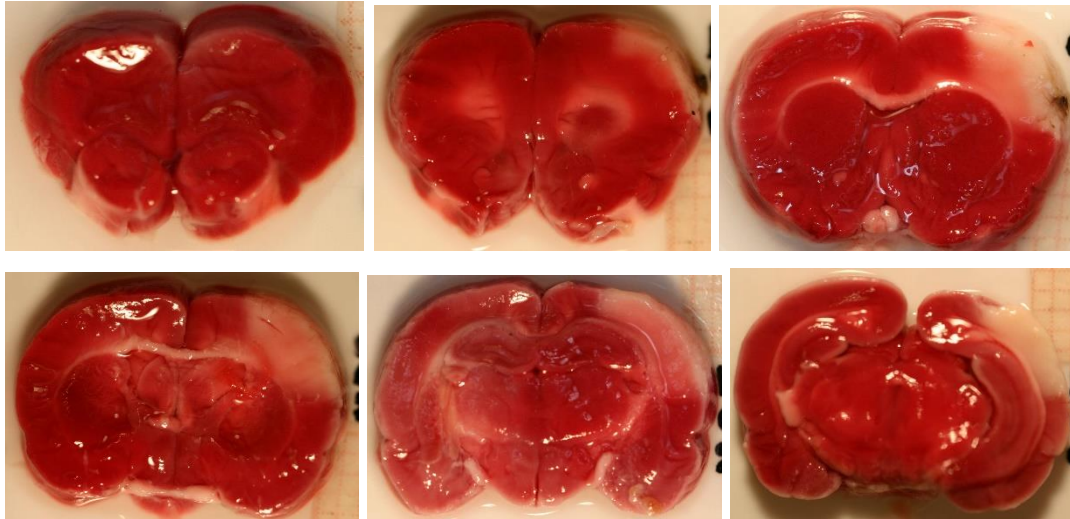
A las 24 horas de la oclusión de la arteria cerebral media se extrajeron nuevas muestras de sangre, que se procesaron como las basales, para medir los marcadores de estrés oxidativo.

4.4 MEDIDA DEL VOLUMEN DE ISQUEMIA CEREBRAL

Para el análisis del volumen de isquemia cerebral y después de 24h de la oclusión de la arteria cerebral media se anestesió a los animales con sevoflurano, hasta su muerte y se procedió a la decapitación.

Inmediatamente después, se eliminó el cráneo mediante una incisión longitudinal con la fresa y se extrajo el cerebro que se colocó en un molde con ranuras paralelas a la misma distancia. Después de descartar el cerebelo y el tronco cerebral, el cerebro mide 12 mm en sentido antero-posterior, por lo que se hicieron 6 bloques de 2 mm de grosor cada uno mediante cortes coronales paralelos (Figura 17).

Se recurrió a una tinción enzimática de las secciones, sin fijar, en una solución a 37°C de trifeniltetrazolio (TTC) al 2% (Bederson *et al.*, 1986) durante 30 minutos. La tinción nos permitió comprobar si se había producido infarto y en ese caso el procedimiento se consideró adecuado para el análisis. El TTC es una sal de tetrazolio que tiene la capacidad de ser reducido por la cadena respiratoria mitocondrial de forma que cambia de incoloro a rojo (Bederson *et al.*, 1986). La zona necrosada, al carecer de actividad mitocondrial, no podrá reducir el tetrazolio y no presentará coloración alguna.



Figuras 17. Secciones cerebrales coronales teñidas con TTC en las que el área de infarto se distingue por la palidez de la corteza.

Posteriormente, se fotografiaron las secciones con una cámara digital (Canon EOS 1 con objetivo para macrofotografía) y se procedió a la impresión en papel de las imágenes. Tras ser fotografiados, los cortes fueron transferidos a formol al 4% para su conservación.

En cada una de las 6 secciones de cerebro se midieron en mm^2 el área de la zona infartada y el área total de la sección mediante la utilización de un planímetro (Planímetro X-PLAN 360d). Se registró el promedio de cada tres mediciones para minimizar el error de medida. Las cifras de área se multiplicaron por 1mm, que es la profundidad de cada media sección, para después de sumarlas obtener el volumen de infarto y el volumen cerebral total en cada sección de cerebro en mm^3 .

Sumadas todas las secciones, se calculó el volumen total de infarto cerebral y el volumen cerebral total. Con estos dos datos se calculó el % de volumen de infarto respecto al volumen total del cerebro.

4.5 TRATAMIENTO CON EL ÁCIDO 3-CAFEOILQUÍNICO (3-CQA)

El ácido 3-cafeoilquinico se administró intraperitonealmente según el estudio 30 o 60 minutos antes de la oclusión de la arteria cerebral media, para asegurarnos que cuando comienza la isquemia, el compuesto está en su máximo pico de concentración en el tejido cerebral (Azuma *et al.*, 2000).

4.6 EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL, TEMPERATURA Y SATURACIÓN DE OXÍGENO

Presión arterial sistólica

En una de las femorales se insertó un microcatéter para transmitir la presión arterial en mm de Hg a un polígrafo durante la cirugía.

Temperatura

Para el análisis de la temperatura rectal de los animales de experimentación, se introdujo la sonda de temperatura conectada al polígrafo en el recto del animal que registró los valores en °C.

Porcentaje de saturación de oxígeno

La saturación de oxígeno se realizó sobre la arteria femoral. Para ello, se preparó la femoral, depilando bien la zona. Como el lector de saturación va montado sobre un dispositivo que pinza la pata, puede medir en la arteria la saturación de la hemoglobina por oxígeno de forma continua.

4.7 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Método ABTS

Esta técnica mide la capacidad antioxidante para estabilizar el catión radical ABTS^{•+} generado por la adición de persulfato potásico. El método utilizado fue el de Miller (Miller and Rice-Evans, 1997). 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 añadieron 10 μ l de muestra, se incubaron 4 minutos y se leyó la absorbancia a $\lambda= 735$ nm. Los resultados se expresan en μ M de trolox.

4.8 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

Se determinó la cantidad total de polifenoles siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (VL Singleton and Rossi, 1965) con ligeras modificaciones para las muestras de plasma, para evitar la interferencia de proteínas (Serafini *et al.*, 1998). Se mezclaron 10 μ l de ácido metafosfórico (MPA) con 50 μ l de plasma y se centrifugó a 2700 g durante 3 minutos. 5 μ l del sobrenadante se mezclaron con 95 μ l de agua, 500 μ l de Folin-Ciocalteu, 400 μ l 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 expresaron en μ g/ml de equivalentes de ácido gálico, el calibrado se realizó con la solución estándar de este mismo ácido.

4.9 DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

Los niveles de MDA se determinaron por HPLC siguiendo el método de Grotto (Grotto *et al.*, 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 μ l de muestra (plasma) se le añadieron 25 μ l de agua mili-Q y 25 μ l de NaOH 3M. Se incubó a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se añadió 125 μ l de H₃PO₄ al 6% y 125 μ l de TBA al 0,8% y se sometió a incubación de 90°C durante 45 minutos. Se enfrió la mezcla y se le añadieron 50 μ l de SDS al 10% y se realizó una extracción con 300 μ l de n-butanol. Posteriormente se centrifugó a 3000g durante 10 minutos y se inyectaron 20 μ l 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: $\lambda=532\text{nm}$; Volumen pinchado: 20 μl . La curva de calibrado se realiza con TMP (1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano).

4.10 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinaron siguiendo el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). 10 μl de plasma se completaron 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 añadieron 0,5 ml del reactivo Folin-ciocalteau (dilución 1:2), se agitó y se incubó durante 10 minutos. Se cuantificó midiendo la absorbancia de las muestras a 620 nm utilizando una recta de calibrado con BSA. La concentración de proteínas se expresó en μg seroalbúmina bovina/ml.

4.11 DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILO

El procedimiento utilizado fue desarrollado por Levine (Levine *et al.*, 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 cuantificó 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) 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 centrifugó 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 redisolvió 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 expresó como nmoles de grupos carbonilo/mg de proteína.

4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuando los datos seguían una distribución normal se utilizó como medida central la media aritmética y de dispersión la desviación estándar y si no era así se utilizó la mediana como medida central y el rango intercuartílico como medida de dispersión.

También dependiendo de la normalidad o no de la distribución se utilizaron unos u otros test estadísticos para el análisis: cuando la distribución era normal para comparar dos grupos de datos cuantitativos se utilizó el test “t” de Student y con más grupos el análisis de la varianza (ANOVA), mientras que si le faltaba la condición de normalidad a la distribución se recurrió a test no paramétricos. Se consideró en todos los casos significación estadística cuando el valor de $p < 0,05$. Se ha utilizado para el análisis la versión XVI.II del programa estadístico Statgraphics Centurion.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Publicación 1:

Coffee component 3-caffeoylquinic acid increases antioxidant capacity but not polyphenol content in experimental cerebral infarction

Neurochem Res (2012) 37:1085-1090

DOI 10.1007/s11064-012-0711-7

Silvia Ruiz-Crespo · José M. Trejo-Gabriel-Galán · Mónica Cavia-Saiz · Pilar Muñiz

Resumen

El papel de las especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno en procesos de isquemia cerebral es conocido. Asimismo, existen datos que apoyan que compuestos presentes en los alimentos o bebidas con actividad antioxidante como los compuestos fenólicos tienen un papel positivo en la prevención de los procesos de isquemia cerebral.

El 3-cafeoilquínico (3-CQA), isómero del ácido clorogénico, está presente en alimentos y bebidas como el café y se caracteriza por una elevada capacidad antioxidante que se mantiene *in vivo* después de su metabolización. Su ingesta como componente de los alimentos parece tener un cierto papel preventivo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, en la actualidad su efecto como compuesto aislado *in vivo* en patologías vasculares de alta incidencia como el infarto cerebral es desconocido.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento con 3-CQA mediante inyección intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley sobre el infarto cerebral inducido y sobre la capacidad antioxidante total en plasma.

El estudio se realizó en ratas Sprague-Dawley, un grupo control y 3 grupos tratados intraperitonealmente con diferentes dosis de 3-CQA (4, 25 y 100 μg). Durante el estudio se analizaron los cambios en la presión arterial, temperatura basal, y saturación de oxígeno en los diferentes grupos de estudio. Asimismo, se evaluó al final del estudio el tamaño de la zona cerebral infartada y en plasma se analizaron los niveles de polifenoles totales en plasma y capacidad antioxidante total evaluada por el método del ABTS.

No se observaron diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con el 3-CQA a las diferentes dosis en la presión arterial, temperatura corporal, saturación de oxígeno, ni hipotensión. El volumen del área infartada después de la administración con 3-CQA a diferentes dosis no se modificó significativamente con respecto al grupo de ratas que no recibió 3-CQA.

Se observó un incremento significativo en la capacidad antioxidante después del tratamiento con el 3-CQA en el grupo tratado con 100 μg . En cuanto al contenido de polifenoles en plasma, no hubo modificaciones en las ratas tratadas respecto a los controles.

Este estudio permite concluir que en el modelo utilizado como sistema de infarto cerebral, el tratamiento con 3-CQA resulta en un incremento de la capacidad antioxidante en plasma, dependiente de la concentración utilizada, pero no está asociado al incremento plasmático de polifenoles y no mejora significativamente el daño cerebral.

Coffee component 3-caffeoylquinic acid increases antioxidant capacity but not polyphenol content in experimental cerebral infarction

Abstract

Although coffee has antioxidant capacity, it is not known which of its bioactive compounds is responsible for it, the effect of one of its components has it been analyzed in experimental cerebral infarction. We studied the effect one of its compounds, 3-caffeoylquinic acid (3-CQA), at doses of 4, 25 and 100 μg on plasma antioxidant capacity and plasma polyphenol content, measuring the differences before and after inducing a cerebral infarction in an experimental rat model. We compared them with 3-caffeoylquinic-free controls. The increase in total antioxidant capacity was only higher than in controls in 3-CQA treated animals with the highest dose. This increase in antioxidant capacity was not due to an increase in polyphenols. No differences between the experimental and control group were found regarding polyphenol content and cerebral infarction volume. In conclusion, this increase in antioxidant capacity in the group that received the highest dose of 3-CQA was not able to reduce experimental cerebral infarction.

Introduction

In some epidemiological studies coffee consumption is associated with decreased risk of stroke [1,2]. This may be due to its known antioxidant capacity. It is not known which of the bioactive components of coffee is responsible for this antioxidant effect. As oxidative stress is a mechanism involved in tissue injury in cerebral ischemia, antioxidants have been assayed in animal models of cerebral ischemia with promising results, but with disappointing ones in human clinical trials [3-6]. There are no studies on the antioxidant capacity of coffee components in experimental cerebral infarction. We studied this effect of the coffee component 3-caffeoylquinic acid (3-CQA, isomer of chlorogenic acid) at doses of 4, 25, 100 μ g, and compared it with controls who did not receive it. We measured the baseline antioxidant capacity and polyphenol content of plasma and the changes after inducing a stroke and receiving 3-CQA in an experimental rat model. We also compared the volume of cerebral infarction of the experimental group with that of the controls. 3-CQA, having not only antioxidant but antiinflammatory and endothelial and blood-brain barrier protecting actions, mechanisms involved in the pathophysiology of cerebral infarction, is a good candidate to reduce it.

Material and methods

3-caffeoylquinic acid (3-CQA) used in this study, is a coffee component formed from the ester of caffeic acid and 3-hydroxyl group of quinic acid. As 5-caffeoylquinic, it belongs to the so-called group of phenolic acid isomers, chlorogenic acid (CGA). Due to the controversy over its gastrointestinal absorption, it was administered intraperitoneally in order to enter the circulation easier [7,8]. Because of its intermediate hydrophobicity [9], it can cross the blood-brain barrier to exert its effects in the brain [10]. All the animals followed the same diet and fasted 4 hours before surgery to avoid any interference of antioxidant content of food on plasma antioxidant capacity.

The plasma antioxidant capacity was measured by ABTS technique. The concentration of polyphenols was also measured as they are believed to be responsible for much of

the coffee antioxidant capacity. Finally, we measured the volume of cerebral infarction as a percentage of total brain volume.

Surgery protocol

We used a cerebral infarction model [11] consisting of a permanent occlusion of one middle cerebral artery which was performed on the left side of male Sprague-Dawley rats of between 3 and 6 months of age weighing between 250 and 350g. The study protocol was approved by the clinic research ethics committee of Hospital General Yagüe, Burgos (Spain). Prior to surgery the rats were housed at 19°C, with light-darkness cycles and free access to rat chow and water, and later were anesthetized with 6 mg of Diazepam, 15 mg of Ketamine and 0.3 mg of Atropine i.m. Thirty minutes before middle cerebral artery occlusion (MCAO) the femoral artery was cannulated for arterial pressure control and to extract blood samples. 3-CQA was injected intraperitoneally in this moment to be sure that after at the beginning of ischemia it would be at its peak concentration in cerebral tissue [7]. A single dose was used in order to diminish variability. In the experimental groups 1 ml of 0,9% saline was injected intraperitoneally containing chlorogenic acid at the following doses: 4 µg (5 rats), 25 µg (4 rats), and 100 µg (5 rats) while in the control group 1 ml of plain saline was injected. The doses of 3-CQA used (4, 25 and 100 µg), taking into account the weight of a rat (16 µg/kg; 100 µg/kg; 400 µg/kg) would correspond for an adult of 70 kg to that contained in a cup of 3, 18 or 73 ml of coffee respectively [12,13].

Following Chen model, the middle cerebral artery was ligated at two points by a 10-0 suture and cut in-between to assure permanent occlusion. Next, we ligated both common carotid arteries in the neck with a 5-0 suture [14], the homolateral permanently and the contralateral for 2.5 hours. Blood pressure, temperature (using a rectal probe) and oxygen saturation (using a non-invasive skin-attached probe) were measured before and immediately after MCAO. Temperature was maintained stable through a heating pad. Blood samples were drawn before surgery and 24 hours later.

Measurement of the volume of ischemic brain injury

After deep anesthesia, rats were sacrificed by decapitation, the brain was extracted, the olfactory bulbs, brainstem and cerebellum discarded, and the hemispheres laid in an “ad hoc” frame and cut in 2 mm thick slices that were immediately immersed in a 2% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 37°C, -an enzymatic staining technique used to delineate acute cerebral infarction-, [15] after which each slice was photographed (Figure 1) on both sides. The complete cerebral and the infarction areas were measured with a planimeter, and their volumes were calculated integrating the slice thickness. The infarction-overall cerebral volume ratio was calculated for each rat as a percentage.

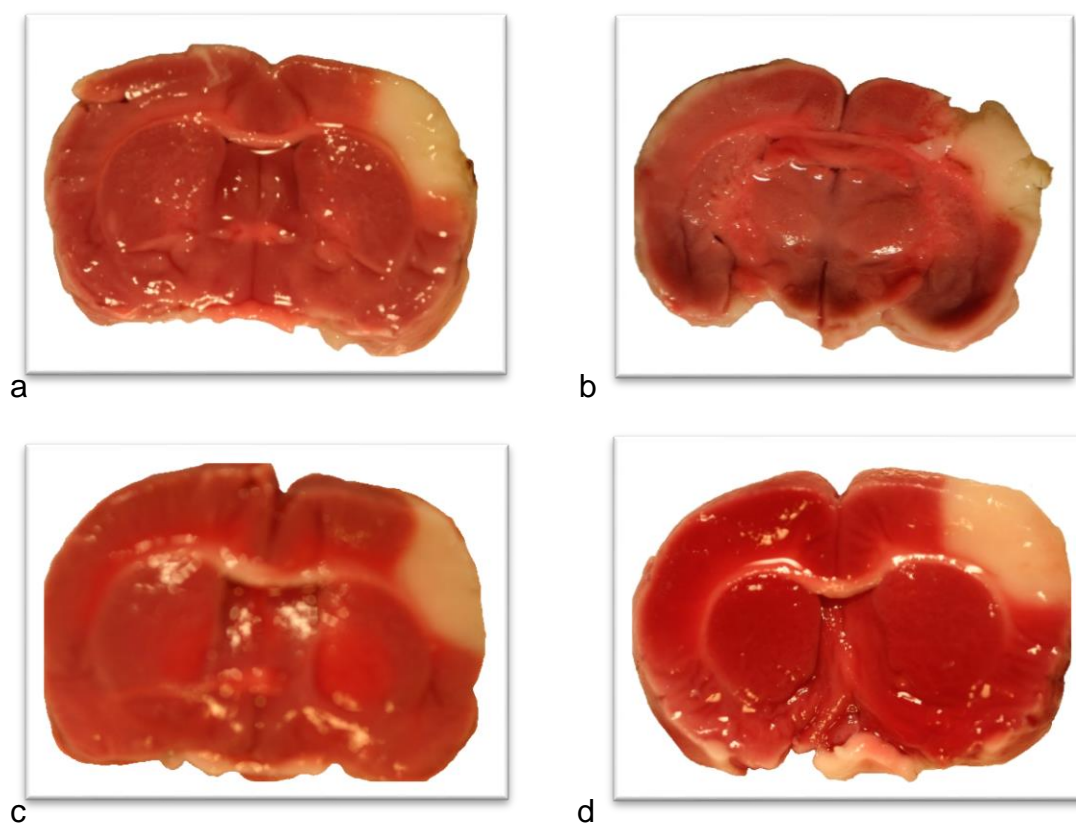


Fig 1 Representative coronal brain infarction (pale area on the right) sections stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). **a** Control group; **b** 3-caffeoylquinic acid, 4 µg; **c** 3-caffeoylquinic acid, 25 µg; **d** 3-caffeoylquinic acid, 100 µg

Total antioxidant capacity

The ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid) method of measuring the total antioxidant capacity of plasma as proposed by Miller [16] is based on the ability of the sample to bleach the radical cation $ABTS^{\bullet+}$ generated in the presence of potassium persulphate. Briefly, the $ABTS^{\bullet+}$ radical cation is generated by the reaction of a 7 mM solution of ABTS in water with 2.45 mM potassium persulphate (1:1). The assay consists of mixing 960 μ L of $ABTS^{\bullet+}$, 30 μ L of PBS and 10 μ L of the plasma sample, and measuring the decrease in the absorbance of the $ABTS^{\bullet+}$ cation at 734 nm. The results are transformed and expressed as molar equivalents (mM) of trolox using a previously determined calibration curve.

Total polyphenols

Measurement of polyphenolic content was performed following the Folin-Ciocalteu method, with slight modifications for plasma samples to avoid protein interference [17]: 10 μ L of MPA were mixed with 50 μ L of plasma and centrifuged at 2700 g for 3 minutes. Then, 5 μ L of supernatant was mixed with 95 μ L of water, 500 μ L of Folin-Ciocalteu reagent, 400 μ L of sodium carbonate and incubated for 40 minutes at room temperature. The absorbance was subsequently measured in a spectrophotometer at 750 nm against a blank. The results were expressed in μ g/ml of gallic acid equivalents, and a standard solution of this acid was used for calibration.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SD, when following a normal distribution, and median (interquartile range) when this was not normal. Groups were compared by analysis of variance (ANOVA) to estimate the presence of any statistical differences among the studied samples. Furthermore, the post hoc test was used in determining significant differences between groups. All statistical analysis were performed using IBM® SPSS® Statistics 19. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

The control parameters of blood pressure (mmHg), body temperature (°C) and hemoglobin saturation by oxygen (%) are shown in Table 1.

Table 1. Physiological parameters at baseline (before) and during MCAO

	Control (n=5)	4 µg/ml (n=5)	25 µg/ml (n=4)	100 µg/ml (n=5)
Before ischemia				
Blood pressure (mm Hg)	114 ± 18.2	110 ± 14.1	96.3 ± 16.5	132 ± 10.6
Body temperature (°C)	35.8 ± 0.8	35.4 ± 0.4	35.1 ± 0.3	35.2 ± 0.3
Oxygen saturation (%)	85 ± 9.9	82.7 ± 7.1	85 ± 9.9	82.3 ± 5.7
During MCAO				
Blood pressure (mm Hg)	98.3 ± 7.6	130 ± 49.5	83.3 ± 20.8	92.5 ± 31.8
Body temperature (°C)	37 ± 0.5	37 ± 0.5	37 ± 0.5	37 ± 0.5

Mean arterial blood pressure (MABP, mmHg), PaO₂ (%), temperature (°C). Values are expressed as means (± S.D). There were no significant differences in mean arterial blood pressure, body temperature or oxygen saturation among the group.

No significant differences in blood pressure, body temperature and oxygen saturation between groups existed. After infusion of the compound in rats there was no hypotension (data not shown). Total antioxidant capacity measurement by ABTS method is shown in Table 2 and was measured in mM of Trolox. Comparing with baseline values, there was no significant variation within each group (either control or experimental) in antioxidant capacity after infarction. We found that the increase in antioxidant capacity after injection of 3-CQA was only significantly greater than in controls in the group that received the highest dose of 3-CQA (100 µg).

Table 2. Antioxidant capacity (measurement by ABTS method) before and after middle cerebral artery occlusion. The results were expressed in mM of Trolox.

	Pre-MCAO Mean \pm SD	Post-MCAO Mean \pm SD	Variation Mean \pm SD
Control (n=5)	1.15 \pm 0.28	1.06 \pm 0.21	-0.09 \pm 0.15
4 μ g/ml (n=5)	1.14 \pm 0.17	1.18 \pm 0.16	0.04 \pm 0.08
25 μ g/ml (n=4)	1.15 \pm 0.27	1.07 \pm 0.28	-0.08 \pm 0.05
100 μ g/ml (n=5)	1.16 \pm 0.12	1.25 \pm 0.20	0.09 \pm 0.11*

* p<0.05 compared to control group

Plasma polyphenol content was measured in μ g/ml equivalents of gallic acid. We found that plasma polyphenol content before 3-CQA administration did not change after its infusion and provoking the cerebral infarction, both within or between groups (control and experimental groups, Table 3).

Table 3. Polyphenol content before and after cerebral infarction. The results were expressed in μ g/ml of gallic acid equivalents.

	Pre-MCAO Mean \pm SD	Post-MCAO Mean \pm SD	Change after MCAO Mean \pm SD
Control (n=5)	998 \pm 61.5	958 \pm 99	-39.7 \pm 108
4 μ g/ml (n=5)	1083 \pm 130	1001 \pm 123	-81.8 \pm 249
25 μ g/ml (n=4)	1075 \pm 48	1197 \pm 92.1	21.8 \pm 59.3
100 μ g/ml (n=5)	956 \pm 241	1104 \pm 280	148 \pm 117

* (p<0.05) Significant differences vs. control group

We examined whether the administration of 3-CQA at different doses could reduce brain damage (% of cerebral volume suffering infarction) induced by occlusion of middle cerebral artery.

There were no significant differences between groups treated with 3-CQA and control group in the proportion of infarction (percentage of infarcted tissue of total brain volume) (Table 4).

Table 4. Cerebral infarction volume (%) in groups.

	Median (interquartile range)
Control (n=5)	2.96 (0.61-3.13)
4 µg/ml (n=5)	0.38 (0.13-0.95)
25 µg/ml (n=4)	1.30 (0.36-3.35)
100 µg/ml (n=5)	0.84 (0.29-6.12)

All the values are represented as median (interquartile range)

* (p<0.05). Significant differences vs. control group.

Discussion

Free radicals influence the pathogenesis of stroke, either by increasing reactive oxidative species, reactive nitrogen species, or decreasing antioxidant mechanisms through lipid peroxidation in cell membranes. This has been tested in animal models with compounds that have *in vitro* antioxidant activity, and has also been used in clinical trials in stroke patients, so far without positive results due to lack of effect or toxicity. Food compounds with *in vitro* antioxidant activity (such as 3-CQA) presumably lack toxicity as they are part of the diet: CGA is widespread in plants, fruits and vegetables and it is estimated that humans consume up to 1 g per day of it [18]. The antioxidant activity of this compound is well documented [19-21] and other pharmacological properties, antiviral [22], antibacterial [23], antiinflammatory [24] and antimutagenic [25] have been hypothesized.

This antioxidant capacity is due to its structural characteristics and physical-chemical properties, which can prevent the oxidation of biomolecules, acting as a metal chelator, or due to its stabilizing capacity of reactive oxygen species (ROS) [24]. Several studies have shown that the isomers of chlorogenic acid (5-CQA and 3-CQA used in this study)

also have antioxidant capacity [26,25] and have reduced behavioral deficits in experimental stroke in rabbits [10].

Decaffeinated coffee studies suggest that the potential beneficial effect of coffee in reducing the risk of stroke is not due to caffeine but to its phenolic compounds [1]. Chlorogenic acid is the principal polyphenol of coffee [12] and its isomers (3-CQA, 4-CQA and 5-CQA have similar free radical scavenger activity [26]). They represent 86% of chlorogenic acid in coffee. The proportion among them is: 36.5% of 5-CQA, 34.2% of 4-CQA and 29.3% of 3-CQA [12].

However, it is not known how much of 3-CQA antioxidant activity remains *in vivo* after it has been metabolized [27]. Its effect on cerebral infarction is also unknown, and to assess both was the objective of this study. The measurement of total antioxidant capacity (TAC) of biological fluids is a measure of the sum of antioxidants that may protect against oxidative damage to membranes and other cellular components [28].

We estimated the antioxidant effect of the different doses of 3-CQA, measuring the change in baseline TAC that took place after the infarction and 3-CQA administration in the three experimental groups, and comparing it with the change in the control group. The antioxidant capacity was determined by the ABTS technique using spectrophotometry, taking care of important parameters such as reaction time and temperature of the test. An improved technique using HPLC has been recently proposed to increase reliability and avoid interference of other biological compounds [29].

We found that the group that received the highest dose of 3-CQA had a greater baseline-post infarction antioxidant capacity increase (Table 2). 3-CQA can directly increase antioxidant capacity, or indirectly, by reducing consumption of endogenous antioxidants [30]. No antioxidant capacity increases were found in the other two groups that received lower doses of 3-CQA. The short half-life of chlorogenic acid compounds [31] could account for this absence of effect in systemic antioxidant measurements except in the highest dose used. Higher doses than those studied here or repeated doses should be studied in the future.

We have also found that the relative increase in antioxidant capacity does not depend on an increase in polyphenol content. We found no previous studies of the relation between the administration of 3-CQA or its isomers with polyphenol levels. In this study we have found no polyphenol changes but doses of 3-CQA higher than used here should be studied in the future. In other studies, increases in antioxidant activity not associated with polyphenol increase were attributed to uric acid [32,33].

The brain is susceptible to attack by free radicals, as it contains high concentrations of polyunsaturated fatty acids subject to peroxidation, and it is not particularly rich in antioxidant protecting compounds [34], which gives relevance to the study of antioxidant drugs or food compounds. Low plasma antioxidant capacity has been associated with increased cerebral infarction volume [35]. However, we found that 3-CQA at the doses studied were not able to reduce experimental cerebral infarction (Table 4), even at doses that increased plasma antioxidant capacity. This suggests that this increase in antioxidant capacity is insufficient or fails to counteract other mechanisms involved in ischemic brain damage.

Conclusion

In an experimental cerebral infarction model and compared with controls, 3-CQA only increased plasma total antioxidant capacity at the highest dose used (100 µg). This increase in antioxidant capacity was not due to an increase in polyphenols and did not reduce the volume of cerebral infarction. Higher doses of this compound should be studied in the future.

References

1. Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB, van Dam RM (2009) Coffee consumption and risk of stroke in women. *Circulation* 119 (8):1116-1123
2. Larsson SC, Mannisto S, Virtanen MJ, Kontto J, Albanes D, Virtamo J (2008) Coffee and tea consumption and risk of stroke subtypes in male smokers. *Stroke* 39 (6):1681-1687
3. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters (2003). *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 15 (3):222-229

4. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U (2007) NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 357 (6):562-571
5. Ginsberg MD (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55 (3):363-389
6. Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke: A systematic review. Tirilazad International Steering Committee (2000). *Stroke* 31 (9):2257-2265
7. Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J (2000) Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11):5496-5500
8. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S (2008) Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *Journal of Nutrition* 138 (12):2309-2315
9. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5):727-747
10. Lapchak PA (2007) The phenylpropanoid micronutrient chlorogenic acid improves clinical rating scores in rabbits following multiple infarct ischemic strokes: Synergism with tissue plasminogen activator. *Experimental Neurology* 205 (2):407-413
11. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17 (4):738-743
12. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C (2007) Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *The Journal of nutrition* 137 (10):2196-2201
13. Clifford MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (3):362-372
14. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA (2008) Experimental models of cerebral ischemia. *Modelos experimentales de isquemia cerebral* 47 (8):414-426
15. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17 (6):1304-1308
16. Miller NJ, Rice-Evans CA (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free radical research* 26 (3):195-199
17. Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of nutrition* 128 (6):1003-1007
18. Olthof MR, Hollman PC, Zock PL, Katan MB (2001) Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition* 73 (3):532-538

19. Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans C (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS letters* 368 (1):188-192
20. Zang LY, Cosma G, Gardner H, Castranova V, Vallyathan V (2003) Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol Cell Biochem* 247 (1-2):205-210
21. Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, Shibata H (1997) Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1335 (3):335-342
22. Jassim SA, Naji MA (2003) Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of applied microbiology* 95 (3):412-427
23. Rodriguez De Sotillo D, Hadley M, Wolf-Hall C (1998) Potato peel extract a nonmutagenic antioxidant with potential antimicrobial activity. *Journal of Food Science* 63 (5):907-910
24. Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GEP (2006) Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (11):2236-2240
25. Kono Y, Shibata H, Kodama Y, Sawa Y (1995) The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochemical Journal* 312 (3):947-953
26. Nakatani N, Kayano SI, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T (2000) Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11):5512-5516
27. Higdon JV, Frei B (2006) Coffee and health: a review of recent human research. *Critical reviews in food science and nutrition* 46 (2):101-123
28. Ryan M, Grayson L, Clarke DJ (1997) The total antioxidant capacity of human serum measured using enhanced chemiluminescence is almost completely accounted for by urate. *Annals of clinical biochemistry* 34 (Pt 6):688-689
29. Bompadre S, Leone L, Politi A, Battino M (2004) Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples. *Free radical research* 38 (8):831-838
30. Lagowska-Lenard M, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H Influence of vitamin C on markers of oxidative stress in the earliest period of ischemic stroke. *Pharmacological Reports* 62 (4):751-756
31. Xie X, He X, Qiu X, Song Z (2007) In vitro monitoring chlorogenic acid in human urine and serum by a flow injection system exploiting the luminol-dissolved oxygen chemiluminescence reaction. *Current drug metabolism* 8 (8):773-777
32. Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C (2002) Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21):6211-6216
33. Gariballa SE, Hutchin TP, Sinclair AJ (2002) Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. *Qjm* 95 (10):685-690

34. Gaur V, Kumar A Neuroprotective potentials of candesartan, atorvastatin and their combination against stroke induced motor dysfunction. *Inflammopharmacology*:1-10

35. Leinonen JS, Ahonen JP, Lónnrot K, Jehkonen M, Dastidar P, Molnár G, Alho H (2000) Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke* 31 (1):33-39

Publicación 2:

Antioxidant coffee component 3-caffeoylquinic acid decreases infarct volume and plasma lipid oxidation-derived but not protein oxidation-derived products in an experimental model of cerebral infarct

Silvia Ruiz-Crespo · José M. Trejo-Gabriel-Galán · Mónica Cavia-Saiz · Pilar Muñiz

Resumen

El estrés oxidativo está implicado en la fisiopatología de la lesión cerebral isquémica, y antagonizarlo es una de las estrategias neuroprotectoras que se están investigando. Entre los compuestos bioactivos con capacidad antioxidante está el isómero del ácido clorogénico el ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA) cuyos efectos preventivos en enfermedades vasculares es conocido.

Como continuación del estudio previo, se evaluó en el mismo modelo de infarto cerebral experimental con ligeras modificaciones, el efecto de la inyección intraperitoneal con 3-CQA de las dosis de 4 μg y 25 μg sobre el área infartada y sobre biomarcadores de estrés oxidativo.

En este estudio en modelo de infarto cerebral experimental en rata, se administró intraperitonealmente a un grupo control de ratas Sprague-Dawley cloruro sódico al 0.9% y se crearon otros dos grupos tratados con 3-CQA a las dosis de 4 y 25 μg respectivamente disueltas en el mismo volumen de cloruro sódico al 0.9%. En este trabajo se evaluó además del área cerebral infartada, los biomarcadores de daño oxidativo a lípidos (MDA) y a proteínas (grupos carbonilo)

Comparados con el grupo control, los grupos tratados con ambas dosis de 3-CQA desarrollaron infartos cerebrales de menor volumen. En el plasma de los dos grupos de ratas tratadas con 3-CQA, y al contrario de lo que ocurrió en el grupo de control, el producto de peroxidación lipídica, malondialdehído, no aumentó después del infarto cerebral. En cambio, los grupos carbonilo (derivados de la oxidación de proteínas) aumentaron en el plasma tras el infarto cerebral en el grupo control y en los dos grupos pretratados con ácido 3-cafeoilquínico por igual.

Este estudio nos permitió concluir que el tratamiento con el 3-CQA bajo las condiciones experimentales ensayadas en este estudio reduce el volumen de infarto experimental y previene el daño oxidativo a los lípidos en el plasma.

ANTIOXIDANT COFFEE COMPONENT 3-CAFEOYLQUINIC ACID DECREASES INFARCT VOLUME AND PLASMA LIPID OXIDATION-DERIVED BUT NOT PROTEIN OXIDATION-DERIVED PRODUCTS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CEREBRAL INFARCT

Abstract

Oxidative stress is involved in the pathophysiology of ischemic brain injury, and antagonizing it is one of the neuroprotective strategies. In this study in a model of experimental cerebral infarct in rats, the effect of intraperitoneal administration of two doses (4 and 25 μ g) of the antioxidant coffee component 3-caffeoylquinic acid (3-CQA) acid was determined and compared with placebo both as regards cerebral infarct volume and plasma biomarkers of oxidative damage. A reduction of cerebral infarct was found with both 3-CQA doses. Contrary to what happened in the control group, the lipid oxidation-derived product malondialdehyde (MDA) did not increase after cerebral infarct when there was 3-CQA pre-treatment. In contrast, 3-CQA pre-treatment did not prevent an increase in protein oxidation-derived carbonyl groups (CG) in post infarct plasma in the same proportion as in the control group.

Conclusion: 3-CQA reduces the volume of experimental cerebral infarct and oxidative damage to lipids in plasma.

1. Introduction

Cerebral infarct is caused by an interruption or severe reduction in blood flow, oxygen, and glucose to brain tissue that decreases adenosine triphosphate production, increases intracellular calcium, free radical generation, excitotoxicity, inflammation, and modifies blood-brain barrier permeability and cellular pH, and as a consequence of all this, necrotic cell death ensues (Ahn et al. 2011; Durukan and Tatlisumak 2007; Love 1999). Restoring blood flow is intended to reverse the above mentioned deleterious effects, but can also generate reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) (Nanetti et al. 2011), leading to oxidative damage to proteins, lipids and nuclear DNA. Under physiological conditions, ROS have important biological functions serving as redox signaling molecules or immune defenses (Allen and Bayraktutan 2009). But in the ischemia-reperfusion context, the excessive production rate of ROS and RNS cannot be controlled by the endogenous antioxidant defenses (Piantadosi and Zhang 1996), it damages macromolecules (Chen et al. 2012), thereby activating the signaling mechanisms that lead to cell death and to worsening of ischemic tissue damage (Nanetti et al. 2011; Allen and Bayraktutan 2009). In addition to endogenous stores, antioxidants are also found in some foods such as coffee, the consumption of which has been associated with lower heart disease, stroke and respiratory disease mortality (Saito et al. 2015). Beneficial effects have been attributed to compounds other than caffeine, as they have also been found in decaffeinated coffee consumers (Montagnana et al. 2012). Chlorogenic acids (CGA) are found in some plants, and one of them is the coffee plant (*Coffea* spp.), in which CGA are the second more abundant components, only behind caffeine. CGA are phenolic secondary metabolites formed by esterification of caffeic acid and quinic acid (Lallemant et al. 2012; Ong et al. 2012) and are one of the most abundant polyphenols in the human diet (Feng et al. 2005; Kang and Lee 2014; Meng et al. 2013). Numerous in vivo and in vitro studies have shown that CGA have antioxidant, antibacterial and anti-carcinogenic activity, and can also reduce plasma glucose and lipid concentrations (Ong et al. 2012; Feng et al. 2005; Zang et al. 2003; Sato et al. 2010; Kono et al. 1997; dos Santos et al. 2006; Bassoli et al. 2008; Rodriguez de Sotillo and Hadley 2002; Kono et al. 1998). CGAs are classified according to the position of the acyl moiety of the molecule (Lallemant et al. 2012; Clifford 2000). In this study we have tested if one of them- the 3- caffeoylquinic acid

(3-CQA)-can or cannot modify cerebral infarct volume and the plasma concentrations of the marker of lipid oxidation, malondialdehyde (MDA), and of the marker of protein oxidation, carbonyl groups (CG), in an experimental model of cerebral infarct.

2. Results

2.1 Cerebral infarct volume.

Administration of both 4 and 25 µg of 3-CQA prior to MCAO was associated with reduced infarct volume (Table 1). Namely, in the group that received 4 µg of 3-CQA the percentage of the total brain volume that suffered infarct was 5 times smaller, and in the group that received 25 µg of 3-CQA it was 3 times smaller than in the control group.

Table 1. Volume of cerebral infarct (%) in control and 3-CQA groups.

	Median (interquartile range)
Control (n=7)	3.00 (0.88)
4 µg (n=5)	0.38 (0.06)*
25 µg (n=4)	0.96 (0.76)*

*($P < 0.05$) Significant differences versus control group

2.2 Products of oxidative damage to biomolecules in plasma: MDA and CG.

Compared to the baseline values in plasma (prior to intraperitoneal injection and to MCAO), MDA increased in the control group in the sample obtained 24 hours after MCAO, but it did not increase in the groups receiving 4 or 25 µg of 3-CQA (Table 2). Regarding carbonyl groups plasma content, in no group were significant differences found between the sample extracted before both the intraperitoneal injection and MCAO and the sample extracted 24 hour later (Table 3).

Table 2. MDA in plasma before and after both intraperitoneal administration and MCAO

	Pre-MCAO Median (interquartile range)	Post-MCAO Median (interquartile range)
Control (n=7)	7.9 (3.7)	11.9 (11.4)
4 µg (n=5)	9.5 (3.0)	12.5 (0.9) *
25 µg (n=4)	7.6 (5.8)	13.3 (1.9) *

Results are expressed in µM MDA

*($P < 0.05$) Pre-MCAO versus Post-MCAO significant differences in each group

Table 3. Carbonyl groups in plasma before and after both intraperitoneal administration and MCAO

	Pre-MCAO Median (interquartile range)	Post-MCAO Median (interquartile range)
Control (n=7)	1.00 (0.79)	1.24 (0.73)
4 µg (n=5)	0.68 (0.18)	0.97 (0.18)
25 µg (n=4)	1.31 (1.03)	2.00 (0.95)

Results are expressed in nmol CG/mg proteins

*($P < 0.05$) Pre-MCAO versus Post-MCAO significant differences in each group

3. Discussion

The brain suffering a stroke encompasses an area of irreversible necrosis surrounded by other functionally impaired, but structurally intact, area (Brouns and De Deyn 2009) that can evolve either to necrosis or to recovery. Oxidative stress, a known worsening factor of ischemic brain damage, has been assessed in patients with stroke by measuring plasma antioxidant concentrations (Cano et al. 2003).

Formation of ROS and RNS and their elimination maintains them balanced in biological systems, but when the antioxidant defensive mechanisms fail, oxidative stress ensues.

These endogenous antioxidant defenses include the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase and free radical scavenger molecules such as glutathione, vitamin C and others (Hansel et al. 2014). In addition, there are exogenous antioxidants (Baradaran et al. 2014) be it drugs or phytochemicals, and their search and study is an active avenue of research (Buendia et al. 2015; Gillespie and Gavins 2013).

Experimental *in vitro* and *in vivo* data have shown that ischemic injury can be ameliorated by polyphenols (Rice-Evans 2001; Huang et al. 2001; Hong et al. 2000; Takizawa et al. 2003). Chlorogenic acids are a group of these that, besides having antioxidant capacity, can reduce blood pressure, systemic inflammation, hyperglycemia, hyperlipidemia, and platelet aggregation (Montagnana et al. 2012; Rodriguez de Sotillo and Hadley 2002; Tunnicliffe and Shearer 2008; Ong et al. 2013; Zhang et al. 2011). They also appear to be neuroprotective (Nakajima et al. 2007; Li et al. 2008; Vardi et al. 2012). The antioxidant capacity of chlorogenic acids is located in the hydroxyl groups of the aromatic ring, and stabilize free radicals (Rice-Evans et al. 1996; Cheng et al. 2007). The three caffeoylquinic acid isomers show similar antioxidant activity, indicating that it is not influenced by the position of esterification of quinic acid (Xu et al. 2012).

There are few data about 3-CQA, the compound on which this study has focused: 3-CQA increases cell membrane permeability (Ahn et al. 2011), appears to protect biomolecules from oxidative damage (Xu et al. 2012), and in a similar study to the present, we found an increase in plasma antioxidant capacity that could not be explained by polyphenols, as the latter did not increase in plasma (Ruiz-Crespo et al. 2012).

Our data show a clear reduction in percentage of infarct volume in groups pre-treated either with 4 or with 25 μ g of 3-CQA before MCAO when compared with infarct volume in the control group that received plain saline. This is at odds with a study with a similar protocol in which a neuroprotective effect was not found (Ruiz-Crespo et al. 2012). A possible explanation is a change in the timing of the interval from intraperitoneal injection to MCAO, which was 30 minutes in the previous study but was 60 minutes in

the current study, in order to ensure that no interval was unexpectedly increased beyond 30 minutes due to MCAO procedure-related delays. 3-CQA has also shown a neuroprotective effect as measured by functional scales in a rabbit model of brain ischemia (Lapchak 2007).

The brain is more susceptible than other tissues to oxidative stress, due to its low antioxidant capacity and is only second to adipose tissue in lipid content (Vardi *et al.* 2012; Cobb and Cole, 2015). MDA, a lipid peroxidation product, can act as a marker of damage to lipids by oxidative stress in cerebral ischemia (Cano *et al.* 2003). Lipid peroxidation is one of the mechanisms by which free radicals can injure cells after MCAO (Kirisattayakul *et al.* 2013). In particular, the peroxidation of polyunsaturated fatty acids, a component of membrane phospholipids, is a “chain reaction” that can continue until the substrate is completely consumed or the reaction is interrupted by antioxidants. This peroxidation damages the structure and thereby the function of cell membranes by altering their integrity, fluidity and permeability. Also, peroxidation modifies low-density lipoprotein and high density lipoproteins (LDL, HDL), and generates toxic by-products, including MDA (Cherubini *et al.* 2005).

Increased plasma MDA has been found in MCA occlusion models (Vardi *et al.* 2012; Yousuf *et al.* 2009), and this has been considered as indirect evidence of oxidative stress damage (Sakamoto *et al.* 1991). In the present results, an increase of plasma MDA after MCA occlusion has also been found, but this MDA increase has been restricted to the control group. By contrast, the administration of 3-CQA at doses of 4 or 25 μg has inhibited this MDA increase. Based on this, it can be hypothesized that the reduction of infarct volume by 3-CQA pre-treatment found at tislular level may be due to cell membrane protection at cellular scale and this in turn to 3-CQA protection of lipid peroxidation by brain ischemia-induced free radicals, as lipids are a principal component of cell membranes and indeed, of the brain itself. Previous findings point in this direction (Meng *et al.* 2013; Rodriguez de Sotillo and Hadley 2002; Ong *et al.* 2013). Proposed 3-CQA actions are to stabilize free radicals, to chelate metals, or to induce antioxidant enzymes (Niki 2012).

In contrast to the effect in MDA, none of the two doses of 3-CQA studied modified the plasma concentration of carbonyl groups, a biomarker protein oxidation. In another

antioxidant, resveratrol, (Yousuf et al. 2009) data suggest protein oxidation protection. The 3-CQA associated decrease of infarcted tissue found here may have lipid, but not protein protection from oxidative damage as its counterpart at the molecular level. Future studies should confirm and expand or reject these findings. Limitations of this study are the low number of experimental animals studied. Also, total antioxidant capacity of plasma and other parameters related to oxidative stress were not determined, as multiple blood sampling can deteriorate the cardiac and cerebrovascular homeostasis in small experimental animals.

Conclusion

We have found a decrease in experimental infarct volume with 3-CQA 4 and 25 µg pre-treatment, suggesting a neuroprotective effect against cerebral ischemia. The decrease in infarct volume in pre-treated animals is associated with a lower plasma concentration of malondialdehyde but not of carbonyl groups, suggesting lipid but not protein protection from ischemia by 3-CQA.

4. Method and materials

Experimental animals were 250-360 g adult male Sprague-Dawley rats. They were housed in individual cages under a light-dark cycle of 12 hours, at 19°C ambient temperature, and access to water and commercial rat chow ad libitum. Experimental procedures were approved by the Committee supervising clinical trials and experimental animal welfare of the University Hospital of Burgos, Spain. A total of sixteen animals were randomly assigned to receive intraperitoneally, one of the following: 7 animals in Control Group received 1 ml of plain 0.9% NaCl solution; 5 animals in Group 1 received 4 µg of 3-CQA diluted in 1 ml of 0.9% NaCl solution; and 4 animals in Group 2 received 25 µg of 3-CQA diluted in 1 ml of 0.9% NaCl solution. Intraperitoneal injections were used in order to circumvent variable gastrointestinal absorption (Farah et al. 2008), and they were administered 60 minutes before cerebral ischemia (Olthof et al. 2001; Lafay et al. 2006; Azuma et al. 2000) to prevent variations of the interval between 3-CQA injection and cerebral ischemia in case of prolongation of the middle cerebral artery occlusion (MCAO) procedure in some animals, to achieve the same 3-CQA plasma concentration in all animals. Inclusion criteria were survival of animals during the 24 hours that the experiment lasted and visibility of cerebral

infarct with 2,3,5 triphenyltetrazolium (TTC) staining.

The MCAO model used was described by Chen (Chen et al. 1986). Animals were anesthetized (with 6 mg of diazepam, 15 mg ketamine and 0.3 mg atropine, all intramuscular), a femoral artery was catheterized in order to measure arterial pressure and heart rate before and after MCAO, and the other to obtain basal plasma samples. After that, and 60 minutes prior to MCAO, the intraperitoneal injection was performed according to the assigned group.

The skull was exposed surgically, using a dental drill (DrillKaar™) the brain was accessed and under surgical microscope view, the middle cerebral artery was ligated by two 10-O suture knots and was cut in-between to ensure no-flow. Then, both carotid arteries were occluded in the neck with 5-O suture knots (Prieto-Arribas et al. 2008), permanently ipsilateral to the MCAO and during 2.5 hours in the contralateral. Blood pressure, rectal temperature and oxygen saturation were measured before and after MCAO. The temperature of the rats remained stable with the aid of an electric blanket (Tables 4 and 5).

Table 4. Blood pressure in groups before and after MCAO (mean±SD).

	Pre-MCAO (mm Hg)	Post-MCAO (mmHg)
Control	112.9 ± 20.4	81 ± 25.3
4 µg	110 ± 14.1	130 ± 49.5
25 µg	97.5 ± 24.7	100 ± 14.1

Table 5. Rectal temperature and oxygen saturation in groups before and after MCAO (mean±SD)

	Pre-MCAO (°C)	Post-MCAO (°C)	Oxygen saturation (%)
Control	35.7 ± 0.8	37 ± 0	83.2 ± 9.9
4 µg	35.4 ± 0.4	37 ± 0	83± 7.8
25 µg	35.1 ± 0.3	37 ± 0	83± 16.5

After anesthesia, before MCAO, body temperature was low in all groups and was normalized by an electric blanket

Staining and quantification of cerebral infarct: 24 hours after MCAO rats were deeply anesthetized and sacrificed by decapitation, the brains were removed, and the olfactory bulbs and cerebellum were discarded. Brains were placed on an ad hoc matrix and were cut rostrocaudally in 2 mm thick coronal sections that were immediately immersed in a 2% solution of TTC (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) at 37°C for 30 minutes in order to delimit the infarct zone, which lacks enzymatic staining (Bederson et al. 1986). Each of the sections was photographed on both sides. The total section area and infarct area were measured in each section by means of a planimeter (X-PLAN 360d™) and total brain volume, infarct volume, and percentage of total brain volume suffering infarct by integrating the areas with the 2 mm thicknesses of each section.

A baseline blood sample was collected from the femoral artery before both the intraperitoneal infusion and MCAO, and another 24 hours later at the end of the experiment. After their 5000g centrifugation for 10 minutes, the supernatant serum was frozen at -80° C for subsequent biochemical analysis of malondialdehyde (MDA), which was performed using high performance liquid chromatography (Grotto et al. 2007), and the carbonyl groups (CG) content using spectrophotometry (Levine and Stadtman 2001). Total protein concentration was determined by the Lowry method (Lowry et al. 1951).

Statistical analysis: Due to non-normal distribution, data are summarized as median (interquartile range) and compared before and after MCAO through the Wilcoxon test for paired samples. Global differences of volume of cerebral infarction between three groups were assessed using Kruskal-Wallis test, and then between each two groups using Mann-Whitney U-test in post-hoc analysis. The IBM®SPSS® Statistics 19 software was used and $P < 0.05$ was considered indicative of significant differences.

References

- Ahn EH, Kim DW, Shin MJ, et al (2011) Chlorogenic Acid Improves Neuroprotective Effect of PEP-1-Ribosomal Protein S3 Against Ischemic Insult. *Exp Neurol* 20:169. doi: 10.5607/en.2011.20.4.169
- Allen CL, Bayraktutan U (2009) Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 4:461–470. doi: 10.1111/j.1747-4949.2009.00387.x
- Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, et al (2000) Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 48:5496–5500. doi: 10.1021/jf000483q
- Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M (2014) Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci* 19:358–367.
- Bassoli B, Cassolla P, Borba-Murad GR, et al (2008) Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochem Funct* 26:320–8. doi: 10.1002/cbf.1444
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304–1308. doi: 10.1161/01.STR.17.6.1304
- Brouns R, De Deyn PP (2009) The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 111:483–495. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.04.001
- Buendia I, Gómez-Rangel V, González-Lafuente L, Parada E, León R, Gameiro I, Michalska P, Laudond M, Egea J LMG (2015) Neuroprotective mechanism of the novel melatonin derivative Neu-P11 in brain ischemia related models. *Neuropharmacology* 99:187–195.
- Cano CP, Bermúdez VP, Atencio HE, et al (2003) Increased serum malondialdehyde and decreased nitric oxide within 24 hours of thrombotic stroke onset. *Am J Ther* 10:473–476. doi: 10.1097/00045391-200311000-00018
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, et al (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738–743. doi: 10.1161/01.STR.17.4.738
- Chen X, Chen H, Xu M, Shen J (2012) Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin* 34:67–77. doi: 10.1038/aps.2012.82

- Cheng JC, Dai F, Zhou B, et al (2007) Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem* 104:132–139. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.012
- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 39:841–52. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.025
- Clifford MN (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci food Agric* 80:1033–1043.
- Cobb, CA., Cole M (2015) Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* S0969-9961:00177–1.
- Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GEP (2006) Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull* 29:2236–2240. doi: 10.1248/bpb.29.2236
- Durukan A, Tatlisumak T (2007) Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87:179–197. doi: 10.1016/j.pbb.2007.04.015
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S (2008) Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr* 138:2309–2315. doi: 10.3945/jn.108.095554
- Feng R, Lu Y, Bowman LL, et al (2005) Inhibition of Ap-1 , Nf- k B and Mapks and Induction of Phase 2 Detoxifying Enzyme Activity By Chlorogenic Acid. *J Biol Chem* 280:27888–95.
- Gillespie S, Gavins FNE (2013) Phytochemicals: Countering risk factors and pathological responses associated with ischaemia reperfusion injury. *Pharmacol Ther* 138:38–45. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.005
- Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, et al (2007) Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 43:619–624. doi: 10.1016/j.jpba.2006.07.030
- Hansel G, Ramos DB, Delgado CA, et al (2014) The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. *PLoS One* 9:e90693. doi: 10.1371/journal.pone.0090693
- Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, et al (2000) Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull* 53:743–749.
- Huang S, Tsai M, Chih C, et al (2001) Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci* 69:1057–65.
- Kang J, Lee S (2014) Protective Effects of Chlorogenic Acid against Experimental Reflux Esophagitis in Rats. *Biomol Ther* 22:420–425.
- Kirisattayakul W, Wattanathorn J, Tong-un T, et al (2013) Cerebroprotective Effect of Moringa oleifera against Focal Ischemic Stroke Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion. *Oxid Med Cell Longev* 2013:10–13.
- Kono Y, Kashine S, Yoneyama T, et al (1998) Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:22–27. doi: 10.1271/bbb.62.22

Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, et al (1997) Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1335:335–342. doi: 10.1016/S0304-4165(96)00151-1

Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, et al (2006) Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J Nutr* 136:1192–1197.

Lallemand LA, Zubieta C, Lee SG, et al (2012) A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. *Plant Physiol* 160:249–260. doi: 10.1104/pp.112.202051

Lapchak P a. (2007) The phenylpropanoid micronutrient chlorogenic acid improves clinical rating scores in rabbits following multiple infarct ischemic strokes: Synergism with tissue plasminogen activator. *Exp Neurol* 205:407–413. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.02.017

Levine RL, Stadtman ER (2001) Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 36:1495–1502. doi: 10.1016/S0531-5565(01)00135-8

Li Y, Shi W, Li Y, et al (2008) Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol* 26:13–21. doi: 10.1016/j.etap.2007.12.008

Love S (1999) Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 9:119–131.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr a. L, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. doi: 10.1007/s10982-008-9035-9

Meng S, Cao J, Feng Q, et al (2013) Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-based Complement Altern Med* 2013:801457. doi: 10.1155/2013/801457

Montagnana M, Favalaro EJ, Lippi G (2012) Coffee intake and cardiovascular disease: Virtue does not take center stage. *Semin Thromb Hemost* 38:164–177. doi: 10.1055/s-0032-1301414

Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H (2007) Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci* 80:370–377. doi: 10.1016/j.lfs.2006.09.017

Nanetti L, Raffaelli F, Vignini A, et al (2011) Oxidative stress in ischaemic stroke. *Eur J Clin Invest* 41:1318–1322. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02546.x

Niki E (2012) Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Lett* 586:3767–3770. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.025

Olthof MR, Hollman PC, Katan MB (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131:66–71.

Ong KW, Hsu A, Tan BKH (2012) Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: A contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0032718

Ong KW, Hsu A, Tan BKH (2013) Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochem Pharmacol* 85:1341–1351. doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.008

Piantadosi C, Zhang J (1996) Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke* 27:327–331; discussion 332.

Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, et al (2008) Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol* 47:414–426.

Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8:797–807. doi: 10.2174/0929867013373011

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9

Rodríguez de Sotillo D V., Hadley M (2002) Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: Cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J Nutr Biochem* 13:717–726. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00231-0

Ruiz-Crespo S, Trejo-Gabriel-Galan JM, Cavia-Saiz M, Muñoz P (2012) Coffee component 3-caffeoylquinic acid increases antioxidant capacity but not polyphenol content in experimental cerebral infarction. *Neurochem Res* 37:1085–1090. doi: 10.1007/s11064-012-0711-7

Saito E, Inoue M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Noda M, Iso H TS (2015) Association of coffee intake with total and cause-specific mortality in a Japanese population: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr* 101:1029–37.

Sakamoto A, Ohnishi ST, Ohnishi T OR (1991) Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res* 554:186–92.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, et al (2010) In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* 9–11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.09.035

Takizawa S, Fukuyama N, Hirabayashi H, et al (2003) Quercetin, a natural flavonoid, attenuates vacuolar formation in the optic tract in rat chronic cerebral hypoperfusion model. *Brain Res* 980:156–160. doi: 10.1016/S0006-8993(03)03009-9

Tunncliffe JM, Shearer J (2008) Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. *Appl Physiol Nutr Metab* 33:1290–1300. doi: 10.1139/H08-123

Vardi N, Parlakpınar H, Ates B (2012) Beneficial effects of chlorogenic acid on methotrexate-induced cerebellar Purkinje cell damage in rats. *J Chem Neuroanat* 43:43–47. doi: 10.1016/j.jchemneu.2011.09.003

Xu JG, Hu QP, Liu Y (2012) Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J Agric Food Chem* 60:11625–11630. doi: 10.1021/jf303771s

Yousuf S, Atif F, Ahmad M, et al (2009) Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res* 1250:242–253. doi: 10.1016/j.brainres.2008.10.068

Zang LY, Cosma G, Gardner H, et al (2003) Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol*

Cell Biochem 247:205–210. doi: 10.1023/A:1024103428348

Zhang LT, Chang CQ, Liu Y, Chen ZM (2011) Effect of chlorogenic acid on disordered glucose and lipid metabolism in db/db mice and its mechanism. Acta Acad Med Sin 33:281–286. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.2011.03.015

Publicación 3:

***Localizing coordinates of cerebral ischemic tissue without the need of staining
in a rat model of focal cerebral infarct***

Metab Brain Dis (2013) 28(1):21-4

DOI 10.1007/s11011-012-9359-x

Silvia Ruiz-Crespo · José M. Trejo-Gabriel-Galán · María Jesús Coma-del-Corra

Resumen

El análisis bioquímico y metabólico del tejido cerebral isquémico es de gran importancia en la investigación sobre el accidente cerebrovascular y por lo general se lleva a cabo en los modelos de accidente cerebrovascular en animales, tales como la oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO) en la rata que hemos utilizado. Para asegurarse de que la muestra es de tejido infartado, la mayoría de trabajos recurren a la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), un método rápido, práctico, barato y fiable, que delimita el infarto cerebral por falta de tinción enzimática del mismo. Tiene sin embargo una limitación para el estudio en tejido cerebral del daño por estrés oxidativo, ya que la reacción de oxidación-reducción que se establece entre el TTC y el tejido, altera los resultados de estas mediciones. Para evitar éste obstáculo, y facilitar futuras investigaciones, se realizó este estudio.

Se provocó el infarto cerebral en una muestra de 10 ratas, mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Los cerebros resultantes fueron cortados en secciones coronales de 2 mm de espesor que fueron teñidos con TTC, de manera que las áreas no teñidas se correspondían a la zona de infarto. Mediante una plantilla se delimitaron en cada sección las zonas en las cuales todos los animales tenían infarto.

Se calcularon las coordenadas de infarto y la profundidad respecto a la superficie de la corteza cerebral en cada una de las secciones que en todos los cerebros estudiados localizaban tejido infartado, de manera que utilizándolas se puede muestrear tejido cerebral infartado sin necesidad de teñirlo. Para mayor precisión, la corteza isquémica puede ser delimitada teñiendo únicamente su superficie antes de seccionar el cerebro y este tejido cortical superficial en el que difunde el TTC puede ser posteriormente descartado, ya que por haberlo medido previamente conocemos la profundidad de difusión del TTC desde la superficie cortical. Presentamos este nuevo modelo para el estudio del daño por estrés oxidativo en el infarto cerebral. Utilizándolo puede disponerse de tejido cerebral infartado evitando tinciones que interfieren las reacciones de oxidación-reducción.

Localizing coordinates of cerebral ischemic tissue without the need of staining in a rat model of focal cerebral infarct

Abstract

Biochemical and metabolic analysis of ischemic cerebral tissue is central in stroke investigation and is usually performed in animal stroke models, such as the permanent occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) in the rat that we have used. To be sure that the sample is from infarct tissue, it is differentiated from the surrounding normal tissue by staining, usually with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), but staining can hamper biochemical colorimetric analysis. We performed this study to avoid this obstacle. A cerebral infarct was provoked in a sample of 10 rats and the brain was cut in coronal sections that were stained with TTC so that the unstained, infarct areas could be delineated in a template of each section in which areas with infarct in all animals were delineated. We calculated infarct coordinates and depth so that the infarct tissue can be sampled without staining. For more precision, the ischemic cortex can be delimited staining its surface before sectioning and cortical tissue into which TTC diffuses can be afterwards discarded, as we had previously

Introduction

Conventional tissue staining with formalin fixation (such as H-E) precludes its biochemical analysis. This has been circumvented through enzymatic staining such as TTC which is also faster. TTC is chemically reduced by most dehydrogenase enzymes, precipitating into a bright red water-insoluble compound. Therefore ischemic tissue lacking these enzymes remains with a whitish unstained color with a clear border with the normal red tissue. In this way irreversibly damaged tissue is delineated (Bederson, et al., 1986) and its border with normal tissue is sharper than with other staining techniques (Isayama, et al., 1991). TTC stains fast, is cheap, convenient and the most used enzymatic technique to delineate brain infarct. As it is based on a redox reaction it precludes the determination of antioxidant levels in the ischemic tissue as well as its study, particularly by spectrophotometric assays. Protein determination by the trichloroacetic method (Karlsson, et al., 1994) is also hampered by TTC staining (Kramer, et al.) Other stains such as Evan's Blue are also known to interfere with spectrophotometric measurements (Mullane, et al., 1985). We describe the spatial coordinates of the cerebral infarct in this model. Using them, only the brain surface needs to be stained, and it can be discarded afterwards, leaving the underlying ischemic unstained tissue to be sampled.

Material and methods

Ten adult male Sprague Dawley rats of between 3 and 6 months of age weighing between 250 and 350g were used in these experiments, being handled according to the rules of "Care of Animal Subjects". They were maintained under standard laboratory conditions with natural dark–light cycle and allowed free access to standard dry rat diet and tap water 'ad libitum' The study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital General Yagüe, Burgos (Spain) in whose Research Unit it was performed.

Surgery protocol

We used a cerebral infarct model (Chen, et al., 1986) consisting of the permanent occlusion of one middle cerebral artery which was performed on the left side of male Sprague-Dawley rats. The rats were anesthetized prior to surgery with 6 mg of Diazepam, 15 mg of Ketamine and 0.3 mg of Atropine. Thirty minutes before middle cerebral artery occlusion (MCAO) the femoral artery was cannulated for arterial pressure control. The middle cerebral artery was ligated at two points by a 10-0 suture and cut in-between to assure permanent occlusion. Next, we ligated both common carotid arteries in the neck with a 5-0 suture (Prieto-Arribas, et al., 2008), the homolateral permanently, and the contralateral for 2.5 hours. Blood pressure, temperature (using a rectal probe) and oxygen saturation (using a non-invasive skin-attached probe) were measured before and immediately after MCAO. Temperature was maintained stable through a heating pad.

Triphenyltetrazolium chloride staining

Twenty-four hours later the rats were deeply anesthetized and sacrificed by decapitation, the brains were extracted, the olfactory bulbs, brainstem and cerebellum discarded, and the hemispheres laid in an "ad hoc" frame and cut into seven (I to VII) 2 mm. thick sections that were immediately immersed in a 2% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC obtained from Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) at 37°C for 30 min, after which each section was photographed on both sides. In each brain section the infarct area was delineated, and the infarct areas of the same section of all the rats were superimposed and drawn in a template of the corresponding section. In each section the area encompassing all infarcts was drawn and inside it, depending on how many sections had an infarct in a part of it, a probability of 10% to 100 % was given (only one infarct or all ten infarcts superimposed in a given part of each of the seven sections). Brain sections were photographed from the same distance, the same settings and a millimeter paper included that allowed measurements to be expressed in mm.

Measurement of sector amplitude and coordinates

In order to measure angles, each brain section was superimposed to an ellipse with a horizontal axis 1.55 longer than the vertical axis both crossing in the center of the brain section and 0° was set in the upper segment of the vertical axis (Figure 1). The diameters were adjusted to match the ellipse size of the brain sections. In this way the sector interval of the infarct and its surface-depth extension has been measured (Table 1).

In a different sample of 2 rats in which cerebral infarct was not provoked, brains were immersed first in the former TTC solution in order to stain only its cortical surface, followed by immersion in saline to eliminate TTC remnants, and after that, cut in seven sections as previously explained, and contrary to the general protocol they were not immersed again in TTC so only the external rim of the cortex was in contact with TTC and therefore was colored in red. The maximal depth of TTC spread from the cortex surface was measured in them.

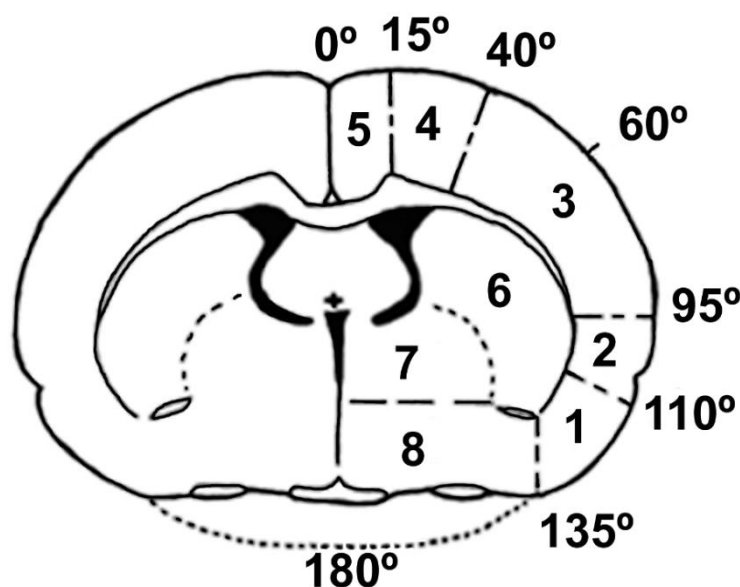


Fig 1. Anatomical areas at the level of the anterior commissure of the rat brain. Area 1, piriform cortex; area 2, insular cortex (granular and agranular); area 3, parietal cortex; area 4, hind- and forelimb areas of cortex; area 5, frontal and cingulate cortex; area 6, caudate putamen; area 7, globus pallidus; area 8, preoptic area (medial and lateral). (Garcia, et al., 1993, Paxinos G, 1986) with permission: Copyright © 2012, American Society for Investigative Pathology. ELSEVIER INC. All rights reserved.

Results

During of MCAO, we observed small variations in blood pressure that never dropped under 80mm Hg.

As seen in Table 1, brain sections number III, IV and V included most infarct tissue. These sections were located between 4 and 10 mm. from the frontal to the posterior ends. Also, smaller standard deviations of the mean of infarct tissue in these sections indicated a more homogeneous infarct area than in more anterior and posterior sections. Brain sections II (between 2 and 4 mm), VI and VII (between 10 and 14 mm.) included smaller and less constant infarct areas, reducing the probability of finding an infarct if sampling tissue in them.

Figure 2 shows staining of all the sections in one rat.



Fig 2. Representative photograph of the sections of a rat brain that had a middle cerebral artery occlusion followed by TTC immersion during 30 minutes at 37°C.

We have also specified the position and extension of the infarct in each section and the probability of finding an infarct there by assimilating the brain to an ellipse. In this model, provoked infarcts are located in the upper cortex and we localize them by a 0-

90° value (considering 0° the vertical axis and 90° the right horizontal axis) and by its depth in mm.

Figure 3 shows the distribution of infarcts in a brain template. In sections I and II there are large infarcts, but only in some rats. Sections III, IV, and V contain not only large but also more constant infarcts: unlike sections I and II, the probability of having infarct in sections III, IV or V is 100%. It can be inferred from Figure 3 that in order to have 80% or more chances of obtaining infarct tissue, sampling is better to be done in the superficial 2 mm. of the cortex: when in sections from 6 to 10 mm. from the frontal pole, at angles between 40° to 80° and in sections 10 to 14 mm from the frontal pole, at angles between 50° to 75°.

As measured in other rats in which a cerebral infarct was not provoked, TTC spreads from the surface of the cortex to a depth of 0.98 mm.

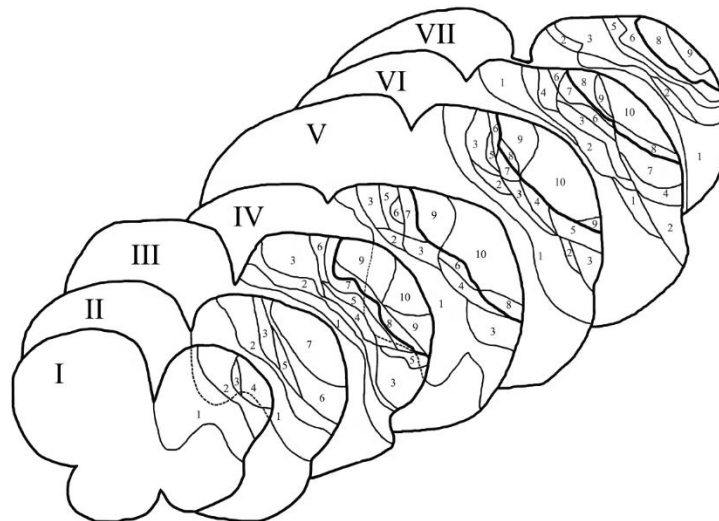


Fig 3. Template of I to VII sections of rat brain in which areas of infarct of 10 rats are overlapped. The numbers in each area indicate how many of the 10 rats have an infarct in that particular area.

The wider line separates the areas in which the probability of sampling infarct tissue is 80% or more, from the rest.

Discussion

We have determined the localizing coordinates of cerebral ischemic tissue stained with TTC and the probabilities of finding ischemic tissue in each of I to VII coronal brain sections in rats in which the middle cerebral artery had been permanently occluded.

In this model, the highest probability of finding ischemic tissue is in coronal sections III, IV and V, each of them of 2 mm. thickness. There was cerebral infarct in these three sections in every rat brain. Therefore, in this 6 mm thickness (from 4 to 10 mm from the frontal pole) the tissue sampled can be expected to be ischemic without the need of staining. Coronal sections anterior to 4 mm. and posterior to 10 mm. have a much lower probability of containing ischemic tissue. By overlapping infarcts in a template, the probabilities of finding ischemic tissue in this way are given. When sampling outside of the given coordinates associated with high probability of infarct, additional normal cerebral brain tissue can be expected in the sample. The anatomical location of the infarct was in the parietal cortex (100% with some infarct) and in large infarcts it extended variably to insular, hind- forelimb areas of cortex and to caudate-putamen (Figure 1). Other studies in which infarct size was large had small variations in location (Memezawa, et al., 1992). When superimposed in an ellipse, infarcts were located in the right-superior sector, from 25.5° to 96° (most superior and most inferior extensions). The sector amplitude averaged 63° (Table 1), and infarct extended from the cortical surface to an average depth of 2.1 mm. The infarcts were more constant at the 60° angle (intersected more infarct areas). At this angle the probability of finding an infarct is given in sections I to VII, in Table 1. All coordinates of the cerebral infarcts are given in Table 1.

In this way, in experiments that may be interfered by staining substances, tissue sampling can be done with a high probability of including ischemic tissue without the need of staining it. When needing maximal certainty but less tissue, the whole brain can be immersed in TTC and after clearing all the TTC remnants, the brain can be cut in seven 2 mm. coronal sections. As infarcts in this model include the cortex, the surface of the coronal sections including infarct will have unstained-ischemic areas. Then the external 0.98 mm can be discarded (see above) and the underlying cortex

could be sampled in the appropriate depth according to Table 1. A limitation of this study is that its results are only valid in this model of experimental ischemia and in rats of this weight and age. For this reason, we have localized the infarct tissue by angles and percentages, that can be more flexibly applied than absolute measures, more variable with changes in size.

Table 1. Coordinates to locate the infarct in each brain section (Standard Deviation)

	Angle sector occupied by infarct (°)	Angle sector amplitude (°)	Distance to frontal pole (mm)	Radius at 60° (mm)	Depth of infarction (mm)	Percentage of infarct at 60° and at former infarct depth (%)
Section I	26,3 - 90	64 (32)	2	5.2 (0.4)	2.2 (2.2)	40
Section II	27 - 90	63 (24.8)	4	6.1 (0.7)	2.3 (1.5)	70
Section III	25,5 - 93	68 (27)	6	6.4 (1.9)	2.1 (1)	100
Section IV	26,5 - 96	69.5 (23.1)	8	6.3 (2.6)	2.5 (1.4)	100
Section V	30 - 91	61.5 (19.4)	10	7 (1.8)	2.6 (0.8)	100
Section VI	32 - 92,5	60.5 (25.1)	12	6.4 (2.5)	1.6 (0.7)	100
Section VII	36,7 - 91	54.4 (21.7)	14	6.6 (2.9)	1.4 (0.8)	80

Conclusions

Following this protocol in a rat model of cerebral infarct there is high probability of sampling ischemic cerebral tissue without needing to stain it, avoiding possible interferences of staining in metabolic studies.

References

1. Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., and Bartkowski, H. M., 1986. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17, 1304-1308.
2. Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H., and Balentine, J. D., 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17, 738-743.
3. Garcia, J. H., Yoshida, Y., Chen, H., Li, Y., Zhang, Z. G., Lian, J., Chen, S., and Chopp, M., 1993. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142, 623-635.
4. Isayama, K., Pitts, L. H., and Nishimura, M. C., 1991. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke* 22, 1394-1398.
5. Karlsson, J. O., Ostwald, K., Kabjorn, C., and Andersson, M., 1994. A method for protein assay in Laemmli buffer. *Anal Biochem* 219, 144-146.
6. Kramer, M., Dang, J., Baertling, F., Denecke, B., Clarner, T., Kirsch, C., Beyer, C., and Kipp, M., TTC staining of damaged brain areas after MCA occlusion in the rat does not constrict quantitative gene and protein analyses. *J Neurosci Methods* 187, 84-89.
7. Memezawa, H., Smith, M. L., and Siesjo, B. K., 1992. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23, 552-559.
8. Mullane, K. M., Kraemer, R., and Smith, B., 1985. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 14, 157-167.
9. Paxinos G, W. C., 1986. *The rat brain in Stereotactic Coordinates*, ed 2. New York, Academic Press, 1986.
10. Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Garvi, J. M., Matías-Guiu, J., Roda, J. M., and Barcia-Albacar, J. A., 2008. Experimental models of cerebral ischemia. *Modelos experimentales de isquemia cerebral* 47, 414-426.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los resultados de la Tesis Doctoral que estudian el tratamiento del infarto cerebral en animales de experimentación con el compuesto fenólico, ácido 3-cafeoilquínico, se resumen a continuación;

Es bien conocido el efecto preventivo del consumo de alimentos con compuestos bioactivos con capacidad antioxidante -como los compuestos fenólicos- sobre la aterosclerosis y sus consecuencias: infarto de miocardio e infarto cerebral. Sin embargo, el efecto de sus componentes bioactivos puros sobre el tejido cerebral durante las horas en las que se está produciendo el infarto es menos conocido. Por ello el objetivo de esta tesis doctoral es conocer mejor el efecto de un componente antioxidante presente en el café, el ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), sobre el infarto cerebral mientras se está desarrollando y su implicación sobre biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo. Para ello, en el primer trabajo se utilizó un modelo de infarto cerebral en la rata y se trató intraperitonealmente con el 3-CQA.

El resultado principal fue que después de producir el infarto cerebral, en los animales que recibieron la dosis más alta de 3-CQA hubo un aumento de capacidad antioxidante plasmática respecto a los controles no tratados, sin observarse cambios significativos en el contenido en polifenoles totales, ni el volumen de infarto. En el segundo trabajo se seleccionaron dos de las concentraciones de tratamiento con 3-CQA y se optimizó el protocolo quirúrgico para generar el infarto cerebral. El tratamiento con 3-CQA en este estudio resultó en una disminución del volumen de infarto cerebral respecto a los controles y se observó una disminución del biomarcador de daño oxidativo de lípidos, "malondialdehído plasmático" pero no hubo cambios en el marcador de daño oxidativo a proteínas "grupos carbonilo", sugiriendo un efecto antioxidante protector de lípidos pero no de proteínas durante el infarto cerebral.

El último de los objetivos de esta tesis, fue diseñar un método que permitiese realizar estudios en el propio tejido cerebral infartado ya que hasta el momento ello no era posible debido a que para localizar el tejido infartado era necesario teñirlo previamente con compuestos que interfieren con las determinaciones de análisis para estudio del estrés oxidativo. Por ello fue desarrollado un nuevo modelo que lo hace

posible, localizando el tejido cerebral infartado a muestrear en base a coordenadas, sin necesidad de teñirlo.

De estos resultados puede concluirse que en un modelo de infarto cerebral experimental, el componente del café, ácido 3-cafeoilquinico (3-CQA), y respecto a controles que no lo han recibido, produce los siguientes efectos:

- 1- El tratamiento con dosis de 100 μg de 3-CQA aumenta la capacidad antioxidante del plasma.
- 2- El tratamiento con ácido 3-cafeoilquinico a dosis de 4 y de 25 μg reduce el volumen de infarto cerebral experimental y el daño oxidativo a los lípidos en el plasma pero no parece disminuir el daño a proteínas.
- 3- Se desarrolló un modelo experimental para el estudio del daño por estrés oxidativo en el infarto cerebral, que permite obtener tejido cerebral infartado localizándolo mediante coordenadas y evitando tinciones que interfieren las reacciones de oxidación reducción.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abilleira Castells S, Alonso Coello P, Álvarez Sabín J, Armario García P, Arrieta Antón E, Borrás Pérez FX, Gil Núñez A, Marañón Fernández E, Martí Canales JC, Morales Ortiz A, Reverter Calatayud JC, Rigau Comas D, Sancristóbal Velasco E, and Solà Arnau I (2008) Guía de Práctica clínica sobre la Prevención Primaria y Secundaria del Ictus. Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC.
- Ahn E, Kim D, Shin M, Kwon S, Kim Y, Kim D, Lim S, Kim J, Park J, Eum W, Hwang H, and Choi S (2011) Chlorogenic Acid Improves Neuroprotective Effect of PEP-1-Ribosomal Protein S3 Against Ischemic Insult. *Exp Neurobiol* 20:169–75.
- Ahn EH, Kim DW, Shin MJ, Kwon SW, Kim YN, Kim D-S, Lim SS, Kim J, Park J, Eum WS, Hwang HS, and Choi SY (2011) Chlorogenic Acid Improves Neuroprotective Effect of PEP-1-Ribosomal Protein S3 Against Ischemic Insult. *Exp Neurobiol* 20:169.
- Allen C, and Bayraktutan U (2008) Risk factors for ischaemic stroke. *Int J Stroke* 3:105–16.
- Allen CL, and Bayraktutan U (2009) Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 4:461–470.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Ozyürek M, Celik S, Bektaşoğlu B, Berker K, and Ozyurt D (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12:1496–547.
- Arboix A (2015) Cardiovascular risk factors for acute stroke: Risk profiles in the different subtypes of ischemic stroke. *World J Clin Cases* 3:418–29.
- Arboix A, and Alió J (2010) Cardioembolic stroke: clinical features, specific cardiac disorders and prognosis. *Curr Cardiol Rev* 6:150–161.
- Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, and Álvarez Sabin J (2006) ICTUS:TIPOS ETIOLÓGICOS Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS, in *Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus*.
- Arboix A, Milian M, Oliveres M, García-Eroles L, and Massons J (2006) Impact of female gender on prognosis in type 2 diabetic patients with ischemic stroke. *Eur Neurol* 56:6–12.
- Arenillas J, Moro M, and Dávalos A (2007) The metabolic syndrome and stroke: potential treatment approaches. *Stroke* 38:2196–2203.
- Armario P, Pintoc X, Soler C, and Cardona P (2015) Prevención secundaria del ictus isquémico no cardioembólico. *Clin Invest Arter*.
- Arnao M, and Hernández-Ruiz J (2006) The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal Behav* 1:89–95.

- Aronowski J, Strong R, Shirzadi A, and Grotta JC (2003) Ethanol Plus Caffeine (Caffeinol) for Treatment of Ischemic Stroke Preclinical Experience. *Stroke* 34:1246–1251.
- Artinian NT, Fletcher GF, Mozaffarian D, Kris-Etherton P, Van Horn L, Lichtenstein AH, Kumanyika S, Kraus WE, Fleg JL, Redeker NS, Meininger JC, Banks J, Stuart-Shor EM, Fletcher BJ, Miller TD, Hughes S, Braun LT, Kopin L a, Berra K, Hayman LL, Ewing LJ, Ades P a, Durstine JL, Houston-Miller N, and Burke LE (2010) Interventions to promote physical activity and dietary lifestyle changes for cardiovascular risk factor reduction in adults: a scientific statement from the American Heart Association. *J Am Heart Assoc* 122:406–41.
- Arzt M, Young T, Finn L, Skatrud JB, and Bradley TD (2005) Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1447–1451.
- Atrial Fibrillation Investigators (1997) The efficacy of aspirin in patients with atrial fibrillation. Analysis of pooled data from 3 randomized trials. The Atrial Fibrillation Investigators. *Arch Intern Med* 157:1237–1240.
- Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, and Terao J (2000) Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 48:5496–5500.
- Babior B (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464–76.
- Bahadoran Z, Golzarand M, Mirmiran P, Shiva N, and Azizi F (2012) Dietary total antioxidant capacity and the occurrence of metabolic syndrome and its components after a 3-year follow-up in adults: Tehran Lipid and Glucose Study. *Nutr Metab* 9:70.
- Baradaran A, Nasri H, and Rafieian-Kopaei M (2014) Oxidative stress and hypertension: Possibilit of hypertension therapy with antioxidaants. *J Res Med Sci* 19:358–367.
- Battelli M, and Polito L (2014) Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis* 237:562–7.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, and Bartkowski HM (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304–1308.
- Belvis R, and Martí-Vilalta J (2012) Factores de riesgo. Prevención. En: Enfermedades vasculares cerebrales.
- Benjamin C, Luiz T, and Paul F (2003) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*.

- Benzie IF, and Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70–76.
- Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, and Vinson J (2007) Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res* 55:187–198.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, and Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28:25–30.
- Brott T, Adams HJ, Olinger C, Marler J, Barsan W, Biller J, and Al. E (1989) Measurement of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 20:864–870.
- Brott T, Hobson R, Howard G, Roubin G, Clark W, Brooks W, and Al. E (2010) Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 363:11–23.
- Bulló M, Juanola-Falgarona, M Hernández-Alonso P, and Salas-Salvadó J (2015) Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *Br J Nutr* 113:S79–93.
- Burns D (2003) Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 46:11–29.
- Cantu-Medellin N, and Kelley E (2013) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol* 1:353–8.
- Cao G, Alessio H, and Cutler R (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 14 (3):303–11.
- Carocho M, and Ferreira I (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51:15–25.
- Chang W, Dao J, and Shao Z (2005) Hawthorn: Potential roles in cardiovascular disease. *Am J Chin Med* 33:1–10.
- Chauhan P, Satti N, Sharma P, Sharma V, Suri K, and Bani S (2012) Differential effects of chlorogenic acid on various immunological parameters relevant to rheumatoid arthritis. *Phytother Res* 26:1156–65.
- Chen J, Wu Y, Tao Z, Chen Z, and Liu X (1995) Hawthorn (shan zha) drink and its lowering effect on blood lipid levels in humans and rats. *World Rev Nutr Diet* 77:147–54.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, and Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738–743.

- Chen ZY, Peng C, Jiao R, Wong YM, Yang N, and Huang Y (2009) Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem* 57:4485–4499.
- Companioni Gásquez M (1995) Acido araquidonico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Rev Cuba Invest Biomed* 14.
- Conner E, and Grisham M (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12:274–7.
- Connolly S, Eikelboom J, Joyner C, Diener H, Hart R, Golitsyn S, and Al. E (2011) Apixaban in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 364:2362–2363; author reply 2363–2364.
- Corte E, and Stirpe F (1972) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J* 126:739–45.
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, and Chang LY (1992) Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10405–10409.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, and Remesy C (2002) Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem* 50:618–21.
- Crozier A, Jaganath IB, and Clifford MN (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 26:1001–1043.
- De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, and Vermeulen NPE (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 26:202–226.
- Dearborn JL, Urrutia VC, and Kernan WN (2015) The case for diet: a safe and efficacious strategy for secondary stroke prevention. *Front Neurol* 6:1.
- Del Rio D, Calani L, Scazzina F, Jechiu L, Cordero C, and Brighenti F (2010) Bioavailability of catechins from ready-to-drink tea. *Nutrition* 26:528–33.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer J, Tognolini M, Borges G, and Crozier A (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Signal* 18:1818–92.
- Descamps-Latscha B, Drüeke T, and Witko-Sarsat V (2001) Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial* 14(3):193–9.
- Dichgans M (2007) Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 6:149–161.

- Diez Tejedor E (2006) Sociedad Española de Neurología, in *Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus*.
- Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, and Abiusi G (2001) Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol* 33:455–464.
- Easton JD, Albers GW, Caplan LR, Saver JL, and Sherman DG (2004) Discussion: Reconsideration of TIA terminology and definitions. *Neurology* 62:S29–S34.
- European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee (2003) 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21:1011–1053.
- Evans M., Dizdarogly M, and Cooke M. (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567:1–61.
- Expert Panel on Detection, Evaluation and T of HBC in A (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2486–2497.
- Extrasynthese (n.d.) <http://www.extrasynthese.com/products-catalog/orga>.
- Feigin V, Parag V, Lawes CMM, Rodgers A, Suh I, Woodward M, Jamrozik K, and Ueshima H (2005) Smoking and Elevated Blood Pressure Are the Most Important Risk Factors for Subarachnoid Hemorrhage in the Asia-Pacific Region. *Stroke* 36:1360–1365.
- Fenny D, González A, and Law W (1982) Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science (80-)* 27:855–857.
- Ferruzzi M (2010) The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiol Behav* 100:33–41.
- Flora S (2009) Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and mettaloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2:191–206.
- Flynn JM, and Melov S (2013) SOD2 in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* 62.
- Fogliano V, Verde V, Randazzo G, and Ritieni A (1999) Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. *J Agric Food Chem* 47:1035–1040.
- Frank-Cannon T, Alto L, McAlpine F, and Tansey M (2009) Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 4:47.

- Freedman N, Park Y, Abnet C, Hollenbeck A, and Sinha R (2012) Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *N Engl J Med* 366:1891–904.
- Fung TT, Stampfer MJ, Manson JE, Rexrode KM, Willett WC, and Hu FB (2004) Prospective study of major dietary patterns and stroke risk in women. *Stroke* 35:2014–2019.
- Furie KL, Kasner SE, Adams RJ, Albers GW, Bush RL, Fagan SC, Halperin JL, Johnston SC, Katzan I, Kernan WN, Mitchell PH, Ovbiagele B, Palesch YY, Sacco RL, Schwamm LH, Wassertheil-Smoller S, Turan TN, and Wentworth D (2011) Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* 42:227–276.
- Gaciong Z, Siński M, and Lewandowski J (2013) Blood pressure control and primary prevention of stroke: Summary of the recent clinical trial data and meta-analyses. *Curr Hypertens Rep* 15:559–574.
- Gee J, Du Pont M, Rhodes M, and Johnson I (1998) Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med* 25:19–25.
- Ghisellia A, Serafinia M, Natellaa F, and Scaccinia C (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 29:1106–1114.
- Gil A (2010) *Tratado de nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición.*
- Glantzounis G, Tsimoyiannis E, Kappas A, and Galaris D (2005) Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 11:4145–51.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EL, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ (2014) Heart disease and stroke statistics - 2014 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 129:e28–e292.
- Goff DJ, Lloyd-Jones D, Bennett G, Coady S, D'Agostino RS, Gibbons R, Greenland P, Lackland D, Levy D, O'Donnell C, Robinson J, Schwartz J, Shero S, Smith S, Sorlie P, Stone N, and Wilson P (2014) 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 63:2935–59.
- Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, DeGraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JVI, and Sacco RL (2006) Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group. *Stroke J American Hear Assoc* 113:e873–923.

- Góngora-Alfaro JL (2010) Caffeine as a preventive drug for Parkinson's disease: epidemiologic evidence and experimental support. *Rev Neurol* 50:221–229.
- Gonthier M-P, Verny M-A, Besson C, Rémésy C, and Scalbert A (2003) Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 133:1853–1859.
- Grace S, Logan B, and Adams W (1998) Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid anti-oxidant, in *Mahonia repens*. *Plant, Cell Environ* 21:513–521.
- Grande L, Roselló-Catafau J, and Peralta C (2006) Ischemic preconditioning of the liver: from molecular bases to clinical application. *Cir Esp* 80:275–282.
- Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro a. M, Nascimento PC, Pomblum VJ, and Garcia SC (2007) Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 43:619–624.
- Grysiewicz R a, Thomas K, and Pandey DK (2008) Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin* 26:871–95, vii.
- Gustafson D (2006) Adiposity indices and dementia. *Lancet Neurol* 5:713–720.
- Gutteridge J (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91:133–40.
- Halliwell B (1997) Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55.
- Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721–4.
- Halliwell B, and Gutteridge J (1989) Free radical in biology and Medicine. *Oxford, Clarendon* 1:142.
- Halliwell B, Gutteridge J, and Cross C (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119:598–620.
- Handy D, and Loscalzo J (2012) Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal* 16:1323–67.
- Hayes J, Flanagan J, and Jowsey I (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51–88.
- Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, Comp P, Grammas P, Hamdheydari L, Mou S, Pye QN, Stoddard MF, Wallis G, Williamson KS, West M, Wechter WJ, and Floyd R a. (2004) New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and

- carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 36:1–15.
- Herrmann K (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28:315–47.
- Hertog M, Feskens E, Hollman P, Katan M, and Kromhout D (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342:1007–11.
- Hu D, Huang J, Wang Y, Zhang D, and Qu Y (2014) Fruits and vegetables consumption and risk of stroke: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Stroke* 45:1613–9.
- Huang D, Ou B, and Prior R (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841–1856.
- Instituto Nacional de Estadística (2012) Defunciones según la causa de muerte.
- Iwaoka E, Noguchi T, Han J-Y, Lin X-P, and Gao M (2007) Preventive Effect of the Chinese Herbal Medicine “Myakuryu” on Hypertension and Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:S51–S52.
- Jacob KD, Noren Hooten N, Trzeciak AR, and Evans MK (2013) Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev* 134:139–157.
- Jacob R, and Sotoudeh G (2002) Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care* 5:66–74.
- Jae-Chul L, and Moo-Ho W (2014) Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils. *Anat Cell Biot* 47:149–156.
- Jia Q, Zhao X, Wang C, Wang Y, Yan Y, Li H, Zhong L, Liu L, Zheng H, Zhou Y, and Wang Y (2011) Diabetes and poor outcomes within 6 months after acute ischemic stroke: the China National Stroke Registry. *Stroke* 42:2758–62.
- Joët T, Salmona J, Laffargue A, Descroix F, and Dussert S (2010) Use of the growing environment as a source of variation to identify the quantitative trait transcripts and modules of co-expressed genes that determine chlorogenic acid accumulation. *Plant, Cell Environ* 33:1220–1233.
- Johnson E, Lanes S, Wentworth C, Satterfield M, Abebe B, and Dicker L (1999) A meta-regression analysis of the dose-response effect of aspirin on stroke. *Arch Intern Med*. *Arch Intern Med* 159:1248–1253.
- Joshi KJ, Ascherio a, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Hennekens CH, Spiegelman D, and Willett WC (1999) Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA* 282:1233–1239.

- Jurikova T, Sochor J, Rop O, Mlcek J, Balla S, Szekeres L, Adam V, and Kizek R (2012) Polyphenolic profile and biological activity of chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) fruits. *Molecules* 17:14490–14509.
- Kasote D, Katyare S, Hegde M, and Bae H (2015) Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *Int J Biol Sci* 11:982–91.
- Kennedy D, Wightman E, Reay J, Lietz G, Okello E, Wilde A, and Haskell C (2010) Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebocontrolled, crossover investigation. *Am J Clin Nutr* 91:1590–7.
- Kennedy DO (2014) Polyphenols and the Human Brain: Plant “Secondary Metabolite” Ecologic Roles and Endogenous Signaling Functions Drive Benefits. *Adv Nutr* 5:515–533.
- Kernan WN, Inzucchi SE, Sawan C, MacKo RF, and Furie KL (2013) Obesity: A stubbornly obvious target for stroke prevention. *Stroke* 44:278–286.
- Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, Fang MC, Fisher M, Furie KL, Heck D V, Johnston CC, Kasner SE, Kittner SJ, Mitchell PH, Michael W, Richardson D, Schwamm LH, and Wilson J a (2014) Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke* 45:2160–236.
- Kim H, Lee D, Lee S, Seong A, Gin D, Hwang J, and Park J (2010) Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in an ovalbumin-induced allergic asthma: activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid. *Int Immunopharmacol* 10:1242–8.
- Klein R, and Klein BE (1998) Relation of glycemic control to diabetic complications and health outcomes. *Diabetes Care* 21 Suppl 3:C39–C43.
- Klein S, Burke LE, Bray G a., Blair S, Allison DB, Pi-Sunyer X, Hong Y, and Eckel RH (2004) Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: A statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 110:2952–2967.
- Kohen R (1999) Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother* 53:181–192.
- Kohen R, and Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30:620–50.
- Kojo S (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 11(8):1041–64.

- Kokubo Y, Iso H, Saito I, Yamagishi K, Yatsuya H, Ishihara J, Inoue M, and Tsugane S (2013) The impact of green tea and coffee consumption on the reduced risk of stroke incidence in Japanese population: the Japan public health center-based study cohort. *Stroke* 44:1369–74.
- Konigsberg Fainstein M (2008) *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.*
- Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, and Shibata H (1997) Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1335:335–342.
- Kulcharyk P, and Heinecke J (2001) Hypochlorous acid produced by the myeloperoxidase system of human phagocytes induces covalent cross-links between DNA and protein. *Biochemistry* 40:3648–56.
- Lang R, Dieminger N, Beusch A, Lee Y, Dunkel A, Suess B, Skurk T, Wahl A, Hauner H, and Hofmann T (2013) Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption. *Anal Bioanal Chem* 405:8487–503.
- Lavados PM, Sacks C, Prina L, Escobar A, Tossi C, Araya F, Feuerhake W, Galvez M, Salinas R, and Alvarez G (2005) Incidence, 30-day case-fatality rate, and prognosis of stroke in Iquique, Chile: a 2-year community-based prospective study (PISCIS project). *Lancet* 365:2206–15.
- Law M, Morris J, and Wald N (2009) Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ* 338:b1665.
- Lee D, Folsom A, and Blair S (2003) Physical activity and stroke risk. A meta-analysis. *Stroke* 34:2475–81.
- Lee J, Park J, Kim Y, and Han Y (2008) Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol* 8:1681–5.
- Levine R, Garland D, Oliver C, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B, Shaltiel S, and Stadtman E (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzym* 186:464–78.
- Lobo V, Phatak A, and Chandra N (2010) Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4:118–126.
- Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB, and Van Dam RM (2009) Coffee consumption and risk of stroke in women. *Circulation* 119:1116–1123.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr a. L, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Madian AG, and Regnier FE (2010) Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res* 9:3766–3780.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, and Jiménez L (2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727–747.
- Mancia G (2007) Optimal control of blood pressure in patients with diabetes reduces the incidence of macro- and microvascular events. *J Hypertens Suppl* 25:S7–S12.
- Marniemi J, Alanen E, Impivaara O, Seppanen R, Hakala P, Rajala T, and Ronnema T (2005) Dietary and serum vitamins and minerals as predictors of myocardial infarction and stroke in elderly subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15:188–97.
- Martínez-González M, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, and Ros E (2015) PREDIMED INVESTIGATORS Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis* 58:50–60.
- Martínez-Vila E, Murie Fernández M, Pagola I, and Irimia P (2011) Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine (Baltimore)* 10:4871–4881.
- Marzocchi G (2015) <http://institutovalencianodeozonoterapia.com/estres-oxidativo/>.
- Matill HA (1947) Antioxidants. *Ann Rev Biochem* 16:177–192.
- McBride R (1994) Warfarin versus aspirin for prevention of thromboembolism in atrial fibrillation: Stroke prevention in atrial fibrillation II study. *Lancet* 343:687–691.
- Melatonin. Monograph. (2005) . *Altern Med Rev* 10:326–36.
- Menzies S, Hoff J, and Betz A (1992) Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 31:100–107.
- Mikami Y, and Yamazawa T (2015) Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci* S0024-3205:00441–5.
- Miller D, Buettner G, and Aust S (1990) Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med* 8:95–108.
- Miller NJ, and Rice-Evans CA (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res* 26:195–199.
- Ministerio de Sanidad y Política Social (2009) *Estrategia en Ictus del Sistema Nacional de Salud*.

- Mirmiran P, Noori N, Zavareh M, and Azizi F (2009) Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease. *Metabolism* 58:460–8.
- Montagnana M, Favalaro EJ, and Lippi G (2012) Coffee intake and cardiovascular disease: Virtue does not take center stage. *Semin Thromb Hemost* 38:164–177.
- Montaner J (2008) *Prevención del ictus isquémico*.
- Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, and Donangelo C (2007) Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr* 137:2196–2201.
- Nathan C, and Xie Q (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915–8.
- National Cholesterol Education THProgram (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and T of HBC in A (Adult TPI (2002) Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 106:3143–421.
- Negishi H, Onobayashi Y, Xu J-W, Njelekela M, Kobayakawa A, Yasui N, Yamamoto J, Ikami T, Ikeda K, and Yamori Y (2007) Effects of prune extract on blood pressure elevation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:S47–S48.
- Ong KW, Hsu A, and Tan BKH (2013) Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochem Pharmacol* 85:1341–1351.
- Ong KW, Hsu A, and Tan BKH (2012) Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: A contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. *PLoS One* 7.
- Ovaskainen M-L, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, and Mattila P (2008) Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. *J Nutr March* 138:562–566.
- Ozçelik B, Kartal M, and Orhan I (2011) Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol* 49:396–402.
- Ozyürek M, Bektaşoğlu B, Güçlü K, and Apak R (2008) Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal Chim Acta* 616:196–206.
- Packer JE, Slater TF, and Willson RL (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278:737–738.

- Parra O, Arboix a., Montserrat JM, Quintó L, Bechich S, and García-Eroles L (2004) Sleep-related breathing disorders: Impact on mortality of cerebrovascular disease. *Eur Respir J* 24:267–272.
- Patel M, Mahaffey K, Garg J, Pan G, Singer D, Hacke W, and Al. E (2011) Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 365:883–91.
- Peters R, Peters J, Warner J, Beckett N, and Bulpitt C (2008) Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systematic review. *Age Ageing* 37:505–12.
- Pietta P (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035–1042.
- Pisoschi A, and Pop A (2005) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 97:55–74.
- Poirier P (2006) Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss: An Update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease From the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. *Circulation* 113:898–918.
- Pokorny J, Yanishlieva N, and Gordon M (2005) *Antioxidantes de los alimentos: Aplicaciones prácticas*.
- Polívka J, Rohan V, Sevčík P, and Polívka JJ (2014) Personalized approach to primary and secondary prevention of ischemic stroke. *EPMA J* 5:9.
- Pulido R, Hernández-García M, and Saura-Calixto F (2003) Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 57:1275–1282.
- Putaala J, Haapaniemi E, Matseo A, Metso T, Artto V, Kaste M, and Tatlisumak T (2010) Recurrent ischemic events in young adults after first-ever ischemic stroke. *Ann Neurol* 68:661–71.
- Qin H, Shi Y, Liu Z, Li Z, Wang H, Wang H, and Liu Z (2010) Effect of chlorogenic acid on mast cell-dependent anaphylactic reaction. *Int Immunopharmacol* 10:1135–41.
- Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical Interventions in Aging. *Clin Interv Aging* 2:219–36.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–7.
- Ren J, Jiang X, and Li C (2007) Investigation on the absorption kinetics of chlorogenic acid in rats by HPLC. *Arch Pharm Res* 30:911–6.

- Rerkasem K, and Rothwell P (2011) Carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. The Cochrane database of systematic reviews. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD001081.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, and Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933–956.
- Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, and Packer L (1999) Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr* 52:203–22.
- Ringleb P a, Bousser M-G, Ford G, Bath P, Brainin M, Caso V, Cervera A, Chamorro A, Cordonnier C, Csiba L, Davalos A, Diener H-C, Ferro J, Hacke W, Hennerici M, Kaste M, Langhorne P, Lees K, Leys D, Lodder J, Markus HS, Mas J-L, Mattle HP, Muir K, Norrving B, Obach V, Paolucci S, Ringelstein EB, Schellinger PD, Sivenius J, Skvortsova V, Sunnerhagen KS, Thomassen L, Toni D, Von Kummer R, Wahlgren NG, Walker MF, and Wardlaw J (2008) Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis* 25:457–507.
- Rothwell PM, Howard SC, and Spence JD (2003) Relationship between blood pressure and stroke risk in patients with symptomatic carotid occlusive disease. *Stroke* 34:2583–2590.
- Sacco R, Benjamin E, Broderick J, Dyken M, Easton J, Feinberg W, Goldstein L, Gorelick P, Howard G, Kittner S, Manolio T, Whisnant J, and Wolf P (1997) American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke* 7:1507–17.
- Saito E, Inoue M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Noda M, Iso H, and Tsugane S (2015) Association of coffee intake with total and cause-specific mortality in a Japanese population: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr* 101:1029–37.
- Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, and Iseki K (2011) In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* 403:136–8.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, and Rémésy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56:276–282.
- Scalbert A, and Williamson G (2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr* 130:2073S—2085S.
- Schoenberg M, Fredholm B, Haglund U, Jung H, Sellin D, Younes M, and Schildberg F (1985) Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol Scand* 124:581–9.

- Sedlak T, and Snyder S (2004) Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* 113:1776–82.
- Serafini M, Maiani G, and Ferro-Luzzi a (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* 128:1003–1007.
- Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, and Paudyal B (2014) Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 21:23.
- Shichiri M (2014) The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr* 54:151–60.
- Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27:916–21.
- Sies H (1985) Oxidative Stress: Introductory Remarks.
- Singleton V, and Rossi J (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158.
- Singleton V, and Rossi JJ (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158.
- Smajlović D (2015) Strokes in young adults: epidemiology and prevention. *Vasc Heal Risk Manag* 11:157–64.
- Sobrino García P, García Pastor A, García Arratibel A, Vicente Peracho G, Rodriguez Cruz P, Pérez Sánchez J, Díaz Otero F, Vázquez Alén P, Villanueva Osorio J, and Gil Núñez A (2013) Aetiological classification of ischaemic strokes: comparison of the new A-S-C-O classification and the classification by the Spanish Society of Neurology's Cerebrovascul. *Neurologia* 28:417–424.
- Sonderer J, and Katan Kahles M (2015) Aetiological blood biomarkers of ischaemic stroke. *Swiss Med Wkly* 145:w14138.
- Spencer J (2010) The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br J Nutr* 104:S40–7.
- Stadtman E (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22–38.
- Stampfer M, Hennekens C, Manson J, Colditz G, Rosner B, and Willett W (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 328:1444–9.
- Staniek K, and Nohl H (1999) H₂O₂ detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *Biochim Biophys Acta* 1413:70–80.

- Strazzullo P, D'Elia L, Kandala N, and Cappuccio F (2009) Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 339:b4567.
- Sullivan L, and Chandel N (2014) Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* 2:17.
- Szocs K (2004) Review Endothelial Dysfunction and Reactive Oxygen Species Production in Ischemia/Reperfusion and Nitrate Tolerance. *Gen Physiol Biophys* 23:265–295.
- Trejo Gabriel y Galán JM (1996) Influencia de las modificaciones de la glucemia y de la hipotermia en el volumen de infarto cerebral en la rata, Universidad Complutense de Madrid.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, and La Guardia M (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 18:98–112.
- Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2:1231–1246.
- United States Surgeon General (2004) The 2004 United States Surgeon General's Report: The Health Consequences of Smoking. *N S W Public Health Bull* 15:107.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, and Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84.
- Van Lieshout M, West C, Muhilal, Permaesih D, Wang Y, Xu X, Van Breemen R, Creemers A, Verhoeven M, and Lugtenburg J (2001) Bioefficacy of beta-carotene dissolved in oil studied in children in Indonesia. *Am J Clin Nutr* 73:949–958.
- Vassalle C, Pingitore A, De Giuseppe R, Vigna L, and Bamonti F (2015) Biomarkers Part II: Biomarkers to Estimate Bioefficacy of Dietary/Supplemental Antioxidants in Sport.
- Vega Alonso A, Zurriaga Llorens O, Galmés Truyols A, Lozano Alonso J, Paisán Maestro L, Gil Costa M, Herrero Llorente A, and Ramos Aceitero JG of R for the RP (2006) Health sentinel networks in Spain. Consensus for a guide of principles and methods. *Gac Sanit* 20:496–502.
- Vega T, Zurriaga O, Ramos JM, Gil M, Álamo R, Lozano JE, López A, Miralles MT, Vaca P, and del Mar Alvarez M (2009) Stroke in Spain: Epidemiologic Incidence and Patterns; A Health Sentinel Network Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 18:11–16.
- Visioli F (2000) Antioxidants in Mediterranean diets. *World Rev Nutr Diet* 87:43–55.

- Von Sonntag C (2006) *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair - A Chemical Perspectiva*.
- Wang Y, and Ho C (2009) Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem* 57:8109–14.
- Warburton D, Nicol C, and Bredin S (2006) Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 174:801–9.
- Weir N, and Dennis M (1997) Meeting the challenge of stroke. *Scott Med J* 42:145–7.
- Widmer R, Flammer A, Lerman L, and Lerman A (2015) The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *Am J Med* 128:229–38.
- Willcox J, Ash S, and Catignani G (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:275–95.
- Williams R, and Spencer J (2012) Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for alzheimer disease. *Free. Radic Biol Med* 52:35–45.
- Yoshida Y, Hayakawa M, and Niki E (2008) Evaluation of the antioxidant effects of coffee and its components using the biomarkers hydroxyoctadecadienoic acid and isoprostane. *J Oleo Sci* 57:691–697.
- Young A, and Lowe G (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 382:20–27.
- Zhang LT, Chang CQ, Liu Y, and Chen ZM (2011) Effect of chlorogenic acid on disordered glucose and lipid metabolism in db/db mice and its mechanism. *Acta Acad Med Sin* 33:281–286.
- Zhang Z, Ho WKK, Huang Y, and Chen Z-Y (2002) Hypocholesterolemic activity of hawthorn fruit is mediated by regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase and acyl CoA: Cholesterol acyltransferase. *Food Res Int* 35:885–891.
- Zhao Z, Shin H, Satsu H, Totsuka M, and Shimizu M (2008) 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF-alpha-induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 56:3863–8.

