



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Efecto Protector del Té Blanco Frente al Estrés
Oxidativo Agudo en Ratas.
Mecanismos Genéticos y Moleculares

D. Cristóbal Espinosa Ruiz

2015



UNIVERSITY OF MURCIA

FACULTY OF MEDICINE

Protective effect of white tea against acute oxidative stress in rats.

Genetics and molecular mechanisms.

D. Cristóbal Espinosa Ruiz

2015

Directores

Dr. José Ángel López Jiménez, Profesor Titular (Universidad de Murcia, España)

Dra. Francisca Pérez Llamas, Profesora Titular (Universidad de Murcia, España)

When you make the finding yourself – even if you’re the last person on Earth to see the
light – you’ll never forget it.

Carl Sagan

–“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía.”– Frankenstein.

Mary Shelley

Dicen que las grandes gestas, deben contarse en rima
por ello debo agradecer, a aquellos que más tengo estima.
Si viniste a buscar tu nombre, no te importe si no apareces
que tampoco importe el orden, pues de grandeza no careces.
Por ello, según protocolo, primero debo comenzar
agradeciendo a mis directores, que tanto se han venido a esforzar.
A Francisca y José Ángel, por todo lo que he aprendido
durante tantos años y tantas veces, la paciencia que han tenido.
A Salvador y a Marino, por su sabiduría tan veterana
que entre ciencia y lo que es la vida, se te iba media mañana.
A todo el departamento, entre profesores y compañeros
que entre gritos y sonrisas, hacen lo difícil pasajero.
A mis amigos de carrera, tantos momentos he pasado
que no se llamen a engaño, tampoco los tengo olvidados.
A mis amigos de capa y espada, os recuerdo con el corazón
nombres de todos no caben, aunque son dignos de mención.
A los amores y desamores, que tanta vida me han dado
de nada me arrepiento, salvo de no seguir a vuestro lado.
A mi padre y a mi madre, que todo me lo han venido a dar
y también a mi hermano, que si no se viene a quejar.
De todos y cada uno, alguna cosa aprendí
que con amigos y buena suerte, merece la pena vivir.
Si has leído hasta ahora, sin saltarte ni un renglón
sé que apreciarás la tesis, que presento a continuación.

Índice

0.	ABREVIATURAS	1
1.	INTRODUCCIÓN	7
1.1.	EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO	9
1.2.	DEFENSAS FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO.....	14
1.2.1.	DEFENSA ENZIMÁTICA.....	14
	1.2.1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA	15
	1.2.1.2. CATALASA	16
	1.2.1.3. GLUTATIÓN PEROXIDASA	16
	1.2.1.4. GLUTATIÓN REDUCTASA.....	17
1.2.2.	DEFENSA NO ENZIMÁTICA.....	17
	1.2.2.1. GLUTATIÓN	17
	1.2.2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO	18
	1.2.2.3. POLIFENOLES. FLAVONOIDES	20
1.3.	FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF-2	25
1.4.	TÉ BLANCO.....	27
1.5.	LA ADRIAMICINA	35
2.	OBJECTIVOS	41
3.	CAPÍTULOS EXPERIMENTALES	45
3.1	CAPÍTULO EXPERIMENTAL 1. WHITE TEA CONSUMPTION SLIGHTLY REDUCES IRON ABSORTION BUT NOT GROWTH, FOOD EFFICIENCY, PROTEIN UTILIZATION, OR CALCIUM, PHOSPHORUS, MAGNESIUM, AND ZINC ABSORTION IN RATS	47
	3.1.1. INTRODUCTION	51
	3.1.2. MATERIALS AND METHODS	52
	3.1.2.1. ANIMALS AND DIETS	52
	3.1.2.2. PREPARATION OF TEA INFUSION RATS	53
	3.1.2.3. ANALYTICAL METHODS	53
	3.1.2.4. CALCULATIONS.....	53

3.1.2.5. STATISTICAL ANALYSIS	54
3.1.3. RESULTS	54
3.1.4. DISCUSSION	57
3.1.5. REFERENCES	60
3.2 CAPÍTULO EXPERIMENTAL 2. PROTECTIVE EFFECT OF WHITE TEA EXTRACT AGAINST ACUTE OXIDATIVE INJURY CAUSED BY ADRIAMYCIN IN DIFFERENT TISSUES	65
3.2.1. INTRODUCTION	69
3.2.2. MATERIAL AND METHODS	70
3.2.2.1. EXPERIMENTAL DESIGN	70
3.2.2.2. PREPARATION OF TEA INFUSION	70
3.2.2.3. ANALYTICAL METHODS	72
3.2.2.3.1. TOTAL PHENOLIC CONTENT	72
3.2.2.3.2. PROTEIN DETERMINATION	72
3.2.2.3.3. HYDROPHILIC ANTIOXIDANT CAPACITY (HAA)	72
3.2.2.3.4. CARBONYL GROUPS	73
3.2.2.3.5. HYDROPEROXIDES	73
3.2.2.4. STATISTICAL ANALYSES	73
3.2.3. RESULTS	74
3.2.4. DISCUSSION	77
3.2.5. REFERENCES	80
3.3 CAPÍTULO EXPERIMENTAL 3. MOLECULAR MECHANISMS BY WHICH WHITE TEA INTAKE PREVENTS OXIDATIVE-INDUCED STRESS IN VIVO	87
3.3.1. INTRODUCTION	91
3.3.2. MATERIAL AND METHODS	93
3.3.2.1. EXPERIMENTAL DESIGN	93
3.3.2.2. PREPARATION OF TEA INFUSION	94
3.3.2.3. QUANTITATIVE REAL-TIME	94
3.3.2.4. ENZYME ASSAYS	95
3.3.2.5. STATISTICAL ANALYSES	96

3.3.3. RESULTS	96
3.3.4. DISCUSSION	100
3.3.5. REFERENCES	105
3.4 CAPÍTULO EXPERIMENTAL 4. INGESTA A LARGO PLAZO DE TÉ BLANCO PREVIENE EL DAÑO OXITADIVO CAUSADO POR ADRIAMICINA EN RIÑÓN	111
3.4.1. INTRODUCTION	115
3.4.2. MATERIAL AND METHODS	117
3.4.2.1. EXPERIMENTAL DESIGN	117
3.4.2.2. PREPARATION OF TEA INFUSION	118
3.4.2.3.1. HYDROPHILIC ANTIOXIDANT ACTIVITY (HAA)	119
3.4.2.3.2. CARBONYL GROUPS	119
3.4.2.3.3. HYDROPEROXIDES	119
3.4.2.4. QUANTITATIVE REAL-TIME	120
3.4.2.5. ENZYME ASSAYS	120
3.4.2.6 STATISTICAL ANALYSES	121
3.4.3. RESULTS	122
3.4.4. DISCUSSION	128
3.4.5. REFERENCES	134
3.5 CAPÍTULO EXPERIMENTAL 5. EFECTO DE LA INGESTIÓN A LARGO PLAZO DE TÉ BLANCO CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA Y LOS ÁCIDOS GRASOS DE HÍGADO Y CORAZÓN	141
3.5.1. INTRODUCCIÓN	145
3.5.2. MATERIALES YMETODO.....	146
3.5.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	146
3.5.2.2. PREPARACIÓN DE LA INFUSION	147
3.5.2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA (HAA)	148
3.5.2.4. HYDROPERÓXIDOS	148
3.5.2.5. GRUPOS CARBONILO	148
3.5.2.6. EXTRACCION LIPÍDICA Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS	148

3.5.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	149
3.5.3. RESULTADOS	149
3.5.4. DISCUSIÓN	153
3.5.5. REFERENCIAS	156
4. DISCUSIÓN	163
5. CONCLUSIONES	176
6. BIBLIOGRAFÍA	181

Abreviaturas

Abreviaturas

ABTS: 2,2'-azino-bis-3-(ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ADR: Adriamicina (Adriamycin)

APD: Apparent protein digestibility

ARE: Antioxidant response element

BV: Biological value

CAT: Catalasa

Cat: Gen de la catalasa

EC: Epicatequina

ECG: Epicatequina galato (epicatechin gallate)

ECH: Erythroid-derived CNC (cap'n'collar) Homology protein

EGC: Epigallocatequina (epigallocatechin)

EGCG: Epigallocatequina galato (epigallocatechin gallate)

ERNs: Especies reactivas de Nitrógeno

EROs: Especies reactivas de Oxígeno

FE: Feed efficiency

FO•: Flavonoide derivado de la reacción con un radical libre (oxidado).

FOH: Flavonoide

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

Gr: Gen de la glutatión reductasa

GSH: Glutatión reducido

GSSG: Glutatión oxidado

GST: Glutatión-S-transferasa

Gst: Gen de la glutatión-S-transferasa

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HSA: Albumina de suero humana

HUFAs: Highly unsaturated fatty acids

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

K_{ST}: Constante de disociación

L•: Radical lipídico

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LH: Molécula lipídica

LOO•: Radical peróxido lipídico

LOOH: Hidroperóxido lipídico

MUFAs: Monounsaturated fatty acids

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NB: Nitrogen balance

NES: Nucleus export secuencia

NQO1: NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1

Nqo1: Gen de la NADP (H)-quinona oxidoreductasa 1

NRF-2: Nuclear factor E2- related factor 2

Nrf2: Gen del Nuclear factor E2- related factor 2

PER: Protein efficiency ratio

PUFAs: Polyunsaturated fatty acids

PXI: Lipid Peroxidation Index

ROS: Reactive Oxygen species

SFAs: Saturated fatty acids

SMaf: Small muscle aponeurotic fibrosarcoma

SOD: Superóxido dismutasa

Sod: Gen de la superóxido dismutasa

UI: Unsaturation Index

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento como proceso biológico se caracteriza por una disminución en la eficiencia de las funciones fisiológicas. La capacidad de mantener la homeostasis disminuye con la edad, aumentando el riesgo de numerosas enfermedades (como el cáncer, la degeneración neuronal y las enfermedades cardiovasculares) e incrementando progresivamente en conjunto las posibilidades de la muerte del individuo.

El proceso natural del envejecimiento se define por ser progresivo, irreversible y finalmente mortal para el individuo (Strehler, 1962). Estos factores que causan el envejecimiento paulatino del individuo están presentes a lo largo de toda su vida, tanto en la juventud como en la senectud. El envejecimiento es un proceso endógeno y el incremento natural de éste no está causado por procesos exógenos, sin embargo, muchos de estos procesos interactúan con causas exógenas que aumentan o disminuyen sus efectos.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y aldehídos lipídicos.

Especies reactivas de oxígeno y aldehídos			
	Radicales	No Radicales	
Hidroxilo	(HO•)	Peróxido de hidrogeno	H ₂ O ₂
Superóxido	(O ₂ •)	Oxígeno singlete	¹ O ₂
Peróxido lipídico	(LOO•)	Hidroperóxido lipídico	LOOH
Alcoxilo	(RO•)	4-Hidroxi-2-hexenal	HHE
Peroxilo	(ROO•)	4-Hidroxi-2-nonenal	HNE

Las evidencias consistentes indican que las especies reactivas de oxígeno (*EROs*) y las especies reactivas del nitrógeno (*ERNs*) (Harman, 1972; Barja, 2004) son las causantes básicas del progresivo incremento del envejecimiento celular (Sohal & Weindruch, 1996; Beckman & Ames., 1998; Sanz *et al.*, 2006). Las *EROs* son producidas en condiciones fisiológicas normales continuamente y sus efectos deletéreos en diferentes macromoléculas biológicas causan daños en tejidos post-mitóticos, ya sea

porque las células se ven irreversiblemente dañadas o por la pérdida de la capacidad de división de las mismas. Las *EROs* son producidas en el metabolismo normal de la célula, como intermediarios o como productos finales de las reacciones de oxidación (Pryor, 1976). Además, también puede generarse estrés oxidativo en lugares externos a la célula, por lo que deben ser tomadas en cuenta las *EROs* y *ERNs* externas e internas.

Las principales fuentes de *EROs* endógenas son:

- La cadena de transporte electrónico mitocondrial
- La cadena de transporte electrónico microsomal
- Las células fagocitarias
- La activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamina oxidasa, ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (Beckman & Ames, 1998; Lindsay & Astley, 2002).

La mitocondria puede generar más del 85% de las *EROs* en el tejido muscular esquelético (Chance *et al.*, 1979; Lindsay & Astley, 2002). La generación a partir del O₂ y del H₂O₂ está alrededor del 2% del total del flujo de electrones en las mitocondrias de células de rata (Ames *et al.*, 1993; Beckman & Ames, 1998), y entre el 1-2% deriva del O₂ consumido por el organismo que por dismutación dará lugar a la formación de otras *EROs* (Halliwell, 1994; Halliwell, 1996; Mc Cor, 2000).

Las principales fuentes de *EROs* exógenas son:

- Ambientales: Radiaciones (electromagnética, solar...), combustiones parciales (gases de calefacciones, gases de tubos de escape, tabaco), ozono...
- Farmacológicas: Antibióticos, drogas... (etc).
- Nutricionales: Contaminaciones en los alimentos (metales pesados, pesticidas...).

Las *EROs* causan oxidación en biomoléculas tales como lípidos insaturados, colesterol, glúcidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales son susceptibles de ser atacadas *in vivo* por radicales libres (**Figura 1**).

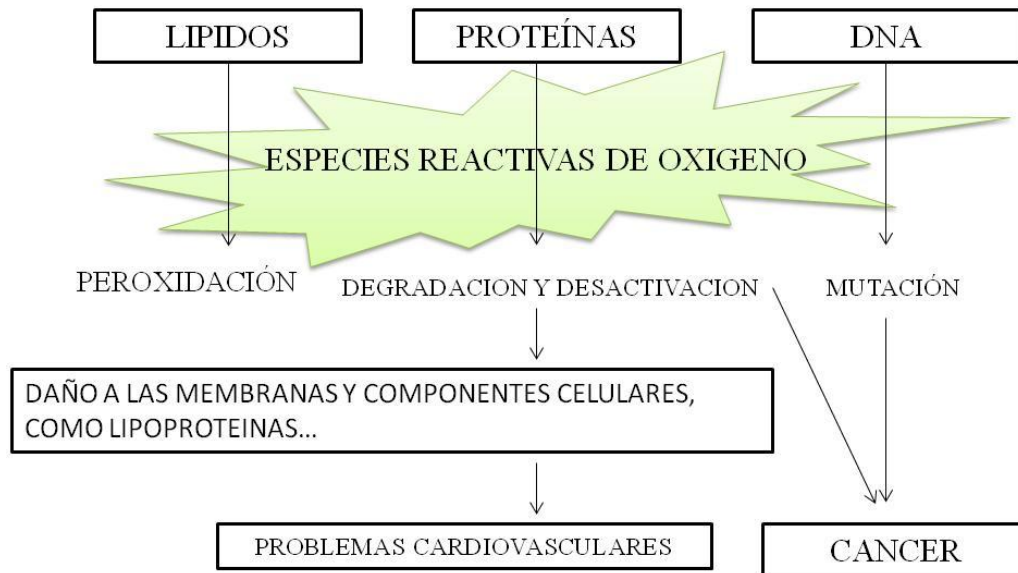


Figura 1.- Daño producido en las biomoléculas por especies reactivas de oxígeno.

Los ácidos grasos poliinsaturados son muy susceptibles de ser dañados por las *EROs*, debido los dobles enlaces (tipo *cis*) que poseen, lo que los hace tremendamente vulnerables a estos radicales.

Al producirse la peroxidación lipídica, se producen las reacciones de *iniciación*, de *propagación* y de *terminación* (**Figuras 2 y 3**).

-*Iniciación*, en la que una especie no radical adquiere ese carácter, bien ganando o perdiendo un electrón o bien por ruptura homolítica a partir de un enlace covalente.

- *Propagación*, en la que un radical reacciona con una especie no radical y esta última adquiere ese carácter, con lo que la reacción radical se perpetúa.

-*Terminación*, en la que reaccionan dos radicales para formar especies estables.

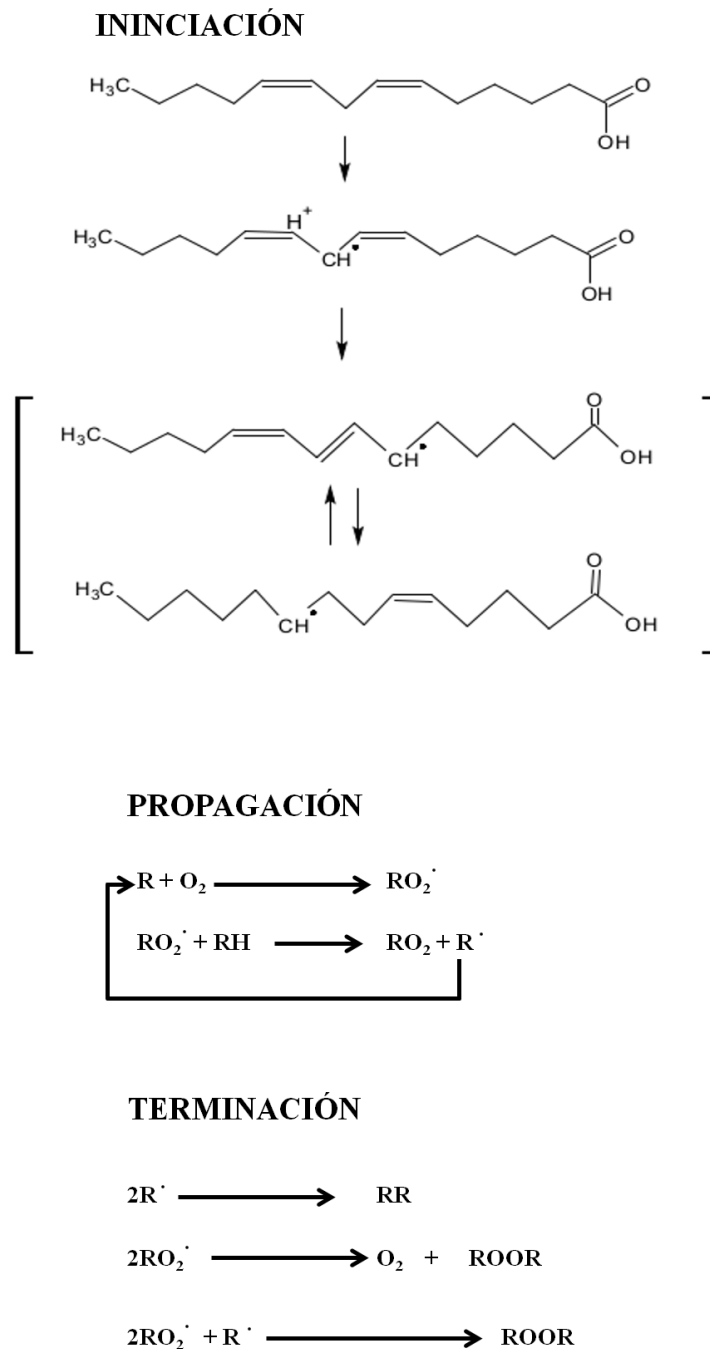


Figura 2.- Esquema de la peroxidación lipídica.

También las proteínas son sensibles de ser atacadas por las *EROs* perdiendo éstas su función en la célula y provocando su degradación, ya sea por ruptura o escisión o por cambio en su susceptibilidad a los complejos proteolíticos.

La susceptibilidad de las proteínas a los daños por las *EROs* depende de su estructura como proteína, de su composición en aminoácidos, y de su posición en la célula (accesibilidad de las *EROs* a los componentes proteicos). Hay aminoácidos más

susceptibles que otros, como la *cisteína* y la *metionina* (presentes en enzimas como la lisozima o la pepsina, las cuales pierden actividad al dañarse estos aminoácidos).

Estos daños en las proteínas no son sólo por oxidación, sino también por la oxidoreducción de los grupos tiol, los cuales influyen en la estructura de la misma a distintos niveles y además en sus constantes de velocidad de reacción, de unión al ligando, estabilidad a diferente temperatura, etc.

También se produce daño en el DNA, como roturas, modificación de bases, pudiéndose producir mutaciones y carcinogénesis (Griffith *et al.*, 1988).

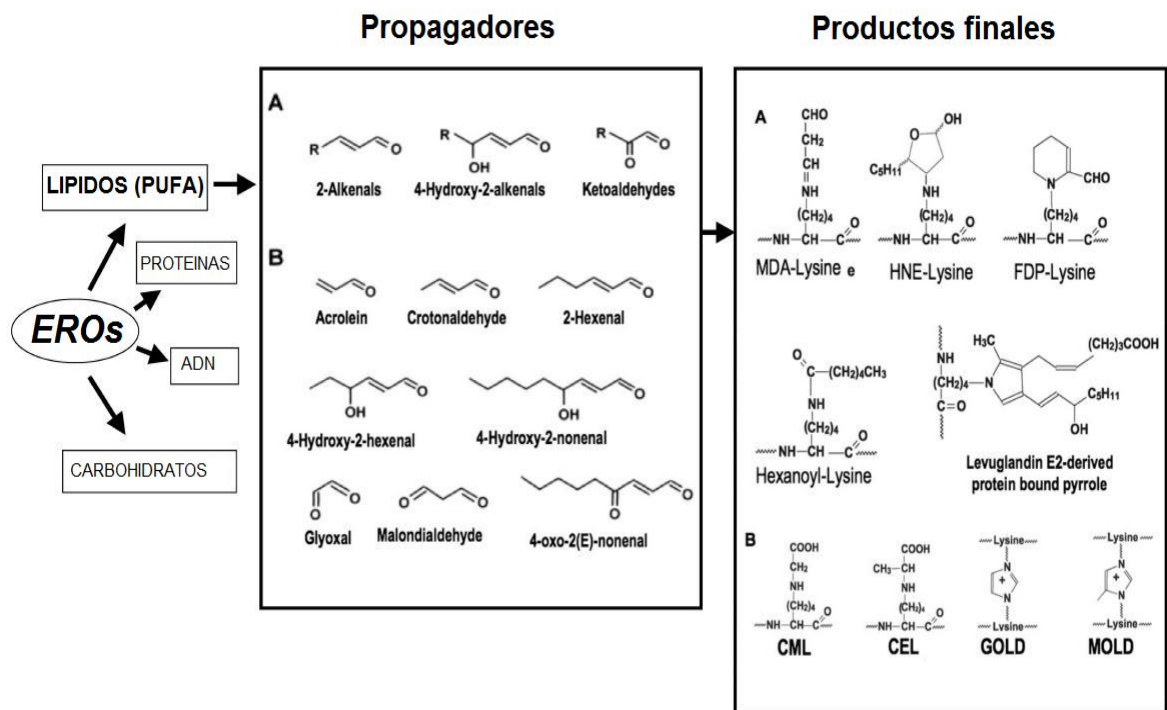


Figura 3. Esquema químico de las rutas de la formación de lipo-oxidación avanzada y productos finales detectados en las proteínas de los tejidos. Todos los componentes son derivados de residuos proteicos de lisina y arginina. Componentes similares son formados en reacciones con otros grupos nucleófilos de proteínas, así como en DNA y otros aminofosfolípidos. Los propagadores generalmente tienen estructuras de aldehídos reactivos (A) y lípidos con peroxidación específica en grupos aldehído (B). Los productos finales muestran una estructura general de avanzada lipoxidación (A) y también avanzada glico- y lipoxidación (Hulbert *et al.*, 2007).

La lesión en el ADN se acompaña de la activación de la poli (ADP)-ribosa sintetasa, encargada de la polimerización de residuos de ADP-ribosa a partir de NAD⁺. Esto está relacionado con la caída de nucleótidos adenosínicos y el aumento del Ca²⁺ intracelular (Sies, 1986; Starke *et al.*, 1986; Halliwell, 1988).

Además, junto con la activación de la poli (ADP)-ribosa sintetasa, se produce un aumento en la demanda de NADPH⁺, debido a la oxidación del glutatión reducido (GSH) utilizado como cofactor en la metabolización del H₂O₂, catalizada ésta por la GP_x (glutatión peroxidasa).



La disminución de las concentraciones intracelulares de NAD(H), NADP(H), GSH y ATP llevan a la célula a la incapacidad de mantener bajos los niveles de calcio, lo cual a su vez induce la liberación citosólica de iones metálicos, contribuyendo así a la propagación de especies reactivas y a la destrucción celular (Halliwell, 1988).

1.2. DEFENSAS FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

Aunque a niveles bajos, los radicales libres pueden ser beneficiosos (mediadores de la activación o la proliferación, o como medio de defensa frente a las infecciones...), los niveles altos pueden resultar tóxicos, ocasionando daño celular. Ante este daño, los seres vivos han desarrollado diferentes mecanismos defensivos, los cuales actúan eliminando o neutralizando estos radicales libres.

Un antioxidante es cualquier molécula en cuya presencia, o a baja concentración, se ve impedida la oxidación de un sustrato oxidable (Halliwell & Gutteridge, 1989). Los sistemas antioxidantes pueden ser de diferente naturaleza. En general se dividen en dos grandes categorías: enzimáticos y no enzimáticos.

1.2.1. Defensa enzimática

Donde se incluyen enzimas como la *superóxido dismutasa* (SOD), la *catalasa* (CAT) o la *glutatión peroxidasa* (GP_x). En la **Figura 4** se muestran las reacciones donde actúan estas enzimas antioxidantes.

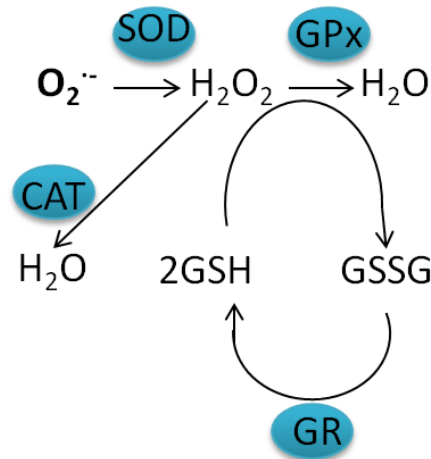
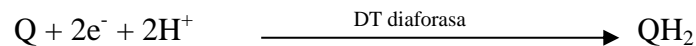


Figura 4.- Esquema de la generación de *EROs* y defensa antioxidante enzimática. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG).

También se encarga de la defensa antioxidante regenerando el glutatión reducido la NADPH-quinona óxido reductasa (DT diaforasa):



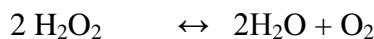
1.2.1.1. Superóxido dismutasa (1.15.1.1)

La superóxido dismutasa cataliza la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a un producto menos agresivo, el H_2O_2 , que es convertido en H_2O , por la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Griendling & Ushio-Fukai, 2000).

Las tres isoenzimas identificadas hasta ahora de la superóxido dismutasa son: la superóxido dismutasa 1 (SOD1) homodimérica y citosólica con cofactores Cu/Zn; la superóxido dismutasa 2 (SOD2) homotetramérica y localizada en la mitocondria con cofactor Mn; y la superóxido dismutasa 3 (SOD3) unida al proteoglicano, y por lo tanto extracelular, con cofactores Cu/Zn (Fridovich, 1997). En humanos, los genes se encuentran localizados en los cromosomas 21, 6 y 4, respectivamente (21q22.1, 6q25.3 y 4p15.3-p15.1).

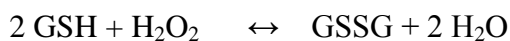
1.2.1.2. *Catalasa (1.11.1.6)*

La catalasa es una enzima que pertenece a la categoría de las oxidorreductasas y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en O₂ y H₂O (Aebi, 1984). Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al Mn. Se presenta en forma de homotetrámero y se localiza en los peroxisomas.



1.2.1.3. *Glutación peroxidasa (1.11.1.9)*

La glutación peroxidasa (GPx) cataliza la reacción que convierte el H₂O₂ en H₂O, utilizando el poder reductor del glutatión, pasando éste de glutatión reducido a glutatión oxidado.



La glutación peroxidasa tiene como principal función proteger al organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos formados de forma endógena. En vertebrados se conocen cuatro isoformas: la citosólica (GPx-1), la gastrointestinal (GPx-GI), la isoforma que se secreta en el plasma (GPx-P) y la isoforma epididimal (GPx-EP).

En humanos, las isoformas conocidas son:

GPx-1. Un homotetrámero que se sitúa en el citosol de los eritrocitos, tiene la función de proteger a la hemoglobina de la peroxidación.

GPx-2. Se sitúa en el citosol de las células hepáticas y del tracto gastrointestinal en forma de homotetrámero. Tiene como fin la detoxificación de hidroperóxidos orgánicos que se han ingerido.

GPx-3. Se secreta al plasma y tiene como función proteger a las células y enzimas de la peroxidación producida por estrés oxidativo, hidroperóxidos y peróxidos orgánicos.

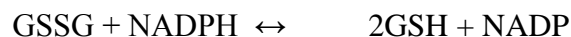
GPx-5. Se secreta en el epidídimo con el fin de proteger la membrana de los espermatozoides.

GPx-6. Se expresa y secreta en el epitelio olfativo.

Existen otras isoformas tanto secretadas como de membrana (Mannervik, 1985).

1.2.1.4. *Glutación reductasa (1.6.4.2)*

La glutación reductasa es una flavoenzima homodimérica que utiliza como cofactor nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH), el cual será utilizado por la glutación peroxidasa (GPx) para reducir el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos.



Tiene la función de regenerar el poder reductor y mantener las enzimas antioxidantes, funcionando gracias al aporte de glutación reducido (GSH) ante un estrés oxidativo. El GSH también regenera a las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (α -tocoferol). Se encuentra en todos los organismos aeróbicos así como en algunas plantas superiores por lo que aparenta ser una enzima *quasi* universal (Pompella *et al.*, 2003).

1.2.2. Defensa no enzimática

La defensa no enzimática, en general, está compuesta por diversas moléculas antioxidantes de diferente procedencia e índole en cuanto a su comportamiento en el agua se refiere, encontrándose moléculas hidrofílicas, y otras más lipofílicas (Seifried, *et al.*, 2007). Ejemplos de estas moléculas son β -caroteno, ferritina, ceruloplasmina, selenio, manganeso, ubiquinona, zinc, y ácido úrico. Entre las moléculas hidrofílicas podemos destacar vitaminas C y E, glutación (GSH), polifenoles,...etc.

1.2.2.1. *Glutación*

El glutación (GSH) (γ -Glu-CysH-Gly) es el mayor componente antioxidante de la célula, tanto endógeno como exógeno. Está compuesto por tres aminoácidos (cisteína, glicina y ácido glutámico). Su origen es bastante antiguo ya que está presente en células animales y vegetales.

Es capaz de reaccionar con radicales hidroxilo, peróxido y superóxido, siendo también capaz de reaccionar con α -tocoferol, y reparar el DNA dañado.

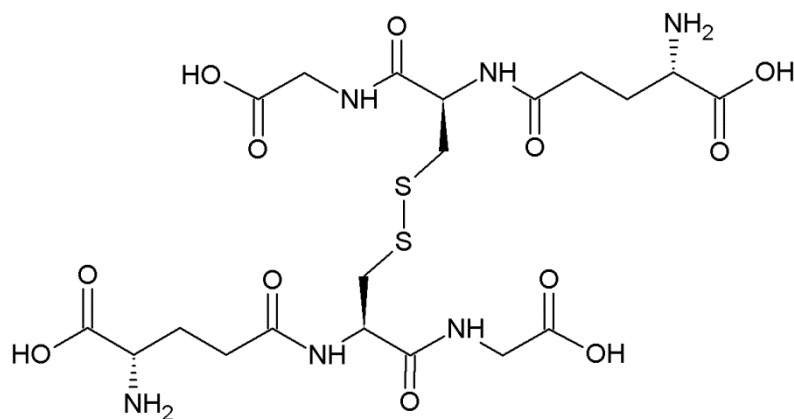


Figura 5.- Estructura química del glutatión oxidado (GSSG)

Es absorbido de la dieta y también puede ser sintetizado en la célula. Puede además actuar como pro-oxidante (GS'), pero antes reacciona con otra molécula igual, produciendo glutatión oxidado (GSSG), pudiendo reducirse éste a GSH gracias a la enzima glutatión reductasa, necesitando para ello NADPH (Pompella *et al.*, 2003).

El glutatión es un sustrato tanto en reacciones de conjugación como de reducción, catalizadas por enzimas glutatión S-transferasas en el citosol, en los microsomas y en las mitocondrias. Sin embargo, también es capaz de participar en la conjugación no enzimática con algunos productos químicos, como es el caso de la n-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) y el citocromo P₄₅₀ reactivo en hígado (McConnachie *et al.*, 2007).

1.2.2.2. Ácido ascórbico

La vitamina C es un potente antioxidante, que actúa disminuyendo el estrés oxidativo en cooperación con el glutatión, es además un sustrato para la ascorbato-peroxidasa, así como un cofactor enzimático para la biosíntesis de importantes bio-moléculas (Noctor & Foyer, 1998). Esta vitamina actúa como agente donador de electrones para 8 enzimas diferentes y, en general, interviene en la síntesis del colágeno (Kishimoto *et al.*, 2013) (lo que la convierte en un nutriente esencial para el desarrollo y mantenimiento de tejidos en cicatrización, vasos sanguíneos, y cartílago), carnitina (Jacob & Pianalto, 1997), algunas hormonas (norepinefrina a partir de dopamina, a través de la enzima dopamina-β-hidroxilasa) (May *et al.*, 2013), aminoácidos (tirosina), elastina y fibronectina (Eyre *et al.*, 1984). Ofrece además protección frente a infecciones, cáncer

(Enwonwu & Meeks, 1995) y enfermedades degenerativas (como arteriosclerosis, Alzheimer...). Posee también, al parecer, la capacidad de frenar el crecimiento vírico (Madhusudana *et al.*, 2004).

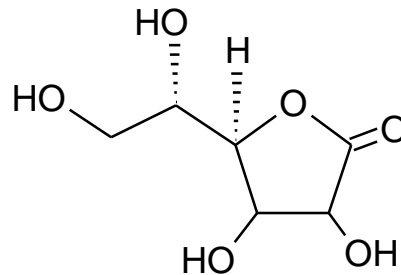
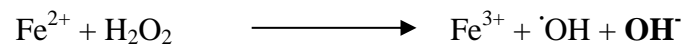


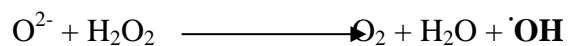
Figura 6.- Estructura química del ácido ascórbico (vitamina C).

Sin embargo, la vitamina C se convierte en oxidante cuando se administra en dosis altas, especialmente en presencia de Fe^{2+} y Cu^{2+} (reacción de Fenton y reacción de Haber-Weiss) (Halliwell & Gutteridge, 2007). El ascórbico, junto con el Fe^{3+} , se convierte en hidroascórbico y Fe^{2+} y éste, junto con peróxido de hidrógeno para volver a Fe^{3+} y dar lugar a $\text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^{-}$ en el proceso.

Reacción de Fenton



Reacción de Haber-Weiss



El ascórbico, neutraliza los radicales libres, pasando a dehidroascorbato, que mediante la dehidroascorbato reductasa, y el gasto de glutatión, vuelve a convertirse en ascórbico.

Otro ejemplo sería la vitamina E. Se conocen ocho tocoferoles y un tocotrienol con actividad de vitamina E aunque se considera que el alfa (α) tocoferol (5, 7, 8-trimetil tocol) es el tocoferol de mayor importancia, puesto que constituye alrededor de 90% de los tocoferoles en tejidos de animales, y muestra la mayor actividad biológica en casi todos los sistemas de biovaloración. El isomerismo óptico influye sobre la actividad; las formas D son más activas que las L. Una de las características químicas de importancia

de los tocoferoles es que son agentes de oxidorreducción, que bajo algunas circunstancias, actúan como antioxidantes, y esto al parecer es la base de casi todos los efectos de la vitamina E, si no todos. Los tocoferoles se deterioran con lentitud cuando quedan expuestos al aire o a la luz ultravioleta (Reiter *et al.*, 2007).

1.2.2.3. Polifenoles. Flavonoides

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas e incluyen una gran variedad de estructuras químicas, desde moléculas simples, tales como ácidos fenólicos, a compuestos altamente polimerizados, como los taninos condensados. Los flavonoides son una familia de polifenoles con estructura química definida, que tienen una estructura básica de dos anillos aromáticos (anillos A y B) vinculados a través de tres átomos de carbono, que con frecuencia forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (**Figura 7**). Diferentes regímenes de hidroxilos y/o grupos carbonilo, y dobles enlaces carbono-carbono en la estructura básica, definen los diferentes grupos de flavonoides, como se muestra en la **Figura 7** (Crozier *et al.*, 2009). Los beneficios de los flavonoides en la salud humana se han atribuido a su capacidad potencial de disminuir las concentraciones de radicales libres en los sistemas biológicos.

Esta capacidad podría ser posible teniendo en cuenta que los polifenoles tienen estructuras químicas que permiten la eliminación de los radicales libres y la quelación de metales con actividad *redox*. Algunos flavonoides pueden proporcionar beneficios en situaciones patológicas asociadas con una alta producción de radicales libres, por ejemplo, en la hipertensión o enfermedades cardiovasculares (Corti *et al.*, 2009, Galleano *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que asocian las características químicas antioxidantes de los polifenoles con los efectos sobre la salud son todavía objeto de debate (Fraga, 2007, Halliwell, 2007, Galleano *et al.*, 2009).

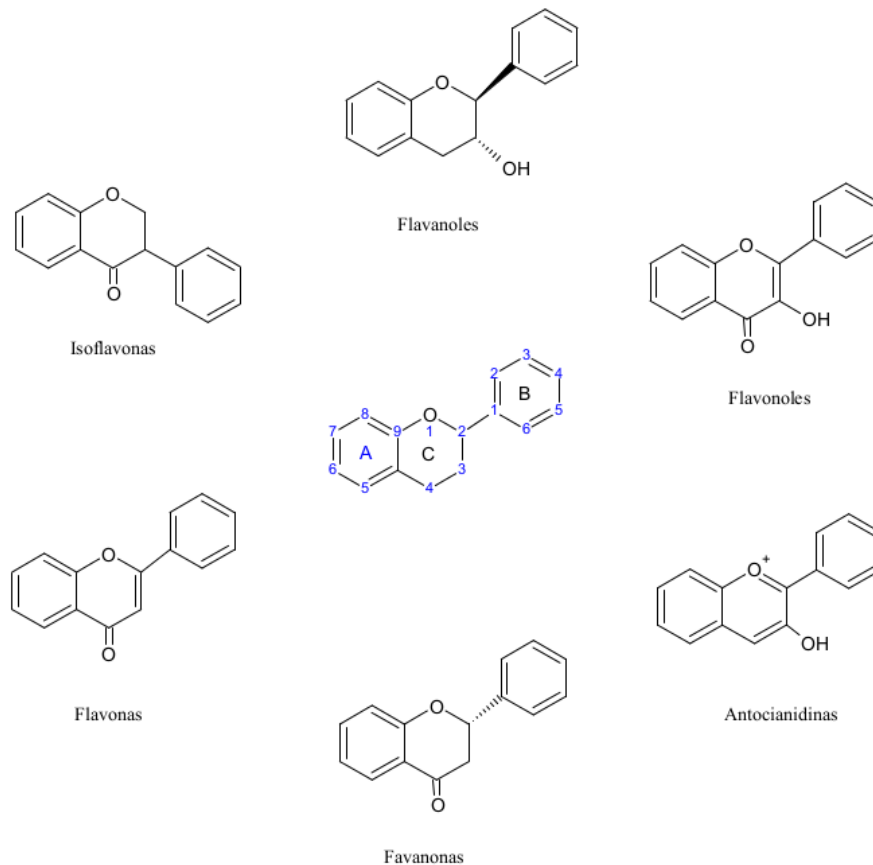


Figura 7.- Estructura básica y diferentes subfamilias de flavonoides

La mayoría de los flavonoides ingeridos son metabolizados por las enzimas intestinales y las hepáticas, y están presentes en forma de metabolitos en sangre y otros tejidos (Cook & Samman, 1996, Walle, 2004).

Los flavonoides actúan como antioxidantes al romper la cadena de reacciones de propagación de los radicales libres. La oxidación lipídica es un evento importante en la oxidación de los sistemas biológicos y se produce como una reacción en cadena de la participación de los lípidos (LH) y oxígeno molecular como sustratos, y metales como catalizadores (**Figura 8A**). La inhibición de la reacción en cadena de la oxidación de los lípidos (**Figura 8B**), puede ser considerada como uno de los mecanismos más importantes que explican las acciones antioxidantes de los flavonoides. En general, los antioxidantes que rompen la cadena (AH) inhiben o retardan la oxidación de los lípidos al interferir con la cadena de reacciones de propagación. Como se muestra en las reacciones 2 y 3 (**Figura 8B**), los flavonoides (FOH) deben donar átomos de hidrógeno a los lípidos (L·) o radicales peróxidos de lípidos (LOO·) para obstaculizar la propagación de la oxidación lipídica.

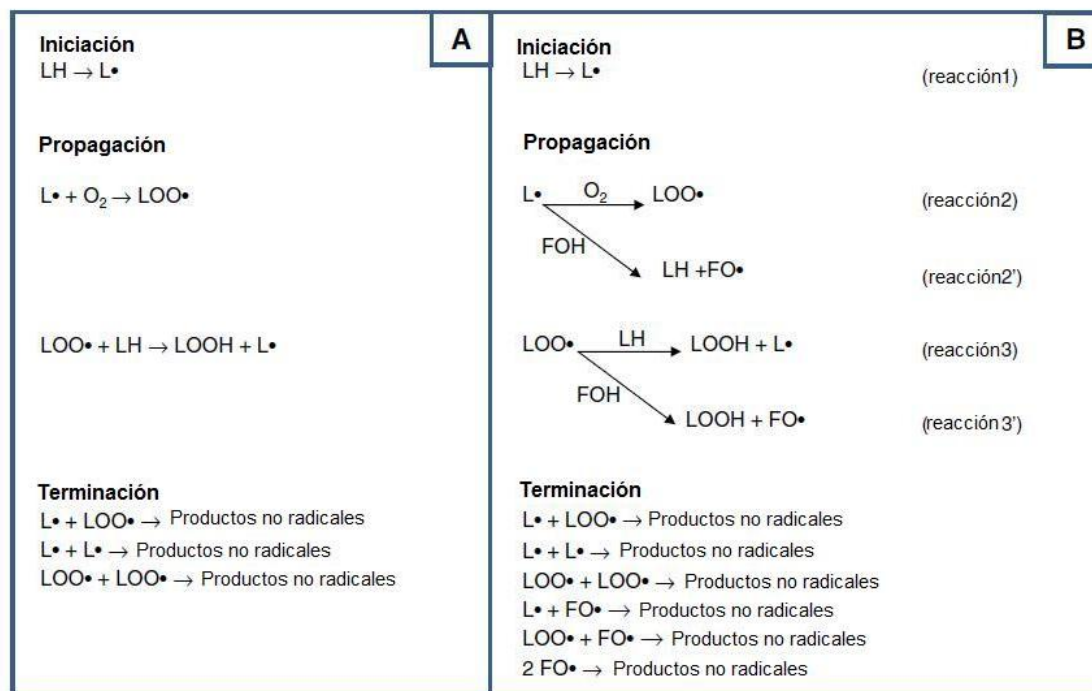


Figura 8. Los flavonoides interfieren en la cadena de reacciones de la oxidación lipídica. Las reacciones secuenciales de oxidación lipídica cambian en ausencia (A) o presencia de flavonoides (FOH) actuando como antioxidantes (B). LH molécula lipídica, $L\cdot$ radical lipídico, $LOO\cdot$ radical peróxido lipídico, LOOH hidropéroxido lipídico, FOH flavonoide, A antioxidante derivado de la reacción con un radical libre (oxidado), $FO\cdot$ flavonoide derivado de la reacción con un radical libre (oxidado) (Galleano *et al.*, 2010).

Los productos de estas reacciones no son especies radicales, es decir, son el lípido original (LH), o el hidropéroxido lipídico correspondiente (LOOH), y el radical derivado del flavonoide antioxidante ($A\cdot$ o $FO\cdot$) (**Figura 8**). La eficacia de los FOH como antioxidantes que rompen la cadena de propagaciones oxidativas, se asocia básicamente con dos condiciones termodinámicas: Primero, que se produzca la reacción entre $L\cdot$ o $LOO\cdot$ y FOH, siendo ésta energéticamente favorable, y segundo, la estabilidad adecuada del radical resultante ($FO\cdot$), debiendo ser éste relativamente no reactivo (Jovanovic *et al.*, 1994).

También se ha sugerido la posibilidad de que algunos flavonoides puedan ser pro-oxidantes (Halliwell, 2008). Tal actividad pro-oxidante supuestamente está basada en una suma de reacciones complejas que implica la reacción entre FOH y O_2 produciendo $O_2^{\cdot-}$, seguida de la reacción entre un segundo FOH y $O_2^{\cdot-}$ produciendo H_2O_2 . La primera reacción, es decir, la autooxidación de FOH, se puede producir en determinadas

condiciones (Nakayama *et al.*, 1995, Miura *et al.*, 1998), aunque es termodinámicamente desfavorable (E° de $O_2 / O_2^{\cdot-} = -330$ mV (Wardman, 1989), o -160 mV (Sawyer *et al.*, 1981). Por el contrario, la segunda reacción es energéticamente favorable (E° de $O_2^{\cdot-} / H_2O_2 = 940$ mV (Buettner, 1993), pero dado que la segunda reacción está condicionada por la primera de autooxidación de FOH, tiene una posibilidad muy baja de que se produzca en gran medida en condiciones fisiológicas.

Una de las propiedades más importantes de los polifenoles es su acción como antioxidantes mediante la quelación de metales. La tasa de descomposición espontánea del H_2O_2 y de los hidroperóxidos de los lípidos para generar el radical hidroxilo ($\cdot OH$), los radicales peroxilo ($LOO\cdot$), o radicales alcoxilo ($LO\cdot$), es muy lenta. Sin embargo, en presencia de ciertos metales que pueden actuar como catalizadores, esta tasa se incrementa y puede llegar a ser relevante en los sistemas biológicos. El Fe y el Cu son ejemplos de metales que tienen más de un estado redox que pueden catalizar la formación de radicales. En consecuencia, la retención de Fe y/o Cu para la prevención de la formación de radicales libres, catalizada por estos metales se considera una estrategia antioxidante (Guo *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998; Morel *et al.*, 1998).

En términos generales, la mitad catecol de las moléculas de flavonoides poseen una alta afinidad por los iones metálicos. Además, las propiedades electrónicas del sistema de anillos de los flavonoides hacen buenas uniones para los electrones de los elementos del cuarto período, como por ejemplo, el Fe (Havsteen, 1983). Un parámetro fundamental para analizar la capacidad de los flavonoides de quelar un metal es la constante de estabilidad (K_{ST}) para el complejo flavonoide-metal. Curiosamente, se ha visto que los metales unidos a los flavonoides pueden tener actividad superóxido dismutasa (Kostyuk *et al.*, 2004). Los autores consideran que esta actividad puede explicar que ciertos flavonoides muestren una capacidad antioxidante más alta de la esperada, debido a la acción de estos metales secuestrados.

Las interacciones con los lípidos y las proteínas de membrana son eventos que pueden mediar en algunos efectos biológicos y antioxidantes de los flavonoides. Hay observaciones que demuestran que ciertos flavonoides ejercen efectos biológicos a pesar de que no son internalizados por las células (Erlejman *et al.*, 2006 y 2008, Verstraeten *et al.*, 2008).

Los flavonoides son generalmente moléculas anfifílicas, pero los diferentes sustituyentes en su estructura química dan, a cada uno de los flavonoides, características físicas particulares. En general, los flavonoides a nivel celular pueden interactuar con los lípidos en la superficie de la bicapa (adsorción), y/o insertarse en la bicapa e interactuar con las cadenas hidrofóbicas de los lípidos. Las interacciones directas de los flavonoides con los lípidos pueden alterar las propiedades físicas de la membrana y/o modular diferentes eventos biológicos asociados a la membrana, incluyendo la actividad de enzimas asociadas a ésta, las interacciones ligando-receptor, de iones y/o de los flujos de metabolitos, y en la modulación de la transducción de señales (Galleano *et al.*, 2010).

Además, aún encontrándose insertos en la bicapa lipídica, los flavonoides podrían unirse a moléculas que se encuentren en las proximidades como por ejemplo L·, LOO·, y otros radicales liposolubles. Los flavonoides podrían reaccionar con los radicales libres y prevenir una diseminación más amplia de reacciones de estos radicales, que podrían causar daño en la membrana y/o modificar funciones de la misma si no se neutralizaran. Los datos experimentales sobre las características termodinámicas que rigen las interacciones lípido-flavonoides son limitados.

La adsorción a la superficie de las membranas podría proporcionar un mecanismo plausible para la prevención de la oxidación de los lípidos por los flavonoides. Trabajos con liposomas compuestos de fosfatidilcolina y fosfatidilserina, demuestran que la (-)-epicatequina (EC) se adsorbe a oligómeros de la superficie del liposoma e inhibe la oxidación lipídica inducida por oxidantes hidrófobos (Verstraeten *et al.*, 2003). La fuerza de las interacciones establecidas entre los oligómeros de EC y la superficie de la membrana depende mucho de la naturaleza química de los grupos polares de los fosfolípidos, siguiendo el orden de galactolípidos > fosfatidilcolina > fosfatidilserina (Oteiza *et al.*, 2005). A través de este tipo de interacciones, los flavonoides podrían quedar adheridos a la superficie celular y ejercer sus efectos protectores locales.

Las características estructurales también son factores relevantes en el comportamiento de las interacciones lípido-flavonoides. La EC y (-)-epigallocatequina (EGC) interactúan con la 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina con constantes de afinidad (K_a) de $1,86 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $1,33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (Kamihira *et al.*, 2008). Esto indica que un grupo hidroxilo adicional en el anillo B no afecta a la

interacción. A partir de estos resultados se puede concluir que la interacción de los flavonoides con las membranas depende del número y de las posiciones de los grupos hidroxilo presentes en la molécula de los flavonoides, y que probablemente se debe a su facilidad para formar puentes de hidrógeno (Galleano *et al.*, 2010).

Los flavonoides interactúan también con las proteínas, y estas interacciones son complejas como se puede esperar de la gran variedad de flavonoides y proteínas que se encuentran en la naturaleza. De manera similar a las evidencias publicadas de las interacciones entre lípidos y flavonoides, la mayoría de los estudios termodinámicos se han realizado con proteínas individualmente. El estudio de estas interacciones se basa, generalmente, en la caracterización de interacciones químicas directas de los flavonoides con las proteínas, o en las consecuencias funcionales de estas interacciones, como por ejemplo, la actividad de la enzima y la función del ligando/receptor (Galleano *et al.*, 2010).

1.3. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2

El factor de transcripción *Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2* (NRF2), también conocido como Nfe2l2, regula el estado *redox* de la célula. Está modulado por una compleja red transcripcional/epigenética y postrasduccional que garantiza que su actividad se incremente durante la perturbación *redox*, la inflamación, la estimulación del factor de crecimiento y los flujos de nutrientes/energía, permitiendo de ese modo al factor orquestar repuestas adaptativas a diversas formas de estrés.

Por otro lado, mediando la inducción estimulada por estrés de los genes antioxidantes y detoxificantes, el NRF2 contribuye a la adaptación promoviendo la expresión de genes reparadores y la degradación de macromoléculas dañadas, añadiendo además la modulación del metabolismo intermediario. En el último caso, el NRF2 inhibe la lipogénesis, promueve la β -oxidación de los ácidos grasos, facilita el flujo a través del ciclo de las pentosas fosfato, incrementa la regeneración de NADPH y la biosíntesis de purinas; estas observaciones sugieren que este factor reprograma directamente el metabolismo durante una situación de estrés.

El NRF2 es una proteína cap'n'collar (CNC), con una región básica de leucinas en forma de cremallera (bZIP), que actúa como factor de transcripción que influencia

fuertemente la resistencia intrínseca frente al estrés oxidativo y controla una respuesta adaptativa frente a varios factores ambientales estresantes. Este factor activa los elementos de respuesta antioxidantes (ARE), los cuales son objeto de estudio en la actualidad.

El NRF2 se codifica en el gen *nfe2l2* localizado en el cromosoma 2 del ser humano. Teóricamente, el peso molecular del NRF2 es de 66 kDa (Paek et al., 2012). Este factor, en asociación con small Maf y proteínas de la familia Jun, forma un complejo transcripcional aguas arriba (Abbas et al., 2011; Jeong et al., 2012; Lu & Holmgren, 2014). En este estado de heterodímero el NRF2 se une a la secuencia ARE del ADN y regula la expresión de los genes que poseen dicha secuencia y que codifican enzimas detoxificantes, así como las bien conocidas enzimas antioxidantes que incrementan la principal defensa del sistema (junto con los antioxidantes) contra el estrés oxidativo (Lee et al., 2003; Thimmulappa et al., 2002).

En condiciones de estado *redox* normales, el NRF2 está presente en el citoplasma de la célula y promueve solamente niveles de expresión basal de enzimas citoprotectoras. El NRF2 actúa como un factor de transcripción activador cuando penetra en el núcleo. El factor NRF2 tiene dos sitios o moléculas a las se puede unir, a) un represor citoplasmático Kelch like ECH asociado a la proteína 1 (KEAP1), el cual regula la estabilidad del NRF2 en el citoplasma en condiciones normales de estado *redox* (Hawkes et al., 2014), y b) la secuencia ARE, la cual es una zona aguas arriba de unión a genes citoprotectores presentes en el núcleo (Mitsuishi et al., 2012).

El KEAP1 actúa como represor de NRF2. En el citoplasma, el complejo KEAP1-NRF2 es ubiquitinado por el complejo Cullin 3 (Cul3)-KEAP1 ubiquitina ligasa hasta su degradación en el proteosoma (Hou et al., 2012; Shin et al., 2007; Singh et al., 2013). Este represor, mediante la ubiquitinación del dominio E3 ligasa en su composición estructural, mantiene regularmente la expresión basal del NRF2 en el citoplasma por poliubiquitinación. Además, el KEAP1 también ayuda en la transportación del NRF2 al proteosoma en la célula, para su degradación y reciclado. Hasta ahora, el KEAP1 ha sido identificado en humanos, ratas y ratones (Hawkes et al., 2014; Hayes et al., 2010; Kwak et al., 2002).

Es importante comprender los mecanismos por los cuales el KEAP1 posee la sensibilidad a las condiciones de estado *redox* normales y de estrés oxidativo, lo que da la capacidad de regular la supresión/represión del NRF2. El KEAP1 es una proteína con un citoesqueleto rico en tioles. Modificaciones en estos tioles le hace perder su capacidad de actividad ubiquitina ligasa (mediante la vía de la ruta de ubiquitinación), así como cambios en la actividad del complejo Cullin 3 (Cul3)-KEAP1 ubiquitina ligasa. Consecuentemente, el complejo Cul3-E3 se separa de KEAP1 y no permite la degradación del NRF2, por lo que éste se estabiliza en el citoplasma.

La posición citoplasmática del complejo NRF2-KEAP1 está regulada por NES (Nucleus Export Sequence) que transporta y mantiene al complejo fuera del núcleo, y que permanece sin modificar en un estado *redox* normal. Bajo condiciones de estrés oxidativo, NES es modificado, resultando en la pérdida de asociación de NRF2-KEAP1 (Chowdhry *et al.*, 2013; Rada *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2000). Una vez que el NRF2 se separa de su supresor (tanto KEAP1 como el complejo ubiquitin Cul3-E3 ligasa), este factor se transloca hacia el núcleo (Lu *et al.*, 2011).

El NRF2 translocado al núcleo recluta a la proteína *small muscle aponeurotic fibrosarcoma* (sMaf). El heterodímero NRF2-sMaf se une entonces a la secuencia ARE. Se promueve la expresión de los genes que posean esta secuencia, diferenciándose a priori dos tipos de genes, genes que codifican enzimas antioxidantes, y genes que codifican enzimas de fase II o detoxificantes. Entre las primeras enzimas se cuentan la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPx), y, entre las segundas, se incluyen los genes que codifican enzimas como hemo oxigenasa (HO1), NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión transferasa (GST). Las enzimas de fase II se encargarán de la detoxificación de sustancias tóxicas que provoquen daño y estrés celular, metabolizándolas y neutralizándolas. Las enzimas antioxidantes evitarán y repararan los daños provocados por estas sustancias tóxicas y el estrés oxidativo causado por las mismas.

1.4. EL TÉ BLANCO

Desde hace siglos se conocen las propiedades beneficiosas del té, y es ahora cuando se van redescubriendo dichas propiedades terapéuticas. El té es una infusión a base de hojas extraídas de la planta denominada *Camelia sinensis*, que puede ser usado en la

prevención de enfermedades como el cáncer, las cardiopatías y enfermedades neurodegenerativas (Jacob, 1995; Duthie *et al.*, 2000; Serafini *et al.*, 2002; Erba *et al.*, 2002; Koo & Cho, 2004). El té blanco se diferencia del té verde en el método de procesamiento (tiempo de fermentación) y en el momento de recogida de la planta, ya que el té blanco está hecho a partir de brotes y hojas etioladas y no de hojas ya abiertas, como ocurre en el té verde. Se ha descrito que la ingesta de té verde, de té blanco o de infusiones de *Pelargonium purpureum* tiene efectos antioxidantes en plasma y también en algunos órganos, como corazón y pulmón (Koutelidakis *et al.*, 2009).

Pocos estudios con té blanco han sido realizados con el objetivo de medir tanto el incremento de la capacidad antioxidante en tejidos y en órganos como el efecto sobre la dieta *in vivo* (Paganga & Rice-Evans., 1997; Serafini *et al.*, 2000). Es una hipótesis razonable que el incremento de la capacidad antioxidante en los órganos y en los tejidos puede ocurrir como consecuencia del consumo de alimentos y de hierbas ricas en compuestos antioxidantes.

El té contiene varios tipos de moléculas: vitaminas, purinas, aminoácidos, cafeína, aceites volátiles, minerales y polifenoles. Los efectos beneficiosos de esta bebida son debidos a una clase de polifenoles, los flavonoides, en los cuales se incluyen las catequinas, que muestran una elevada capacidad antioxidante. Son creados por el metabolismo propio de la planta, dándose una gran cantidad de estructuras fenólicas que tienen propiedades biológicas únicas, considerándose los principales responsables de la mayoría de los efectos beneficiosos atribuidos al té. Los polifenoles del té presentan una alta capacidad de capturar radicales libres, llegando a ser en algunos casos, 5 veces más efectivos que la vitamina C o la vitamina E.

Las principales catequinas del té blanco y verde (**Figura 9**) son: catequina (C), epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina (EGC) y epicatequina (EC).

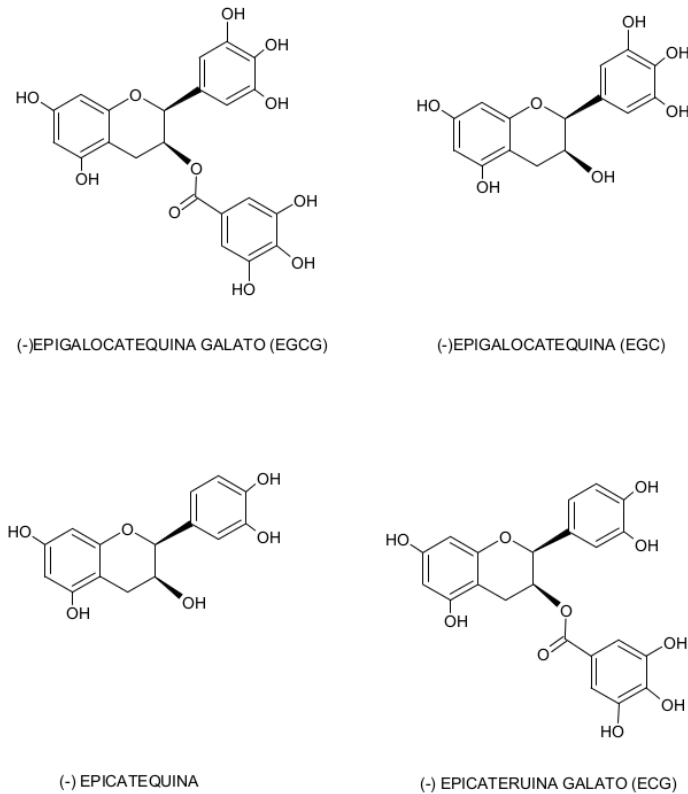


Figura 9.- Estructura molecular de algunas de las catequinas presentes en el té.

Se han detectado compuestos fenólicos del té incorporados a las células de diferentes tejidos como cerebro, corazón, riñón, bazo, páncreas y órganos reproductores en rata y ratón (de Boer *et al.*, 2005; Crozier *et al.*, 2009). Estos compuestos fenólicos, después de la absorción, son transferidos a través de la sangre a diferentes órganos (Scalbert *et al.*, 2002). Los flavonoides del té están compuestos principalmente por catequinas, como la (-) epicatequina y (+) catequina, esta última se ha visto que tiene una alta tasa de absorción, siendo considerado el principal agente terapéutico (Hackett *et al.*, 1983). Sin embargo, el resto de los flavonoides del té, aún mostrando una alta actividad *in vivo*, han resultado tener poca biodisponibilidad, tanto en ratas (Chen *et al.*, 1997) como en humanos (Yang *et al.*, 1998).

Por otra parte, Tenore *et al.*, (2015) más recientemente ha estudiado la biodisponibilidad tres de los tipos más relevantes de té: el té verde, el té negro y el té blanco. Este trabajo observó que el té blanco analizado poseía una mayor cantidad de catequinas que los otros dos tipos de té estudiados (**Figura 10**). Además, se observó una mayor biodisponibilidad en saliva, mucosa gástrica y tejido intestinal, así como una

mayor absorción en un modelo de cultivo celular de células Caco-2 (**Figuras 11, 12, 13 y 14**). Estos datos indican que el té blanco supera tanto en cantidad de polifenoles como en biodisponibilidad de los mismos al té verde y negro, así como una mayor absorción y transporte en plasma (**Tabla 2**).

Todavía no se han descrito con precisión todas las rutas en las que el té actúa de manera beneficiosa, pero se han propuesto las siguientes: búsqueda de especies reactivas de oxígeno y su neutralización (Wiseman *et al.*, 1997), modificación de senderos de transducción de señal, puntos de control del ciclo celular y apoptosis (Ahmad *et al.*, 1997; Paschka & Butler, 1998; Li *et al.*, 2000), y la inducción de varias actividades de enzimas relacionadas con el metabolismo de drogas y desintoxicación de agentes cancerígenos (Khan *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996). A través de estos mecanismos, el té ha demostrado tener excelentes propiedades quimio-protectoras (Lou *et al.*, 1999) en modelos de cáncer de piel, pulmón (Zhang *et al.*, 2000), esófago (Wang *et al.*, 1995) y gastrointestinal (Xu *et al.*, 1996; Hernaez *et al.*, 1998).

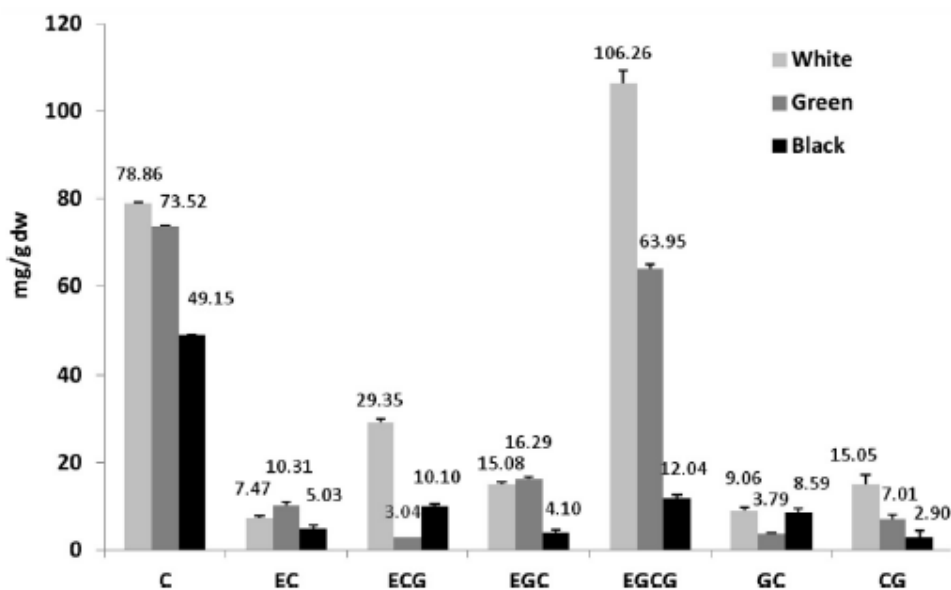


Figura 10.- Perfil de polifenoles de muestras de té. El contenido en polifenoles está expresado como el valor de la media (mg/g de peso seco de hojas de té) \pm Desviación estandar (n=5). Las medias tienen diferencias significativas según el test de Tukey-Kramer de comparación múltiple ($P > 0.05$). C: (+)-catequina; EC: (-)-epicatequina; ECG: (-)-epicatequina galato; EGC: (-)-epigalocatequina; EGCG: (-)-epicalocatequina galato; GC: (-)-galocatequina; CG: (-)-catequina galato (Tenore *et al.*, 2015).

Los grupos di- o tri-hidroxilo confieren a la estructura de las catequinas su alta capacidad antioxidante. En el caso de EGCG y ECG presentan tres grupos hidroxilo en el anillo extra (galato) que incrementa esta capacidad. Así, las catequinas son capaces de reaccionar con las *EROS* como el radical superóxido, oxígeno singlete, radical hidroxilo, radical peróxido, óxido nítrico, dióxido de nitrógeno y peroxinitrito. La estructura polifenólica del anillo B permite una deslocalización electrónica, confiriéndole una alta capacidad para neutralizar radicales libres (Yang, 2009).

Como se indica en la **Figura 10**, el contenido de las diferentes catequinas varía dependiendo del tipo de té. Por tanto, se observa una mayor o menor efectividad de la capacidad antioxidante según la variedad de té, ya que debido a su origen y al procesamiento recibido, contienen diferentes proporciones de polifenoles, siendo muy importante la cantidad de EGCG.

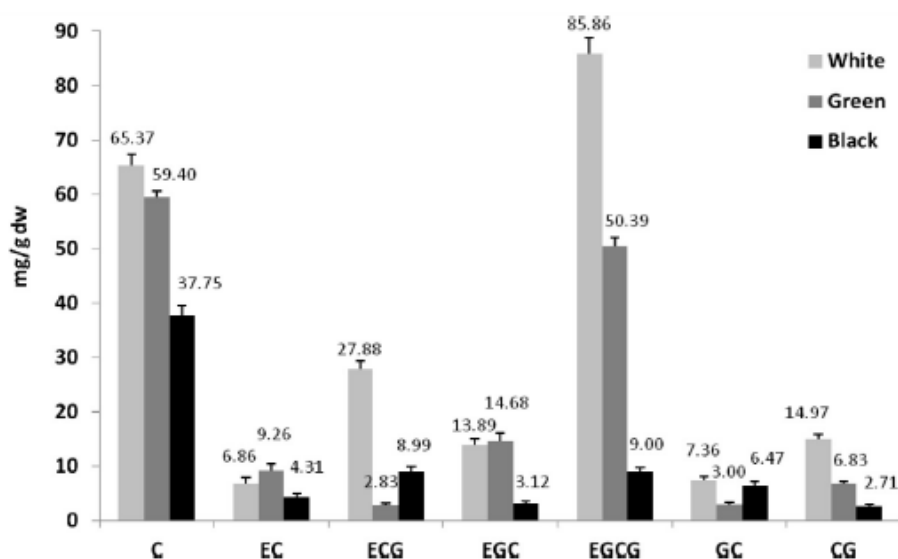


Figura 11.- Biodisponibilidad de los polifenoles de muestras de té en la saliva. El contenido en polifenoles está expresado como el valor de la media (mg/g de peso seco de hojas de té) \pm Desviación estandar (n=5). Las medias tienen diferencias significativas según el test de Tukey-Kramer de comparación múltiple ($P > 0.05$). C: (+)-catequina; EC: (-)-epicatequina; ECG: (-)-epicatequina galato; EGC: (-)-epigalocatequina; EGCG: (-)-epicalocatequina galato; GC: (-)-galocatequina; CG: (-)-catequina galato (Tenore *et al.*, 2015).

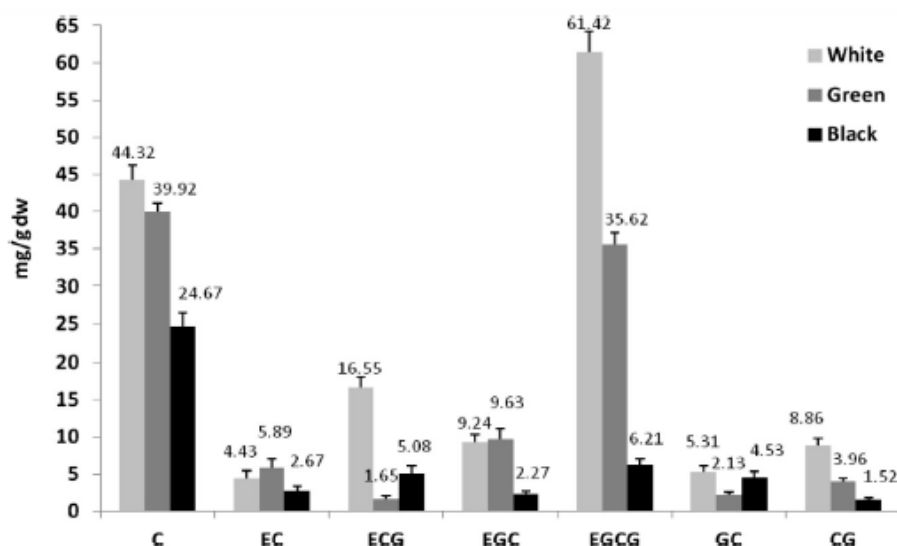


Figura 12.- Biodisponibilidad gástrica de los polifenoles de muestras de té. El contenido en polifenoles está expresado como el valor de la media (mg/g de peso seco de hojas de té) \pm Desviación estandar (n=5). Las medias tienen diferencias significativas según el test de Tukey-Kramer de comparación múltiple ($P > 0.05$). C: (+)-catequina; EC: (-)-epicatequina; ECG: (-)-epicatequina galato; EGC: (-)-epigalocatetquina; EGCG: (-)-epicalocatequina galato; GC: (-)-galocatequina; CG: (-)-catequina galato (Tenore *et al.*, 2015).

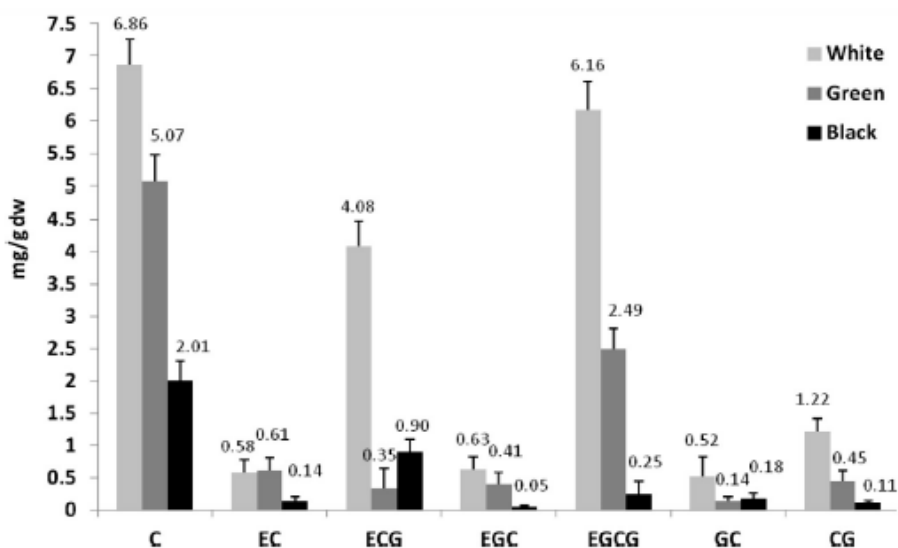


Figura 13.- Biodisponibilidad intestinal de los polifenoles de muestras de té. El contenido en polifenoles esta expresado como el valor de la media (mg/g de peso seco de hojas de té) \pm Desviación estandar (n=5). Las medias tienen diferencias significativas según el test de Tukey-Kramer de comparación múltiple ($P > 0.05$). C: (+)-catequina; EC: (-)-epicatequina; ECG: (-)-epicatequina galato; EGC: (-)-epigalocatetquina; EGCG: (-)-epicalocatequina galato; GC: (-)-galocatequina; CG: (-)-catequina galato (Tenore *et al.*, 2015).

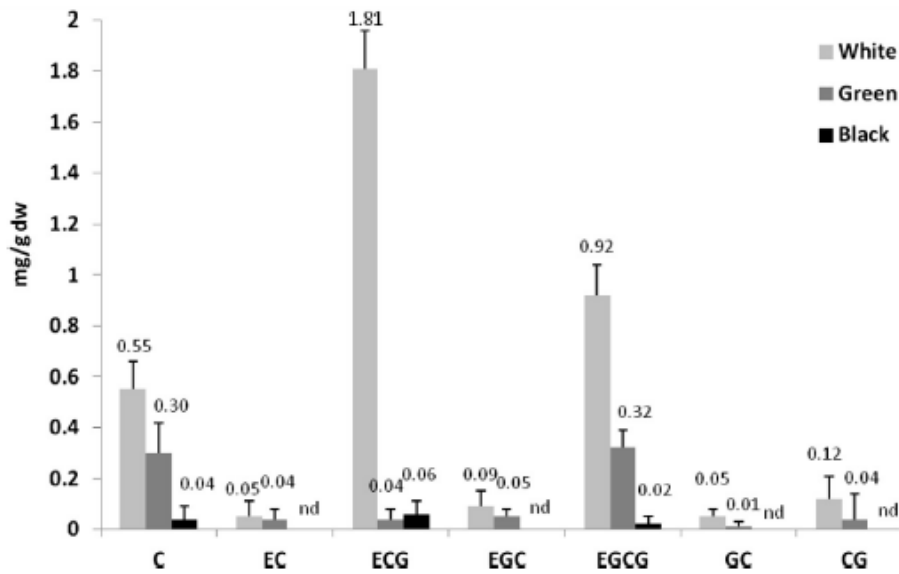


Figura 14.- Viabilidad de los polifenoles de muestras de té evaluada usando una línea celular Caco-2 como modelo de absorción en el intestino delgado. El contenido en polifenoles está expresado como el valor de la media (mg/g de peso seco de hojas de té) \pm Desviación Estandar (n=5). Las medias tienen diferencias significativas según el test de Tukey-Kramer de comparación múltiple ($P > 0.05$). C: (+)-catequina; EC: (-)-epicatequina; ECG: (-)-epicatequina galato; EGC: (-)-epigalocatequina; EGCG: (-)-epicalocatequina galato; GC: (-)-galocatequina; CG: (-)-catequina galato (Tenore *et al.*, 2015).

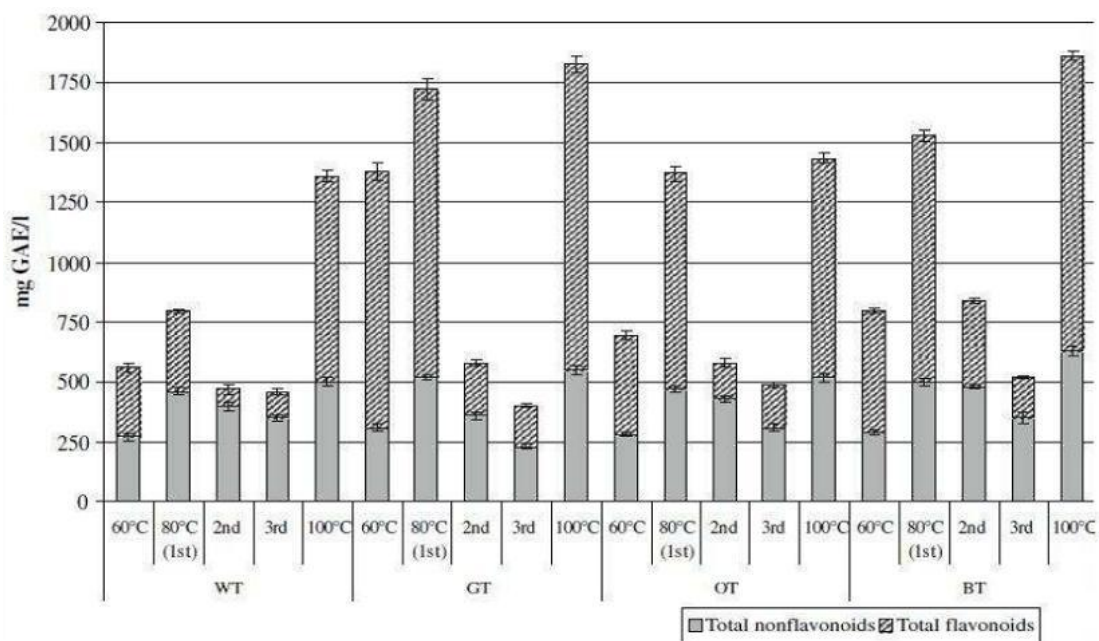


Figura 15.- Contenido total de flavonoides y de compuestos no flavonoides a diferentes temperaturas, y tras sucesivas extracciones (hasta 3) en el té blanco (WT), té verde (GT), té Oolong (OT) y té negro (BT) (Horžić *et al.*, 2009).

Tabla 2.- Porcentajes de biodisponibilidad de los componentes polifenoles del té unidos a proteínas plasmáticas. Los datos se expresan como la media \pm Desviación Estandar (n=5). Las medias tienen diferencias significativas según el test de Tukey-Kramer de comparación múltiple ($P>0.05$) (Tenore *et al.*, 2015).

	HSA	HDL	LDL	VLDL
C	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	nd
EC	0.6 \pm 0.4	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.3	nd
ECG	38.1 \pm 0.9	38.7 \pm 1.6	18.7 \pm 0.8	0.4 \pm 0.5
EGC	0.6 \pm 0.2	0.2 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	nd
EGCG	39.2 \pm 0.9	37.6 \pm 1.6	16.9 \pm 0.8	0.5 \pm 0.5
GC	0.5 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.2	nd
CG	39.7 \pm 1.5	36.8 \pm 1.4	17.9 \pm 0.9	0.4 \pm 0.3

C: (+)-catequina; **EC:** (-)-epicatequina; **ECG:** (-)-epicatequina galato; **EGC:** (-)-epigallocatequina; **EGCG:** (-)-epigallocatequina galato; **GC:** (-)-galocatequina; **CG:** (-)-catequina galato; **HSA:** albumina de suero humana; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; **VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad; **nd:** no detectado

En los últimos años, varios grupos de investigadores han profundizado en las diferencias de composición que presenta el té debido a los distintos procesamientos a los que se le somete. En la **Figura 15** se muestran las principales diferencias en la composición de los 4 tipos de té más consumidos. Independientemente de la temperatura a la que se realice la extracción, el estudio de Horžič *et al.* (2009) mostró unos valores de contenido total en polifenoles, en general, menores en el té blanco, siendo el té verde el que presenta una mayor cantidad de polifenoles y flavonoides.

Concretando aún más, EGCG es la catequina más abundante en los 4 tipos de té, siendo el té verde el que presenta mayor cantidad de ésta y del resto de catequinas, mientras que el té blanco presenta los niveles más bajos para todas ellas (en este estudio). El té negro es el que presenta un mayor contenido en ácidos fenólicos. Todos los tipos de té presentan ciertas cantidades de cafeína, disminuyendo su contenido en el siguiente orden: té blanco > té oolong > té verde > té negro (Horžič *et al.*, 2009).

Por otro lado, en el trabajo realizado por Tenore *et al.* (2015) más recientemente, es el té blanco, en general, el que posee una mayor biodisponibilidad (**Figuras 10, 11, 12, 13 & 14**).

Hay distintas maneras de observar los efectos protectores del té frente al estrés oxidativo. El presente estudio se ha centrado en los efectos protectores del te blanco ante un estrés oxidativo agudo, siendo el modelo representativo de situaciones puntuales de alto estrés oxidativo (como infartos...). Para ello, es necesario un agente altamente oxidante, capaz de simular las características del estrés oxidativo agudo.

1.5. LA ADRIAMICINA

La **adriamicina** (ADR) es un antibiótico aislado de la bacteria *Streptomyces peucetis* a comienzos de los años 60. También se conoce como **doxorubicina** y es una quinona del grupo de las antraciclinas que se caracteriza por una estructura tetracíclica unida a un residuo de azúcar (DeGraff *et al.*, 1994). La ADR es capaz de generar una gran variedad de radicales libres *in vivo* y en esto radica la importancia de su acción citotóxica (Halliwell & Gutteridge, 1989), acción que ha sido usada clínicamente en el tratamiento del cáncer. Ha demostrado tener actividad terapéutica frente a varias clases de tumores, como el de mama, sarcoma de Kaposi, carcinoma de esófago, linfoma Hodgkins y linfoma no Hodgkins, y otros carcinomas de vejiga y tiroides. Sin embargo, ha resultado tener efectos secundarios graves, tanto agudos (náuseas, vómitos, mielosupresión, arritmias...), los cuales son tratables clínicamente y son reversibles, como crónicos (cardiomiopatías e insuficiencia cardiaca), los cuales son irreversibles y con mal pronóstico, pudiendo quedar latentes durante años. Estos pronósticos sólo se dan en pacientes que han recibido grandes dosis prolongadas (500 mg/m²) (Wiernik & Dutcher, 1992; Murphy *et al.*, 1995; Wallace, 2003, Lipshultz *et al.*, 2006).

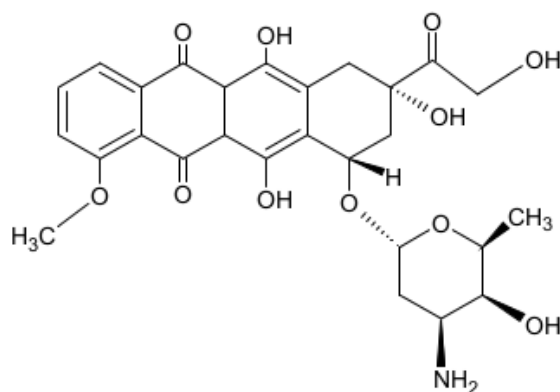


Figura 16.- Estructura química de la adriamicina.

La adriamicina (**Figura 16**) pertenece a una clase de antraciclinas que exhibe una potente actividad antitumoral, presumiblemente por la capacidad de unirse directamente al DNA y de insertarse entre los pares de bases y formar enlaces entre éstos y otras partes de la doble hélice. Además, se ha sugerido que la ADR interactúa, quizás exclusivamente, con la mitocondria (**Figura 17**) debido a su cese de funciones (Jung & Reszka, 2001). Los efectos citotóxicos de las antraciclinas se han atribuido a la acumulación de éstas en los lípidos de la membrana mitocondrial y la actividad *redox* inherente produce un daño en las uniones membranales entre las proteínas y las enzimas. Esta actividad específica en la mitocondria se ha correlacionado con una alta afinidad de esta molécula a los fosfolípidos y a la cardiolipina que son específicos de la membrana mitocondrial. Interacciona con el complejo I de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria en su proceso de metabolización, produciendo así su potente efecto tóxico a nivel mitocondrial. La toxicidad de la adriamicina está asociada a los parámetros de estrés oxidativo, que incluyen la oxidación de lípidos, proteína y material genético. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones para crear sustancias con menos efectos secundarios (sobre todo menos efectos tóxicos en el corazón), probándose numerosos análogos y derivados estructurales. Aun así, la doxorubicina sigue siendo el agente más utilizado (Weiss, 1992). Se han intentado distintas maneras de disminuir la toxicidad de la adriamicina, alguna de éstas se llevaban a cabo introduciendo el agente antineoplásico en liposomas, con el fin de disminuir la exposición del agente al entorno (Bóoser & Hortobahyi, 1994). También se han realizado pruebas mezclando la adriamicina con otro agente que disminuya sus efectos cardiotóxicos, como por ejemplo la adición de dextrazoxano, un fármaco que elimina el exceso de radicales libres, produciéndose una disminución de casos de trastornos cardíacos, ya que no provoca tantos daños en el corazón (Weiss, 1992).

Con este último caso, se crea la hipótesis de reducir los efectos secundarios de la adriamicina, administrando antioxidantes que neutralicen la acción de los radicales libres producidos por ella (van Acker *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2005). Los estudios demuestran que los flavonoides se localizan en las proximidades de la superficie de la membrana lipídica y consiguen captar los radicales libres, previniendo así la peroxidación lipídica de la misma expuesta a las *EROs* en fase acuosa (Terao *et al.*, 1994).

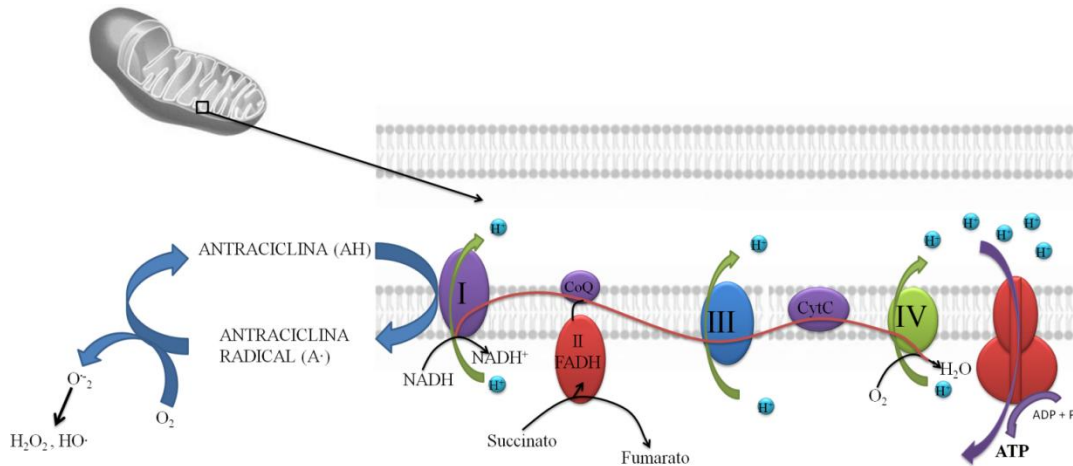


Figura 17.- Mecanismo de inhibición de la función mitocondrial por la adriamicina.

Así pues, la aplicación clínica de la adriamicina ha sido restringida por sus efectos cardiotóxicos y nefrotóxicos. Oz & Ilhan (2006), en sus estudios han descrito que en los grupos tratados con adriamicina, los niveles de malondialdehído en riñón, pulmón, hígado y cerebro fueron más elevados, pero los niveles de glutatión disminuyeron en comparación con las ratas control, por lo que estamos hablando de una sustancia altamente oxidante, la cual distorsiona el balance entre los radicales libres (ROS) y los antioxidantes. El desequilibrio resultante causa daño celular, observándose peroxidación lipídica y oxidación de proteínas (Karaman *et al.*, 2006).

Las enzimas antioxidantes endógenas, como la superóxido dismutasa y la catalasa, pueden mitigar los efectos de las *EROs* creadas, pero estas enzimas se ven rápidamente desbordadas por la enorme cantidad de éstos. Diferentes estudios han demostrado que la administración de adriamicina está asociada en el hígado a procesos inflamatorios, radicales libres, estrés oxidativo y peroxidación lipídica. La regulación de estos procesos ha sido considerada necesaria para prevenir el daño en estos órganos ocasionado por la utilización terapéutica de la adriamicina. (Abd El-Aziz *et al.*, 2001; Yagmurca *et al.*, 2004; Fadillioglu *et al.*, 2004).

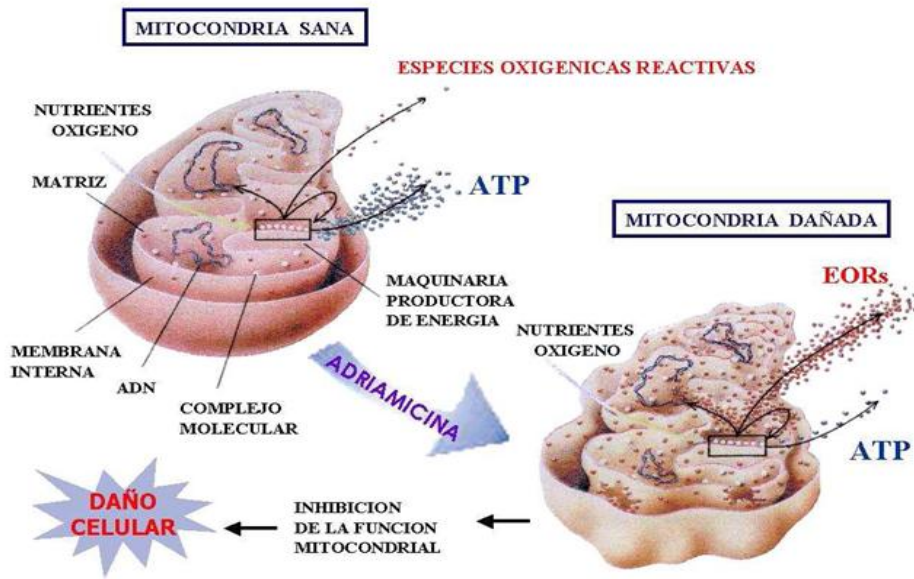


Figura 18.- Daño mitocondrial causado por adriamicina.

Existen varios mecanismos mediante los cuales la adriamicina ocasiona daño al organismo. La adriamicina se intercala en el ADN ocasionando la inhibición de la síntesis de macromoléculas. Además, presenta una alta capacidad de generar radicales libres (Gewirtz, 1999). Uno de los mecanismos a través de los cuales este antibiótico induce la formación de radicales libres es como resultado de la reducción de la adriamicina a semiquinona, por las enzimas NADPH-P₄₅₀ reductasa microsomal y NADH deshidrogenasa del complejo I mitocondrial (Goodman y Hochstein, 1977). En presencia de oxígeno, el radical semiquinona da lugar a radicales superóxido que por dismutación se generarán otros radicales libres. La adriamicina puede también formar radicales libres por vías no enzimáticas, como la mediada por el ión de hierro (Fe³⁺). Cuando el Fe³⁺ reacciona con los grupos cetona e hidroxilo de la adriamicina, los electrones son captados por el Fe, formando un complejo ADR-ión Fe²⁺, que genera radicales libres (Olson & Mushlin, 1990).

Durante el proceso de metabolización, el antibiótico induce la formación de las EROs, y se produce un fenómeno conocido como transición de la permeabilidad mitocondrial o *mitochondrial permeability transition*. Este fenómeno consiste en una transformación de las características de la membrana mitocondrial interna, es decir, la membrana mitocondrial interna pasa de ser una barrera altamente restrictiva, capaz de

excluir moléculas tan pequeñas como el ión hidrógeno, a otra que permite la difusión pasiva de solutos de hasta 1.500 Daltons (**Figura 18**).

La transición de la permeabilidad mitocondrial se puede observar en diversas patologías, sobre todo en las asociadas con el estrés oxidativo, siendo además uno de los efectos del tratamiento con adriamicina. Como efecto de la transición de la permeabilidad mitocondrial se produce una interferencia en las rutas mitocondriales dependientes de calcio y de la síntesis calcio-estimulante del ATP (Wallace, 2003), con la consecuente disminución de ATP. Es decir, el antibiótico produce *EROs* que alteran las proteínas de la cadena electrónica mitocondrial y además modifica la permeabilidad de la membrana mitocondrial, por lo que disminuye la síntesis de ATP.

2. Objetivos

Los objetivos del presente estudio han sido los siguientes:

Primero. Evaluar los efectos de la ingestión de té blanco sobre el peso corporal, ingesta alimentaria, utilización de la proteína y absorción de minerales seleccionados (Ca, P, Mg, Fe y Zn) en rata.

Segundo. Valorar el efecto del consumo a largo plazo de té blanco administrado frente al estrés oxidativo agudo producido por adriamicina en microsomas hígado, corazón y cerebro de rata.

Tercero. Investigar los mecanismos genéticos y moleculares a través de los cuales la ingestión de extracto de té blanco protege frente al estrés oxidativo agudo.

Cuarto. Clarificar los mecanismos protectores genéticos y enzimáticos que están implicados en la protección del riñón como resultado de la ingesta a largo plazo de extracto de té blanco.

Quinto. Estudiar los efectos de la adriamicina y del té blanco sobre la capacidad antioxidante en plasma y el perfil de ácidos grasos en microsomas de hígado y corazón en rata.

3. Capítulos Experimentales

3.1. CAPITULO EXPERIMENTAL 1

WHITE TEA CONSUMPTION SLIGHTLY REDUCES IRON ABSORPTION BUT NOT GROWTH, FOOD EFFICIENCY, PROTEIN UTILIZATION, OR CALCIUM, PHOSPHORUS, MAGNESIUM, AND ZINC ABSORPTION IN RATS

3.1.1. Introduction

Tea is the second most commonly consumed beverage in the world after water. Different kinds of tea are produced from the leaves of *Camellia sinensis*: white and green tea (both unfermented), Oolong and red tea (both partially fermented), and black tea (fermented). Green and black teas are well known, but currently, there is no generally accepted definition of white tea and very little international agreement on the same. Some producing countries define white tea by plucking standard, i.e., only the buds or first leaves of *C. sinensis* that are steamed and dried immediately after picking with minimal processing to prevent oxidation. In this way, the delicate white leaf hairs are left intact, giving the resulting tea a “white” coloration and a delicate taste (Hilal & Engelhardt, 2007; Rusak *et al.*, 2008).

Many animal and human studies have linked tea consumption to a reduction in the risk of several chronic diseases, especially cardiovascular diseases, cancer, and diabetes, but also with positive effects on bone density, cognitive function, dental caries, and kidney stones, and with anti-microbial, antiallergenic, and anti-inflammatory activities, among other health promotion properties (Cabrera *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2007; Almajano *et al.*, 2008). These protective effects have been attributed to the polyphenols found in tea (Dufresne & Farnworth, 2001; Manach *et al.*, 2005; Khan & Mukhtar, 2007). On the other hand, most polyphenols from tea, such as tannic acid, gallotannin, catechin, and proanthocyanidin, might possess antinutritional properties since they form insoluble complexes with proteins and certain mineral elements in the lumen of the gastrointestinal tract, causing decreased absorption of these nutrients, particularly non-heme iron (Greger & Lyle, 1988; Cahng *et al.*, 1994; Hurrell *et al.*, 1999; Hamdaouia *et al.*, 2003; Thankachan *et al.*, 2008). Tea polyphenols might also inhibit digestive enzymes, such as α -amylase, pepsin, trypsin, and lipase and reduce food digestibility (He *et al.*, 2006).

White tea is the rarest, the least processed, and the least known among tea types. In recent years, some studies have investigated the antioxidant and antimutagenic activities of white tea, which were seen to be correlated with their polyphenol contents (Santana-Rios *et al.*, 2001; Rusak *et al.*, 2008; Koutelidakis *et al.*, 2009). However, unlike other kinds of tea, such as green, Oolong, or black tea, the potential antinutritional effects of

white tea have not been investigated despite its known higher epigallocatechin-3-gallate and methylxanthine concentrations (Hilal & Engelhart, 2007; Almajano et al., 2008).

The aim of the present study was to assess the effects of two doses of white tea extracts on body weight gain, food intake, food efficiency, dietary protein utilization, and the absorption of selected minerals in rats (calcium, phosphorus, magnesium, iron, and zinc).

3.1.2. Materials and methods

3.1.2.1. Animals and diets

The study protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki principles and was approved by the Bioethical Committee of the University of Murcia, Spain.

A total of 60 6-week-old Sprague–Dawley rats age were purchased from the University Animal Centre (Murcia, Spain) and acclimated for 1 week prior to starting the experiment. Animals were housed individually in metabolism cages and maintained in a room under the following controlled conditions: temperature $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, relative humidity $55\pm 5\%$, ventilation frequency 18 times per hour, and a 12-h light–dark cycle.

Rats were assigned randomly to two groups of 30 animals, consisting of 15 males and 15 females. Each group was assigned to one of the two digestibility trials performed (trial 1 and 2), which lasted 3 and 30 days, respectively. Each trial consisted of three assays, corresponding to the daily administration of a dose of 0, 15, or 45 mg of the tea solid extract per kilogram body weight (0, 4, or 12 mg polyphenols per kilogram body weight, respectively) administered in the drinking water. We estimated that these doses contained amounts of tea equivalent to those consumed by humans drinking 0, 3, and 9 cups of tea daily, respectively.

Rats were weighed at the beginning and the end of each assay after 12 h fasting. Feces and urine were collected separately throughout the 3 days and the last 7 days of trials 1 and 2, respectively. All animals had free access to diet and double-distilled deionized water with or without tea. Their diet in both trials was a commercial rat feed (Global Rodent Maintenance 2014, Harlan Interfauna Iberica, SA, Barcelona, Spain).

3.1.2.2. Preparation of tea infusion

White tea (30 g, Sara Lee Southern Europe S.L., Mollet del Vallés, Barcelona, Spain) was mixed with 500 ml boiling double-distilled, deionized water for 5 min, with constant shaking, and the samples were filtered through Whatman no. 1 filter paper (Whatman Schleicher & Schuell, Castelldefels, Spain). The tea infusions were freeze-dried, and the solid extracts were kept at -20°C until use. The total phenol content was analyzed by the Folin–Ciocalteu method, and the profile of the main catechins was determined by capillary electrophoresis, as previously reported by Almajano et al. [1]. The white tea used in the present study contained $2,180\pm 161$ mg of total polyphenols/100 g tea leaves, expressed as milligram gallic acid equivalent per liter of infusion. The main catechin present in this kind of tea is epigallocatechin-3-gallate ($1,525\pm 113.4$ mg/100 g tea leaves) and several other polyphenols such as epigallocatechin and epicatechin, as well as methylxanthines theobromine and caffeine are also present [1].

3.1.2.3. Analytical methods

The feces were freeze-dried, weighed, and ground to a fine powder. Diet, feces, and urine were analyzed for nitrogen, which was determined by the Kjeldahl method. Diet and feces were analyzed for minerals (calcium, phosphorus, magnesium, iron, and zinc). Diet and feces were ashed in a muffle oven (Naberthem L9/11/B179, Naberthem GmbH, Lilienthal, Germany) at 450°C for 18 h. After adding concentrated HNO_3 and heating at 100°C for 1 h, the ashed samples were redissolved in concentrated HCl and diluted for analysis. The mineral concentrations of each ashed sample were measured using a sequential inductively coupled plasma atomic emission spectrometer system (Optical Emission Spectrometer Optima 2000 DV, Perkin Elmer Instruments, Wellesley, MA, EEUU).

3.1.2.4. Calculations

The following were calculated: feed efficiency (FE)= body weight gain (grams)/food intake (grams); protein efficiency ratio (PER)=body weight gain (grams)/ protein intake (grams); apparent protein digestibility (APD)= $100\times(\text{nitrogen intake}-\text{fecal nitrogen excretion})/\text{nitrogen intake}$; biological value (BV)= $100\times(\text{nitrogen intake}-\text{fecal nitrogen excretion})/\text{nitrogen intake}$.

excretion–urinary nitrogen excretion)/(nitrogen intake–fecal nitrogen excretion); nitrogen balance (NB)=100×(nitrogen intake– fecal nitrogen excretion–urinary nitrogen excretion)/ nitrogen intake; and apparent absorption of calcium, phosphorus, magnesium, iron and zinc (percent)=100× [Ca (P, Mg, Fe, Zn) intake–fecal Ca (P, Mg, Fe, Zn) excretion]/Ca (P, Mg, Fe, Zn) intake.

3.1.2.5. Statistical analysis

All data were analyzed using SPSS for windows (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA). The results are given as mean values±standard deviation. Statistical analyses between genders were performed by Student's t test if normality and homogeneity were confirmed. Otherwise, the Mann–Whitney test was applied. Differences between the values obtained in trials 1 and 2 were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) if normality and homogeneity were confirmed. Otherwise the Kruskal–Wallis test was applied. The level of significance was set at 5% for all analyses (P<0.05).

3.1.3. Results

Data from male and female rats were analyzed and presented separately because significant gender-based differences were found for some of the parameters evaluated. As expected, daily body weight gain, food intake, FE, and PER were significantly higher in male than in female rats; male rats showed higher BV and NB than female rats, while APD did not differ between sexes (**Tables 1 and 2**). White tea extract fed to rats at 15 or 45 mg of the tea solid extract per kilogram body weight (4 or 12 mg polyphenols per kilogram body weight, respectively) for both 3 or 30 days (trials 1 and 2, respectively) did not significantly influence daily body weight gain, food intake, FE, or PER. Neither were the indices of digestive (APD) and metabolic (BV, NB) utilization of dietary protein affected by white tea consumption at the two doses analyzed (**Tables 1 and 2**).

The apparent absorption of magnesium and zinc was higher for male than female rats (**Table 3**). The apparent absorption of calcium, phosphorus, magnesium, and zinc in both male and female rats did not differ significantly from the control groups (0 mg/kg) at either dose of white tea extract administered for 3 or 30 days (**Table 3**). In contrast,

apparent iron absorption was slightly but significantly ($P<0.05$) reduced (15–18%) in rats at the highest dose of white tea extract (12 mg of the polyphenols per kilogram body weight per day, equivalent to 9 cups of tea in humans) for both 3 and 30 days of consumption (**Figure 1**).

Table 1 Daily body weight gain, food intake, feed efficiency, and protein biological coefficients in rats consuming different doses of white tea for 3 days (digestibility trial 1)

	Male rats			Females rats			P^a
	Control	White tea 15 mg/kg bw	White tea 45 mg/kg bw	Control	White tea 15 mg/kg bw	White tea 45 mg/kg bw	
Body weight gain (g/day)	4.9±1.0	5.7±1.5	5.2±1.6	3.7±1.6	3.4±1.2	3.3±1.6	0.002
Food intake (g/day)	16.3±1.7	15.3±1.4	14.8±2.4	13.4±1.0	13.9±1.3	14.5±1.3	0.049
Feed efficiency	0.30±0.07	0.37±0.08	0.35±0.09	0.27±0.10	0.25±0.08	0.23±0.11	0.002
Protein efficiency ratio	1.99±0.48	2.45±0.28	2.31±0.64	1.83±0.68	1.63±0.55	1.52±0.73	0.002
Apparent protein digestibility (%)	77.9±1.6	79.7±0.8	78.5±2.0	78.7±2.2	76.9±1.0	78.5±1.0	0.428
Biological value (%)	47.1±2.6	46.9±6.0	49.5±9.5	44.8±4.9	40.9±5.2	43.3±4.9	0.048
Nitrogen balance (%)	36.7±2.5	37.4±4.8	38.3±7.8	35.2±3.3	31.5±3.7	34.0±4.1	0.025

Values are expressed as means±standard deviation ($n=5$)

bw body weight

^a Significant differences between sex (Student's t test or Mann–Whitney test)

Table 2 Daily body weight gain, food intake, feed efficiency, and protein biological coefficients in rats consuming different doses of white tea for 30 days (digestibility trial 2)

	Male rats			Females rats			P^a
	Control	White tea 15 mg/kg bw	White tea 45 mg/kg bw	Control	White tea 15 mg/kg bw	White tea 45 mg/kg bw	
Body weight gain (g/day)	3.6±0.9	4.9±1.8	4.9±1.9	1.9±0.9	1.3±0.8	1.6±0.2	0.001
Food intake (g/day)	14.2±0.8	15.5±1.7	16.8±1.4	14.3±1.2	14.2±1.7	12.7±1.2	0.011
Feed efficiency	0.25±0.05	0.31±0.08	0.29±0.12	0.13±0.06	0.09±0.02	0.13±0.02	0.001
Protein efficiency ratio	1.65±0.34	2.02±0.51	1.88±0.79	0.85±0.38	0.61±0.21	0.84±0.13	0.001
Apparent protein digestibility (%)	79.8±1.8	80.8±1.9	80.8±2.1	79.5±1.8	79.9±1.9	80.3±1.5	0.357
Biological value (%)	48.6±6.5	53.6±2.7	57.9±8.6	38.2±7.1	37.4±7.0	39.2±8.9	0.001
Nitrogen balance (%)	38.8±5.4	43.3±2.9	46.8±6.9	30.3±5.7	29.9±4.9	31.5±7.0	0.001

Values are expressed as means±standard deviation ($n=5$)

bw body weight

^a Significant differences between sex (Student's t test or Mann–Whitney test)

Table 3 Apparent absorption of calcium, phosphorus, magnesium, and zinc in rats consuming different doses of white tea for both 3 and 30 days (digestibility trials 1 and 2, respectively)

Apparent absorption (%)	Male rats			Females rats			<i>P</i> ^a
	Control	White tea 15 mg/kg bw	White tea 45 mg/kg bw	Control	White tea 15 mg/kg bw	White tea 45 mg/kg bw	
Trial 1 (3 days)							
Calcium	40.8±5.1	43.9±7.8	42.9±4.7	47.3±5.6	40.7±3.8	45.8±5.8	0.194
Phosphorus	29.5±5.0	31.9±6.5	33.5±6.2	33.7±4.5	25.8±4.0	29.8±5.4	0.617
Magnesium	37.1±5.7	39.6±7.5	44.8±7.4	35.1±3.1	30.4±4.6	33.6±4.3	0.045
Zinc	43.2±4.0	40.7±5.3	42.4±4.6	31.9±4.1	29.4±5.5	33.6±5.7	0.001
Trial 2 (30 days)							
Calcium	30.1±5.4	30.6±2.4	34.0±4.7	37.9±6.7	35.9±5.4	37.1±4.9	0.056
Phosphorus	28.5±2.9	34.5±4.7	33.8±3.7	30.7±6.0	27.3±5.3	29.2±3.9	0.129
Magnesium	41.4±7.8	42.2±6.4	44.1±5.2	31.4±5.9	33.6±2.6	32.7±2.7	0.016
Zinc	40.1±4.9	41.9±5.0	42.5±5.2	29.3±3.1	32.2±3.2	31.8±2.8	0.001

Values are expressed as means±standard deviation (*n*=5)

bw body weight

^a Significant differences between sex (Student's *t* test or Mann–Whitney test). No significant differences between values from trials 1 and 2 were observed (ANOVA or Kruskal–Wallis test)

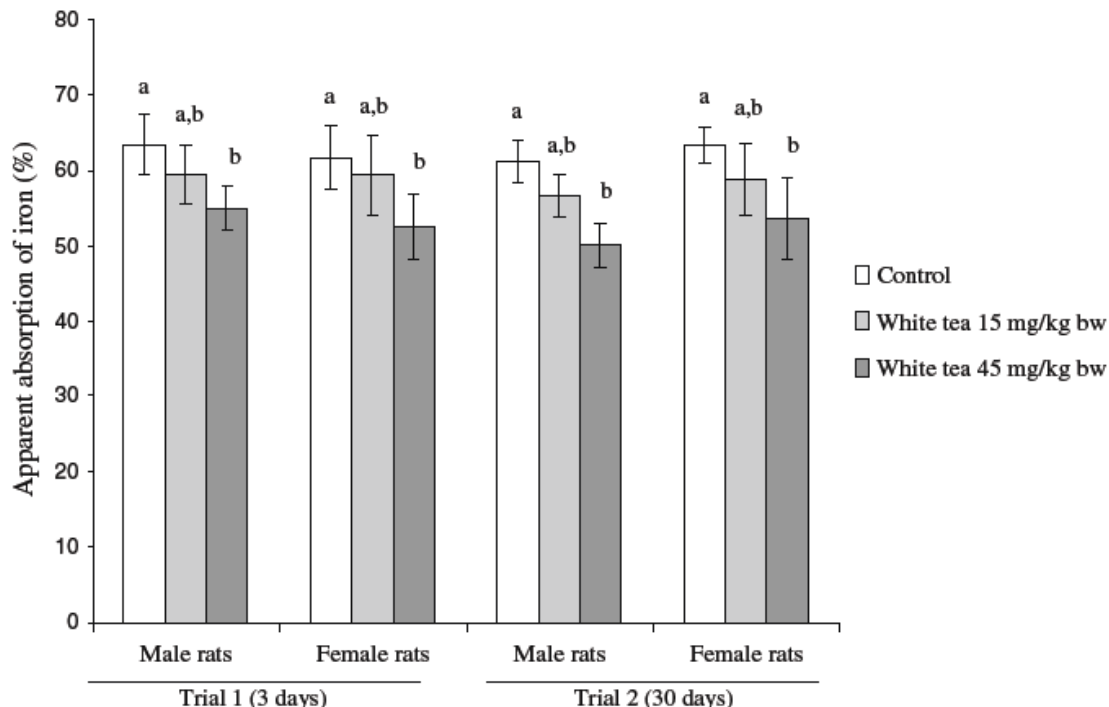


Figure 1. Effect of white tea consumption on apparent iron absorption in rats during digestibility trials 1 and 2. Results are expressed as means±SD (*n*=5). Columns with different superscript letters (a–b) reflect significant (*P*<0.05) differences in the results

3.1.4. Discussion

Tea is generally considered a healthy drink and a source of biologically active molecules as polyphenolic compounds, with a beneficial impact on human health (Chang *et al.*, 1994; Dufresne & Farnworth, 2001; Manach *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006; Garder *et al.*, 2007; Khan & Muktar, 2007). However, the polyphenols found in tea may also interact with other compounds in the diet, such as proteins and some mineral elements, particularly iron, lowering their availability. The antinutritional effect of tea polyphenols has previously been assessed in black and green tea (Chang *et al.*, 1994; South *et al.*, 1997; Hurrell *et al.*, 1999; Prystai *et al.*, 1999; Greger & Hulther, 2000; Samman *et al.*, 2001; Hamdaouia *et al.*, 2003), but not in white tea. The present study evaluates the antinutritional effects of two different doses of white tea administered for two different lengths of time, and is, to the best of our knowledge, the first study published that looks at white tea consumption and evaluates its antinutritional effects.

It was found that the daily consumption of white tea extract administered in doses of 15 and 45 mg/kg body weight for 3 and 30 days did not significantly change daily body weight gain, food intake, FE, or PER in rats, which agrees with other studies carried out in rats consuming green or black tea (Chang *et al.*, 1994; De Vos & De Schrijver, 2003). However, Greger & Lyle (1988) found that rats fed green or black tea experienced growth depression and decreased food intake; the efficiency of feed utilization was also affected by tea ingestion. Similarly, Hamdaouia *et al.* (2003) described how both black and green tea significantly reduced iron bioavailability and body weight gain in rats.

The *in vitro* antinutritional effect of green tea polyphenols on the activities of pepsin, trypsin, and other digestive enzymes was investigated by He *et al.* (2006). These authors suggested that polyphenols could reduce protein digestibility as a result of the ability of polyphenols to denature digestive enzymes. However, in the present study, the white tea concentrations used (equivalent to 3 and 9 cups of tea in humans) were not sufficient to induce any decrease in the digestive or metabolic utilization of dietary protein.

The novel information obtained in this study is that daily white tea extract consumption at 15 and 45 mg/kg body weight for 3 and 30 days did not change the

apparent absorption of dietary calcium, phosphorus, magnesium and zinc, while other tea types, particularly green and black tea, have been seen to have inhibitory effects on calcium, iron, or zinc apparent absorption in rats (Greger & Lyle, 1988; Zeyuan *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1994).

In this study, white tea consumption slightly reduced iron apparent absorption at the highest dose, which reflects the results obtained with other tea types, as seen in the literature. Non-heme iron is the most widely studied mineral element with regard to the antinutritional effects of tea polyphenols. Several studies carried out in rats and humans have showed that these compounds could inhibit iron absorption, probably by forming insoluble complexes in the lumen of the gastrointestinal tract (Zeyuan *et al.*, 1988; Hurrell *et al.*, 1999; Prystai *et al.*, 1999; Samman *et al.*, 2001; Thankachan *et al.*, 2008). However, other authors have not observed these effects (De Vos & De Schrijver, 2003; Ullmann *et al.*, 2005).

It might be considered that the reduction in iron absorption resulting from white tea consumption observed in our study (15–18% with respect to the control groups) is very low and probably insignificant in humans, since all the iron in the rat diet was in nonheme form. However, as the percentage of non-heme iron in the usual diet is considered to be between 60% and 75% (Hallberg & Hulthen, 2000), a reduction of 15–18% non-heme iron absorption might be of interest in populations at high risk of iron deficiency.

On the other hand, it has been suggested that a reduction in iron absorption might sometimes be beneficial as this is one of the mechanisms through which polyphenols exert their antioxidant activity (Bravo, 1998; Handaouia *et al.*, 2005).

A factor that could influence the potential antinutritional effect of tea is the length of exposure. In rat studies, iron absorption or tissue content fell when a tea was taken with one meal (Reddy & Cook, 1991; South *et al.*, 1997; Hurrell *et al.*, 1999; Handaouia *et al.*, 2003). However, in others studies where the period of tea exposure was longer than 7 days, tea intake did not inhibit iron absorption (Greger & Lyle 1988; Record *et al.*, 1996; Kim & Miller, 2005). Kim & Miller (2005) provided evidence for a protective effect of proline-rich proteins, a major component of saliva, against the adverse effects that tea polyphenols consumed for 5 days might have on iron absorption. In order to test

this possible adaptation process, the present study included two trials to assess different lengths of white tea consumption, 3 and 30 days. However, no significant differences between these periods were observed for any of the indices analyzed, including apparent iron absorption.

The difference found between our results and those evaluating the antinutritional effects of green and black tea might arise from the different doses studied or from the differences that exist among tea types and hence their compositions. It is well known that tea composition is affected by fermentation processes and also differs according to the type and preparation of tea (Hilal & Engerhart, 2007; Almajano *et al.*, 2008; Horzic *et al.*, 2009; Rusak *et al.*, 2008). At the same time, several other factors could explain the differences with other studies found in the literature, e.g., the forms of tea (solid in the diet or liquid in the drinking water), the length of exposure (one meal, a few days or several weeks), the variables measured (apparent absorption or tissue content), and the nutritional status of the test animals/humans (normal or anemic).

In conclusion, our results suggest that the white tea extract consumption at 15 or 45 mg/kg body weight has no adverse effect on daily body weight gain, food intake, FE, or PER in rats. The apparent absorption of calcium, phosphorus, magnesium, and zinc was not modified, and only iron absorption was slightly reduced at 45 mg of the tea solid extract per kilogram body weight (equivalent to 9 cups of tea in humans). Therefore, the normal consumption of white tea, which constitutes an important source of antioxidant compounds, is apparently safe, although its long-term effect on iron absorption at high doses warrants more detailed investigation. Human studies should also be carried out to confirm the results of this study in rats.

Acknowledgment

This study was supported by the MEC project AGL 2005-08088-C02-01 and 02. LC has a FPU grant AP2006-02642 from the MEC (Spain).

3.1.5. References

- Almajano, M. A., Carbó, R., López-Jiménez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108:55–63.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56:317–333.
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea—a review. *Journal of the American College of Nutrition* 25:79–99.
- Chang, M. C., Bailey, J. W., & Collins, J. L. (1994). Dietary tannins from cowpeas and tea transiently alter apparent calcium absorption but not absorption and utilization of protein in rats. *Journal of Nutrition*, 124:283–288.
- De Vos, S., & De Schrijver, R. (2003). Lipid metabolism, intestinal fermentation and mineral absorption in rats consuming black tea. *Nutrition Research*, 23:527–537.
- Dufresne, C. J., & Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 12:404–421.
- Gardner, E. J., Ruxton, C. H. S., & Leeds, A. R. (2007). Black tea— helpful or harmful? A review of the evidence. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61:3–18.
- Greger, J. L., & Lyle, B. J. (1988). Iron, copper and zinc metabolism of rats fed various levels and types of tea. *Journal of Nutrition*, 118:52–60.
- Hallberg, L., & Hulthen, L. (2000). Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:1147–1160.
- Hamdaouia, M. H., Chaheda, A., Ellouze-Chabchouba, S., Marouania, N., Abida, Z. B., & Hédhilib, A. (2005). Effect of green tea decoction on long-term iron, zinc and selenium status of rats. *Annual of Nutrition and Metabolism*, 49:118–124.
- Hamdaouia, M. H., Hédhilib, A., Doghric, T., Tritard, B. (1997). Effect of tea decoction given to rats ad libitum for a relatively long time on body weight gains and iron, copper, zinc, magnesium concentrations in blood, liver, duodenum and spleen. *Annual of Nutrition and Metabolism*, 41:196–202.

- He, Q., Lv, Y., & Yao, K. (2006). Effects of the polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101:1178–1182.
- Hilal, Y., & Engelhardt, U. (2007). Characterisation of white tea —comparison to green and black tea. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2:414–421.
- Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K. K., Iveković, D., & Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115(2), 441–448.
- Hurrell, R. F., Reddy, M., & Cook, J. D. (1999). Inhibition of nonhaem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *British Journal of Nutrition*, 81:289–295.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007) Tea polyphenols for health promotion. *Life Science*, 81:519–533.
- Kim, H. S., House, W. A., & Miller, D. D. (2004). Habitual tea consumption protects against the inhibitory effects of tea on iron absorption in rats. *Nutrition Research*, 24:383–393.
- Kim, H. S., & Miller, D. D. (2005) Proline-rich proteins moderate the inhibitory effect of tea on iron absorption in rats. *Journal of Nutrition*, 135:532–537.
- Koutelidakis, A. E., Argiri, K., Serafini, M., Proestos, C., Komaitis, M., Pecorari, M., & Kapsokefalou, M. (2009). Green tea, white tea, and *Pelargonium purpureum* increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition* 25:453–458.
- Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16:77–84.
- Prystai, E. A., Kies, C. V., & Driskell, J. A. (1999). Calcium, copper, iron, magnesium and zinc utilization of humans as affected by consumption of black, decaffeinated black and green teas. *Nutrition Research*, 19:167–177.
- Record, I. R., McInerney, J. K., & Dreosti, I. E. (1996). Black tea, green tea, and tea polyphenols. Effects on trace element status in weanling rats. *Biological Trace Element Research*, 53:27–43.
- Reddy, M. B., & Cook, J. D. (1991). Assessment of dietary determinants of non-heme iron absorption in human and rats. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54:723–728.

- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D., & Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110:852–858.
- Samman, S., Sandström, B., Toft, M. B., Bukhave, K., Jensen, M., Sørensen, S. S., & Hansen, M. (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces non-heme iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73:607–612.
- Santana-Rios, G., Orner, G. A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S. Y., & Dashwood, R. H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, 495:61–74.
- South, P. K., House, W. A., & Miller, D. D. (1997). Tea consumption does not affect iron absorption in rats unless tea and iron are consumed together. *Nutrition Research*, 17:1303–1310.
- Thankachan, P., Walczyk, T., Muthayya, S., Kurpad, A. V., & Hurrell, R. F. (2008). Iron absorption in young Indian women: the interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87:881–886.
- Ullmann, U., Haller, J., Bakker, G. C. M., Brink, E. J., & Weber, P. (2005). Epigallocatechin gallate (EGCG) (TEAVIGO) does not impair non-haem-iron absorption in man. *Phytomedicine*, 12:410–415.
- Zeyuan, D., Bingying, T., Xiaolin, L., Jinming, & H., Yifeng, C. (1988). Effect of green tea and black tea on the metabolisms of mineral elements in old rats. *Biological Trace Element Research*, 65:75–86.

3.2. CAPITULO EXPERIMENTAL 2

PROTECTIVE EFFECT OF WHITE TEA EXTRACT AGAINST ACUTE OXIDATIVE INJURY CAUSED BY ADRIAMYCIN IN DIFFERENT TISSUES

3.2.1. Introduction

Tea (*Camellia sinensis*) has beneficial properties in the prevention of diseases such as cancer, heart disease and neurodegenerative diseases (Serafini, Bellico, Wolk, & Ekstrom, 2002). Recent studies reported that the intake of green tea and or white tea has an antioxidant effect in the plasma and in various organs such as the heart and lungs (Koutelidakis *et al.*, 2009). Such effects have been attributed to the flavonoid content of tea, which may be beneficial in pathological situations associated with the high production of free radicals (Galleano, Oteiza & Fraga, 2009). Tea also contains other antioxidant compounds including catechins. The B ring of these catechins encourages electron delocalization, conferring a high capacity to neutralize free radicals (Yang, *et al.*, 2009). The main catechins in white tea are catechin, epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) and epicatechin (EC). However, the physiological mechanisms associated with the chemical properties of polyphenols and their healthy antioxidant effects are still controversial (Galleano *et al.*, 2009).

The processing of green and white teas differs. To produce green tea, the young leaves are rolled and steamed to minimize oxidation. White tea is prepared from very young tea leaves or buds covered with tiny, silvery hairs, which are harvested only once a year in the early spring. White tea is steamed and dried immediately after picking to prevent oxidation, giving it a light, delicate taste (Rusak *et al.*, 2008). Each type of tea has a different composition. For example, the catechin content of each type depends on the method used to process it and the starting material (leaves, buds... etc.). EGCG has been identified as the major polyphenol in both white and green teas, but caffeine, gallic acid, theobromine, EGC, and ECG were present at higher concentrations in white tea (Santana-Rios *et al.*, 2001). Thus, the possible increased activity of white tea could to be related to higher concentrations of several of the major constituents (Santana-Rios *et al.*, 2001).

Most studies of treatments involving tea to prevent oxidative damage have evaluated the effect using short term treatments. For example, Kim *et al.* (2002) reported that rats given green tea catechins for 4 weeks and irradiated by microwave for 15 min show a dose-dependent recovery of the antioxidative system function in liver. Koutelidakis *et*

al., (2010) found that green tea or white tea infusions (treatments equivalent to 30 cups of tea per day in humans) provided to mice for 5 days protected the colon from the potential oxidative effect of non-absorbed iron. Nevertheless, the antioxidant effect of tea differed between organs, and the authors observed no protective effect in brain, liver or kidney (Koutelidakis *et al.*, 2009) using this treatment time. It was therefore considered to be of interest to ascertain whether longer treatment with tea provided in the diet might protect key organs against acute oxidative stress situations in humans.

Adriamycin (ADR), also known as doxorubicin, is a quinone belonging to the group of anthracyclines, an antibiotic isolated from *Streptomyces peucetis* in the early 1960's. In humans, ADR is used as a chemotherapy agent against a variety of human cancers, including lymphomas, leukemias and solid tumors since ADR is intercalated in cell's DNA and prevents its replication (Cutts *et al.*, 1996). However, one of the problems of ADR is its ability to generate, *in vivo*, a large number and variety of free radicals with cytotoxic effects (Halliwell & Gutteridge, 1989). One of the mechanisms through which this antibiotic induces the formation of free radicals is by enzymatically reducing ADR to the ADR semiquinone (Goodman & Hochstein, 1977). Mediated by the iron ion (Fe^{3+}), the ADR may also produce free radicals non-enzymatically. However, clinical studies in humans have shown that treatment with some antioxidants does not fully reverse the cardiotoxic effect of ADR (Schimel, Richel, van den Brink & Guchelaar, 2004) and there is a search for new agents to reverse this secondary effect.

We evaluated the effect of the long term consumption of different doses of tea provided in the diet against the acute oxidation produced by ADR in mature rats, analyzing lipid and protein oxidative metabolites and hydrophilic antioxidant activity in microsomes from liver, heart and brain.

3.2.2. Materials and methods

3.2.2.1. Experimental design

The study protocol was in accordance with the Helsinki Declaration and was approved by the Bioethical Committee of Murcia University, Spain. Twenty-two Sprague-Dawley rats at weaning were purchased from the University Animal Center (Murcia, Spain). The animals received a commercial diet for rodents ("Harlan" 2014

Global Rodent Maintenance, Barcelona, Spain) and were kept in cages in groups of three or four, with males separated from females. The animals were maintained in a room under controlled conditions: temperature 23 ± 2 °C, relative humidity $55 \pm 5\%$, ventilation frequency 18 times/h and a 12:12 h light-dark photoperiod.

For 12 months, the rats received different doses of tea in the drinking water. The Control (9 males and 3 females) received distilled water; Dose 1 group (D1) (2 males and 3 females) received 15 mg of solid tea extract/kg body weight (4 mg polyphenols/kg body weight), and Dose 2 group (D2) (3 males and 2 females), received a dose of 45 mg of solid tea extract/kg body weight (12 mg polyphenols/kg body weight). The drink was available continuously and rats drank *ad libitum*. We estimated that these doses contained amounts of tea equivalent to those consumed by humans drinking 0, 3 (reflecting western habits (Wang *et al.*, 2011)) and 9 cups of tea per day (reflecting oriental habits (Suzuki *et al.*, 2009) whereby part of the population consumes more than 7 cups per day).

After 12 months, all the animals received an intraperitoneal injection of adriamycin, (10mg/kg. body weight), except half of the animals of the control group (4 males and 1 female) that received an injection of saline solution. In this way, four experimental groups were established: Control, Control + Adriamycin (C + ADR), white tea dose 1 + ADR (D1 + ADR) and white tea dose 2 + ADR (D2 + ADR).

Forty-eight hours after the administration of adriamycin, and following overnight fasting, the rats were weighed and sacrificed under anaesthesia (sodium thiopental). The heart, liver and brain, were removed and immediately rinsed in cold saline solution. The microsomas, obtained as described by Philipp and Shapiro (1979), were frozen at -80°C until analysis.

3.2.2.2. Preparation of tea infusion

The tea extract was prepared in Barcelona (Spain) following the protocol described by Almajano *et al.*, 2008. White tea (30 g of tea leaves, Sara Lee Southern Europe S.L., Mollet del Vallés, Barcelona, Spain) was mixed with 500 ml boiling double-distilled, deionized water for 5 min, with constant shaking and the samples were filtered through Whatman no. 1 filter paper (Whatman Schleicher & Schuell, Castelldefels, Spain). The

tea infusions were freeze-dried and the extracts were kept at -20°C until use. The total phenol content was analyzed by the Folin-Ciocalteu method, and the profile of the main catechins was determined by capillary electrophoresis. The white tea used contained 2180 ± 161 mg of total polyphenols/100 g tea leaves, expressed as mg gallic acid equivalent per litre of infusion. The individual catechin content of the white tea was analyzed by RP-HPLC (Almajano *et al.*, 2011). The main catechin was seen to be epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (1525 ± 113.4 mg/100 g tea leaves) and several other polyphenols were present (mg/100 g tea leaves): epigallocatechins (159 ± 15.2) and epicatechin (54.3 ± 2.5), as well as methylxantines, theobromine and caffeine (Almajano *et al.*, 2011).

3.2.2.3. Analytical methods

3.2.2.3.1. Total phenolic content

Folin-Ciocalteu's reagent (Panreac, Spain) was used to determine the total content of the phenolic compounds of white tea (Singleton & Rossi, 1951). Five hundred microlitres of sample were placed in a glass test tube, and 1 ml of water (Mili-Q) and 2.5 ml of Folin-Ciocalteu's reagent (10-fold diluted) were added. The reaction medium (3 ml) was allowed to react in the dark for 1h, and the absorbance at 755 nm was measured. The results were expressed as μmol of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of tea leaves.

3.2.2.3.2. Protein determination

The Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951) was used to measure the protein content of the samples. These values were used as reference in all the techniques.

3.2.2.3.3. Hydrophilic antioxidant activity (HAA)

HAA was measured in the liver, heart and brain using the method of Arnao *et al.*, (1999), which is based on the ability of the antioxidants in the sample to reduce the radical cation of 2,2'-azino-bis-3-(ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), determined by the decolouration of $\text{ABTS}^{\cdot+}$, and measuring the quenching of the absorbance at 730 nm. This activity is calculated by comparing the values of the sample

with a standard curve of ascorbic acid and expressed as ascorbic acid equivalents (mMolar) per milligram of protein.

3.2.2.3.4. *Carbonyl groups*

The concentration of carbonyl groups in microsomal proteins was determined by 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) reagent according to the method of Reznick & Packer (1994) modified by Bailey (2001). Microsomal samples were divided into two aliquots of at least 1 mg/ml of protein in each. To one of them, was added 2 ml of 2N HCl was added before incubating at room temperature for 1 hour, stirring intermittently. This served as the Control tube. To the other tube was added 2 ml of 10 mM DNPH dissolved in 2 N HCl. This was incubated and stirred as above, and served as the experimental sample. After incubation, the reaction in both cases was stopped by adding TCA (tri-chloro acetic acid) at 20% and then centrifuged at 5,000g for 13 minutes. The pellets were washed with 10% TCA and re-spun. The precipitate was washed 3 times with 2 ml of a solution of ethanol-ethyl acetate (1:1). The final protein precipitate was resuspended in 6 M guanidine-HCl and centrifuged, reading the supernatant by a sweep of 344-390 nm. The carbonyl content was expressed in nmol/mg protein.

3.2.2.3.5. *Hydroperoxides*

The technique described by Jiang *et al.*, (1992) was used to determine hydroperoxides. This is based on the reaction in which Fe^{2+} is oxidized to Fe^{3+} in acidic conditions. The reaction is characterized by the donation of a negative anion mediated by the action of Fox's reagent. It uses a dye, xylenol orange, sensitive to the oxidation of iron. In the case of hydroperoxides, iron acts as a transition metal. The orange colour intensity of the xylenol increases with the presence of hydroperoxides. The AMN (ammonium ferrous sulfate) is the source of iron for lipid peroxidation, while AAPH (2-2 azobis amidinopropane) is a strong inducer of lipid peroxidation.

3.2.2.4. *Statistical analyses*

The results are expressed as mean \pm SD. The normality of the variables was confirmed by the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance by the Levene test. Statistical differences among the four groups of treatments were assessed by one-way ANOVA analyses followed by the Bonferroni or Games Howell test, depending on the

homogeneity of the variables. Differences among organs in the control groups were also analyzed by ANOVA when 3 organs were available, and by t-test when only 2 organs were available. Correlations between variables were assessed using Pearson's correlation coefficients. The significance level was 95% in all cases ($P < 0.05$). All data were analyzed by the computer application SPSS for Windows® (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

3.2.3. Results

During the 12 months of the dietary treatment, food consumption was similar in all the groups, and no differences were detected in the body weight of the animals as a result of consuming tea (control: 445 ± 82 g; control + ADR: 380 ± 50 g; dose 1 + ADR: 379 ± 110 g; dose 2 + ADR: 374 ± 139 g). As expected, the hydrophilic antioxidant activity (HAA) was significantly lower observed in the liver, heart and brain of control rats treated with ADR compared with the control rats not receiving ADR injection (**Figure 1**). However, ADR did not decrease this antioxidant activity in liver or brain in rats consuming dose 1 or dose 2 of tea, while the heart was only protected in rats consuming the maximum dose of tea (dose 2). This difference among the organs as regards the protection against ADR could be explained by the basal HAA activity in the heart of control rats, which is significantly lower than in liver or brain; thus, the heart would need a greater dose of tea to reach the basal antioxidant status (**Figure 1**).

Similar results were observed when protein oxidation (**Figure 2**) and the lipid oxidative metabolites (**Figure 3**) were analysed in these organs. ADR produced an increase in the concentration of carbonyl groups (**Figure 2**) and hydroperoxides (**Figure 3**) in the organs when administered to control rats. Nevertheless, tea consumption reduced the concentration of these oxidative metabolites to basal or control values in rats receiving the ADR. Brain needed the higher dose of tea (dose 2) to reach the basal values of the carbonyl groups (**Figure 2**). The same organ showed a greater level of protein oxidation (**Figure 2**) and lower lipid oxidation (**Figure 3**) than the liver in control rats. The results for heart are not shown because of lack of material for the hydroperoxide analyses.

HAA antioxidant activity was inversely correlated with the protein and lipid oxidized metabolites in the three organs (**Table 1**). In addition, the concentration of the carbonyl

groups was positively correlated with the concentration of hydroperoxides in liver ($r = 0.747$; $p < 0.001$) and brain ($R = 0.57$; $P = 0.001$).

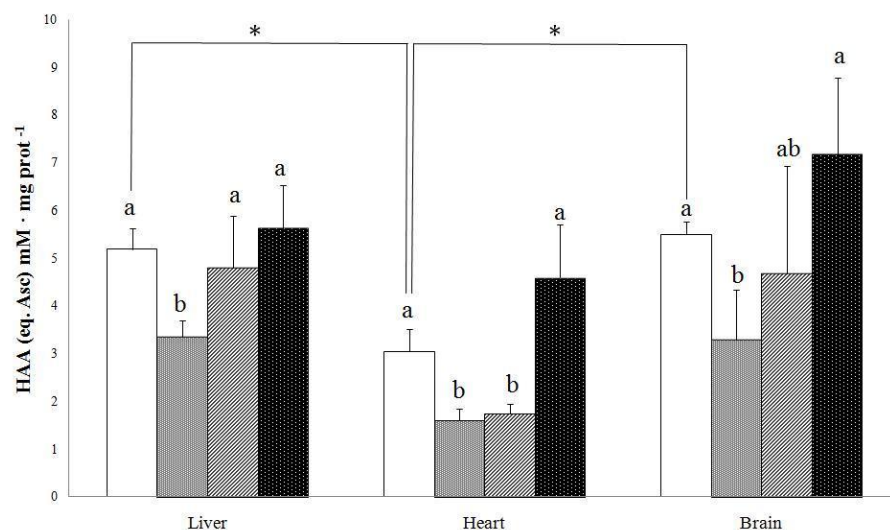


Figure 1. Hydrophilic antioxidant activity (HAA) expressed in equivalents of ascorbic acid (mM) per mg of proteins. (□) control group, (▨) control + ADR group, (▩) dose 1 + ADR group, and (■) dose 2 + ADR group. Values are the mean \pm SD of 5 animals per group. Values with different letters indicated statistically significant differences among treatments; * indicates significant differences among organs in control rats ($p < 0.05$).

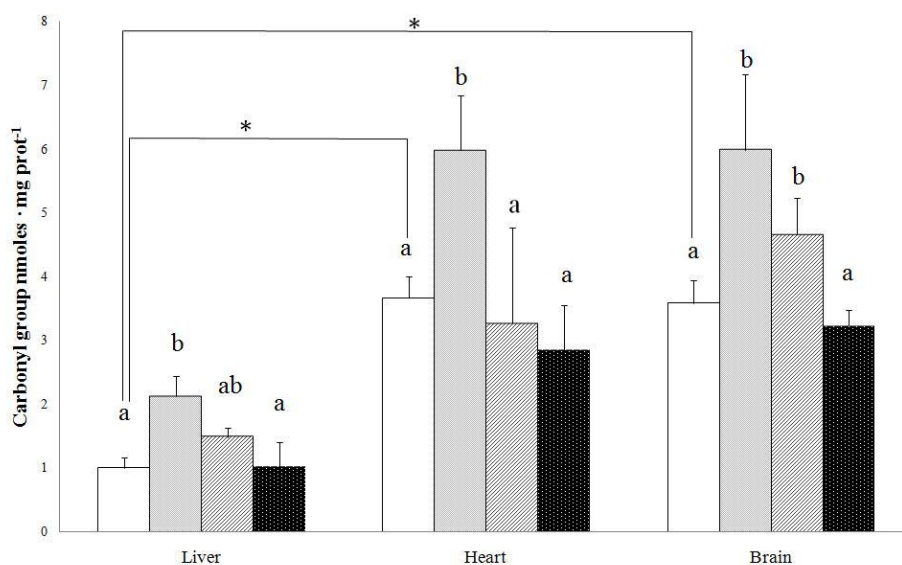


Figure 2. Concentration of carbonyl groups (CGC) expressed in nanomoles of carbonyls group per mg of proteins. (□) control group, (▨) control + ADR group, (▩) dose 1 + ADR

group, and (■) dose 2 + ADR group. Values are the mean \pm SD of 5 animals per group. Values with different letters indicated statistically significant differences among treatments; * indicates significant differences among organs in control rats ($p < 0.05$).

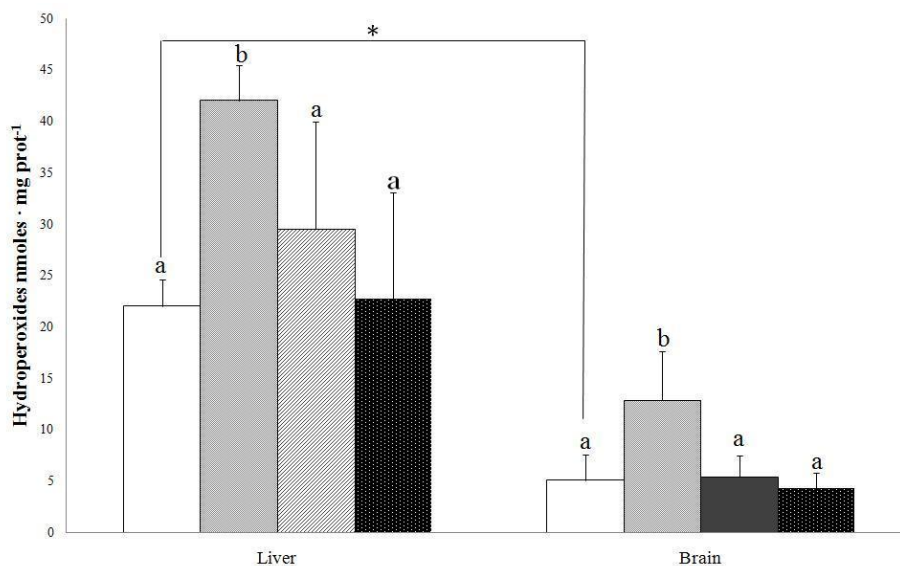


Figure 3. Concentration of hydroperoxides expressed in nanomols of hydroperoxides per mg of proteins. (□) control group, (■) control + ADR group, (▨) dose 1 + ADR group, and (■) dose 2 + ADR group. Values are the mean \pm SD of 5 animals per group. Values with different letters indicated statistically significant differences among treatments; * indicates significant differences among organs in control rats ($p < 0.05$). Results for heart are not shown because of lack of material for the hydroperoxide analyses.

Table 1.- Correlations between oxidation state and hydrophilic antioxidant activity (HAA).

Microsomes		HAA-Carbonyl groups	HAA-Hydroperoxides
Liver	R	-0.590	-0.604
	<i>p</i>	0.008*	0.005*
Heart	R	-0.457	-
	<i>p</i>	0.037*	-
Brain	R	-0.759	-0.475
	<i>p</i>	< 0.001*	0.03*

R — Pearson's correlation coefficient. * Significant differences at $p < 0.05$.

3.2.4. Discussion

In humans, the antioxidant defence is influenced by dietary components, such as tea. Numerous studies have used ADR as a powerful pro-oxidant or free radical generator, in order to determine the antioxidant properties of different components in tissues or organs such as heart, liver, brain and plasma (Bordoni *et al.*, 2008; Joshi *et al.*, 2010). In the present study, ADR administered to rats had a toxic effect on the microsomes of liver, heart and brain, resulting in a significant decrease in their antioxidant activity, as demonstrated in the control rats treated or not with this compound. In contrast, the consumption of white tea extract for 12 months at non-pharmacological doses was sufficient to reverse the oxidative damage caused by ADR in both proteins and lipid oxidative metabolites in these organs. Koutelidakis *et al.* (2009) did not report any benefit on the antioxidant defence in some organs (liver, spleen, kidney and brain) after the intake of white or green tea, although the time of administration was very short (5 days). Other studies have pointed to the beneficial effect of green tea polyphenols in liver against the oxidative damage produced by intense exercise (Alessio *et al.*, 2002) and experimental diabetes (Sabu *et al.*, 2002), or when used *in vitro* to reduce oxidation by chemical agents (Cai *et al.*, 2002).

As shown in **Figure 1**, the HAA measurements pointed to quantitative differences between the antioxidant potential in heart compared with the other two organs studied, liver and brain. Heart required the higher dose of tea (dose 2) to counteract the acute pro-oxidant effect of ADR. The increased susceptibility of myocardial tissue to acute oxidative damage could be explained in part by a lower concentration of protective enzymes against free radicals such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, together with a lower level of antioxidant metabolites (Doroshov *et al.*, 1980). Tea may protect the heart from the oxidative damage caused by ADR, as observed in other treatments with antioxidants such as *Gingko biloba* extract (Naidu *et al.*, 2002), *Spirulina* (Khan *et al.*, 2005) or selenium (Bordoni *et al.*, 2008). Clinical studies with acetylcysteine and tocopherol did not show any cardioprotective effect in humans under ADR therapy (Myers *et al.*, 1983), which could be of interest when evaluating the clinical relevance of tea consumption in these types of patients.

In the present study, brain microsomes of control rats treated with ADR showed increased levels of both protein and lipid oxidative metabolites, despite the protection

offered by the blood-brain barrier. Because ADR itself cannot cross the blood-brain barrier (Joshi *et al.*, 2010), the toxic side effects in brain could be due to its peripheral effect of increasing the level of tumor necrosis factor (TNF- α), which migrates across the blood-brain barrier, leading to inflammation and oxidative stress in brain (Joshi, et al. 2010). In addition, tea catechins may cross this barrier to reach the brain. Indeed Abdel Mohsen *et al.*, (2002) described a decrease in lipid oxidation in the brain of rats treated with green tea. Previously, other authors showed that green tea polyphenols reduced neuronal oxidative damage after acute hypoxia processes (Wei *et al.*, 2004) and decreased the lipid oxidation in brain tissue caused by ethanol (Ostrowska *et al.*, 2004) and aging (Li *et al.*, 2010).

Most studies have used green tea rather than white tea to evaluate the antioxidant effect of tea since the catechin content of green tea is higher (Almajano *et al.*, 2007). Despite this lower catechin content in white tea, we demonstrated the beneficial effect of its long term consumption on antioxidant status. In healthy subjects, the consumption of two cups of green tea for 42 days improved antioxidant defences in plasma (Erba *et al.*, 2005). A short-term increase of catechins obtained by using green or white tea did not change plasma antioxidant capacity in healthy subjects (Müller *et al.*, 2010).

A large number of studies have been performed to identify biomarkers of oxidative stress, although the ideal marker has not yet been found. At present, the best approach for such an evaluation of oxidative stress might be to measure the balance between antioxidant enzymes and oxidized metabolites. Our results corroborate a significant inverse relationship between the levels of HAA and both carbonyl groups and hydroperoxides (**Table 1**). These relationships demonstrate the effectiveness of both the pro-oxidant effect of the ADR and the protective effect of white tea against acute oxidative injury, a protective effect probably related with its chemical components as well as with the to polyphenol content.

In conclusion, we observed different degrees of susceptibility to acute damage caused by ADR in different organs. ADR produced oxidative stress in liver, heart and brain, reducing hydrophilic antioxidant activity and increasing oxidative lipid metabolites in 12 month old rats. The long term intake of white tea at two different doses, both of which can be regarded as non-pharmacological, counteracted the oxidative damage caused by ADR injection in the three organs mentioned, although the

heart required the higher dose of tea to achieve this recovery. Long term studies of tea consumption in humans could be of interest in patients undergoing ADR treatment or other situations of acute oxidative stress such as stroke to reduce oxidative damage, as demonstrated in animal studies.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology with project AGL2005-08088-C02-01 and FPU fellowship (AP2006-02642). The authors thank Daniel Gonzalez Silvera and Rebeca Martinez-Tomás for technical support.

3.2.5. References

- Abd el Mohsen, M., Kuhnle G., Rechner, A. R., Schoeter, H., Rose, S., Jenner, P., & Rice-Evans, C. A. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 1693–1702.
- Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Romanello, M., Carando, S., Threlkeld, M. S., Rogers, J., Dimitrova, Y., Muhammed, S., & Wil, R. L. (2002). Consumption of green tea protects rats from exercise induced oxidative stress in kidney and liver. *Nutrition Research*, 22, 1177–1188.
- Almajano, M. A., Carbó, R., López-Jiménez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108:55–63.
- Almajano, M. P., Vila, I., & Gines, S. (2011). Neuroprotective effects of white tea against oxidative stress-induced toxicity in striatal cells. *Neurotoxicity Research*, 20, 372–378.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. *Free Radical Research*, 31, 389–396.
- Bailey, P. J. (2001). The cleavage of a cluster carbonyl next term C---O bond by trifluoromethanesulphonic anhydride. *Journal of Organometallic Chemistry*, 420, 21–23.
- Bordoni, A., Danesi, F., Malaguti, M., Di Nunzio, M., Pasqui, F., Maranesi, M., & Biagi, P. L. (2008). Dietary Selenium for the counteraction of oxidative damage: fortified foods or supplements? *British Journal of Nutrition*, 99, 191–197.
- Cai, Y. J., Ma, L-P., Hou, L-F., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z-L. (2002). Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomas. *Chemistry and Physics of Lipids*, 120, 109–117.

- Cutts, S. M., Parson, P. G., Sturm, R. A., & Philipps, D. R. (1996). Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *Journal of Biology and Chemistry*, 271(10), 5422–5429.
- Doroshov, J. H., Locker, G. Y., & Myers, C. E. (1980). Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *The Journal of Clinical Investigation*, 65(1), 128–135.
- Erba, D., Riso, P., Bordoni, A., Foti, P., Biagi, P. L., & Testolin, G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 144–149.
- Galleano, M., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2009). Cocoa, chocolate, and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 483–490.
- Goodman, J., Hochstein, P., & Angeles, L. (1977). Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 77, 797–803.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Comments on review of free radicals in biology and medicine. *Free Radicals Biology & Medicine*, 12(1), 93–95.
- Jiang, Z-Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous Iron oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202, 384–389.
- Joshi, G., Aluise, C. D., Cole, M. P., Sultana, R., Pierce, W. M., Vore, M., St. Clair, D. K., & Butterfield, D. A. (2010). Alterations in brain antioxidant enzymes and redox proteomic identification of oxidized brain proteins induced by anti-cancer drug Adriamycin: Implications for oxidative stress-mediated. *Neuroscience*, 166, 796–807.
- Khan, M., Shobha, J. C., Mohan, I. K., Naidu, M. U. R., Sundaram, C., Singh, S., Kuppusamy, P., & Kutala, V. K. (2005). Protective effect of spirulina against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research*, 19, 1030-1037.

- Kim, M.-J., Choi, J.-H., Yang, J.-A., Kim, S.-Y., Kim, J.-H., Lee, J.-H., Kim, J.-K., & Rhee, S.-J. (2002). Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutritional Research*, 22, 733–744.
- Koutelidakis, A. E., Serafini, M., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2010). Oxidative activity of some iron compounds on colon tissue homogenates from mice after administration of green tea, white tea and *Pelargonium purpureum*. *Food Chemistry*, 120(3), 895-901.
- Koutelidakis, A. E, Argiri, K., Serafini, M., Proestos, C., Komaitis, M., Pecorari, M., & Kapsokefalou, M. (2009). Green tea, white tea, and *Pelargonium purpureum* increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition* 25:453–458.
- Li, Q., Zhao, H., Zhao, M., Zhang, Z., & Li, Y. (2010). Chronic green tea catechins administration prevents oxidative stress-related brain aging in C57BL/6J mice. *Brain Research*, 1653, 28–35.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biology Chemistry*, 193, 265–275.
- Müller, N., Ellinger, S., Alteheld, B., Ulrich-Merzenich, G., Berthold, H. K., Vetter, H., & Stehle, P. (2010). Bolus ingestion of white and green tea increases the concentration of several flavan-3-ols in plasma, but does not affect markers of oxidative stress in healthy non-smokers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(11), 1636–1645.
- Myers, C. E., Bonow, R., & Palmeri, S. (1983). A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Seminars in Oncology*, 10(1), 53–55.
- Naidu, M., Kumar, K. V., Mohan, I. K., Sundaram, C., & Singh, S. (2002). Protective effect of *Gingko biloba* extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 894–900.

- Ostrowska, J., Łuczaja, W., Kasacka, I., Różanski, A., & Skrzydlewska, E. (2004). Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol*, 32, 25–32.
- Philipp, B. W., & Shapiro, D. J. (1979). Improved methods for the assay and activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Journal of Lipid Research*, 20, 588-593.
- Reznick, A. Z., & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 257–263.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D., & Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110:852–858.
- Sabu, M. C., Smitha, K., & Ramadasan, K. (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 109–116.
- Santana-Rios, G., Orner, G. A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S. Y., & Dashwood, R. H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, 495:61–74.
- Schimmel, K. J. M., Richel, D. J., van den Brink, R. B. A., & Guchelaar, H. J. (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 181–191.
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., & Ekström, A. M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123(4), 985–991.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic and reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Suzuki, E., Yorifuji, T., Takao, S., Komatsu, H., Sugiyama, M., Ohta, T., & Al., E. (2009). Green tea consumption and mortality among Japanese elderly people: The prospective Shizuoka elderly cohort. *Annals of Epidemiology*, 19, 732–739.

Wang, D., Xu, K., Zhong, Y., Luo, X., Xiao, R., Hou, Y., Bao, W., Yang, W., Yan, H., Yao, P., & Liu, L. (2011). Acute and subchronic oral toxicities of Pu-erh black tea extract in Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 156–164.

Wei, I-H., Wu, Y-C., Wen, C-Y., & Shieh, J-Y. (2004). Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate attenuates the neuronal NADPH-d/nNOS expression in the nodose ganglion of acute hypoxic rats. *Brain Research*, 999, 73–80.

3.3 CAPITULO EXPERIMENTAL 3

MOLECULAR MECHANISMS BY WHICH WHITE TEA INTAKE PREVENTS OXIDATIVE-INDUCED STRESS IN VIVO

3.3.1. Introduction

Considerable controversy surrounds the role of antioxidants in oxidative stress, with some antioxidants such as vitamin D, E and carotene functioning both as an oxidant and an antioxidant depending on the *redox status* of the internal environment of the individual. Knowledge of this value could be important for research, but the redox potential is difficult to measure.

Tea (*Camellia sinensis*) has beneficial properties in the prevention of several diseases including cancer, heart disease and neurodegenerative diseases (Serafini *et al.*, 2002). These properties, which have been attributed to the flavonoid content of tea, may be beneficial in pathological situations associated with a high production of free radicals (Galleano *et al.*, 2009). However, the physiological mechanisms associated with the chemical properties of polyphenols and their antioxidant effects on health are far from being clearly understood (Galleano *et al.*, 2009). The main catechins in white tea are catechin, epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) and epicatechin.

The processing of green and white teas differs. To produce green tea, the young leaves are rolled and steamed to minimise oxidation. White tea is prepared from very young tea leaves or buds, which are harvested only once a year in the early spring. White tea is steamed and dried immediately after picking to prevent oxidation, giving it a light, delicate taste (Rusak *et al.*, 2008). Each type of tea has a distinct composition. For example, the catechin content of each type depends on the method used to process it and the starting material (e.g. buds). EGCG has been identified as the major polyphenol in both white and green teas, but caffeine, gallic acid, theobromine, EGC, and ECG are present at higher concentrations in white tea (Santana-Rios *et al.*, 2001). Thus, the possible increased activity of white tea could be related to higher concentrations of several of the major constituents (Santana-Rios *et al.*, 2001).

Protective genes, the products of which could reduce oxidative stress, contain a common promoter element called the antioxidant response element (ARE). Several transcription factors can bind the ARE, which is a cis-acting DNA regulatory element that activates the promoter region of many genes encoding phase II detoxification enzymes and antioxidants. These genes include heme oxygenase 1 (*Hol*), superoxide

dismutase (*Sod*), peroxiredoxin 1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (*Nqo1*) and glutamate-cysteine ligase (Kim *et al.*, 2002; Meewes *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2000). Nuclear factor E2-related factor 2 (*Nrf2*) is responsible for activating transcription in response to oxidative stress (Lee & Johnson, 2004). Green tea polyphenols are believed to initiate a cellular antioxidant response, which results in the induction of a variety of metabolic genes, including human *Nqo1* [16], glutathione-S-transferase (*Gst*) (Li & Jaiswal, 1992), heme oxygenase (*Ho*) (Rusmore & Pickett, 1990) and quinone reductase (*Qr*) (Prestera *et al.*, 1993). The genes for each of these enzymes are known to contain functional electrophile/ AREs (EpRE/AREs).

In unstimulated conditions, NRF2 is negatively regulated by the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), which facilitates the degradation of NRF2 through ubiquitinated proteasomal degradation (Surh, 2003). Upon stimulation, NRF2 translocates into the nucleus and recruits the small muscle aponeurotic fibrosarcoma (sMaf) protein. The NRF2-sMaf heterodimer then binds to ARE.

Adriamycin (ADR), also known as doxorubicin, is a quinone belonging to the anthracyclines, a class of antibiotics first isolated from *Streptomyces peucetius* in the early 1960s. ADR is intercalated in a cell's DNA and prevents its replication (Cutts *et al.*, 1996). In humans, it is used as a chemotherapy agent against a variety of cancers including lymphomas, leukaemia and solid tumours. In vivo, ADR is able to generate a large number and variety of free radicals with cytotoxic effects (Goodman *et al.*, 1977; Halliwell & Gutteridge, 1989). Clinical studies in humans have shown that treatment with some antioxidants does not fully reverse the cardiotoxic effect of ADR [28], and research is ongoing to identify new agents to reverse this secondary effect.

In previous research regarding white tea and ADR, Espinosa *et al.* (2012) investigated the long-term protective effect of white tea against the oxidative effects of ADR, finding higher antioxidant activity in rats that had ingested white tea. The antioxidant capacity of the white tea was also associated with less damage to proteins and lipids.

The objective of this study was to investigate mechanisms through which the ingestion of white tea extract protects against acute oxidative stress. With this aim in mind, we evaluated the effects of the long-term consumption of different doses of tea

provided in the diet of mature rats against acute oxidation produced by ADR was analysed, along with the activation in the liver of the ARE response mediated by NRF2, the expression of the genes *Nqo1*, *Gst Ho1*, catalase (*Cat*), glutathione reductase (*Gr*) and superoxide dismutase 1, 2, and 3 (*Sod1*, 2 and 3), and relevant enzyme activities for *redox status*, such as catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD).

3.3.2. Materials and methods

3.3.2.1. Experimental design

The study protocol was in accordance with the Helsinki Declaration and was approved by the Bioethical Committee of Murcia University, Spain. Twenty-two weaned Sprague–Dawley rats were purchased from the University Animal Center REGA-ES300305440012 (Murcia, Spain). The animals received a commercial diet for rodents (Harlan 2014 Global Rodent Maintenance, Barcelona, Spain) and were kept in cages in groups of three or four, with males separated from females.

The animals, n=22 (an equal mixture of male and female) were maintained in a room under controlled conditions: temperature 23 ± 2 °C, relative humidity $55 \pm 5\%$, ventilation frequency 18 times/h and a 12:12 h light–dark photoperiod. For 12 months, the rats received different doses of tea in their drinking water. The control (n=12) received distilled water; dose 1 group (D1) (n=5) received 15 mg of solid tea extract/kg body weight (4 mg polyphenols/kg body weight), and dose 2 group (D2) (n=5) received a dose of 45 mg of solid tea extract/kg body weight (12 mg polyphenols/kg body weight) dissolved in distilled water. The drink was available continuously, and rats drank *ad libitum*. We estimated that these doses contained amounts of tea equivalent to those consumed by humans drinking between zero and three cups of tea per day, reflecting Western habits (Wang *et al.*, 2011), and up to nine cups of tea per day, reflecting oriental habits (Suzuki *et al.*, 2009). After 12 months, all the animals received an intraperitoneal injection of ADR (10 mg/kg body weight), except for half of the animals in the control group that received an injection of saline solution. In this way, four experimental groups were established: control, control + ADR (C + ADR), white tea dose 1 + ADR (D1 + ADR) and white tea dose 2 + ADR (D2 + ADR). Forty-eight hours after the administration of ADR, and following overnight fasting, the rats were

weighed and sacrificed under anaesthesia (sodium thiopental). The liver was removed and immediately rinsed in a cold saline solution.

3.3.2.2. *Preparation of tea infusion*

The tea extract was prepared in Barcelona (Spain) following the protocol described by Almajano *et al.* (2008). The tea infusions were freeze dried, and the extracts were kept at -20 °C until use. The total phenol content was analysed by the Folin–Ciocalteu method, and the profile of the main catechins was determined by capillary electrophoresis. The white tea used contained 2180 ± 161 mg of total polyphenols/100 g tea leaves, expressed as mg gallic acid equivalent per litre of infusion. The individual catechin content of the white tea was analysed by RP-HPLC (Almajano *et al.*, 2011). The main catechin observed was epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (1525 ± 113.4 mg/100 g tea leaves). Several other polyphenols were also present (mg/100 g tea leaves), including epigallocatechins (159 ± 15.2) and epicatechin (54.3 ± 2.5), as well as methylxanthines including theobromine and caffeine (Almajano *et al.*, 2011).

3.3.2.3. *Quantitative real-time PCR*

The mRNA levels of *Nrf2*, *Ho1*, *Nqo1*, *Gst-a1*, *Cat*, *Gr* and *Sod1*, 2 and 3 were determined by quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted from 0.5 g of rat liver tissue using TRIzol Reagent (Invitrogen, Malthan. MA, USA). It was then quantified, and the purity was assessed by spectrophotometry; the 260:280 ratios were 1.8–2.0. The RNA was then treated with DNase I (Promega Biotech Iberica, Madrid Spain) to remove genomic DNA contamination. Complementary DNA (cDNA) was synthesised from 1 µg of total RNA using the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Malthan. MA USA) with an oligo-dT₁₈ primer. The expression of four selected redox-relevant genes was analysed by real-time PCR, which was performed with an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Malthan. MA USA) using SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Malthan. MA USA). Reaction mixtures (containing 10 µl of 2 × SYBR Green supermix, 5 µl of primers [0.4 µM each] and 5 µl of cDNA template) were incubated for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and, finally, 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 15 s at 95 °C. For each mRNA, gene expression was corrected by the RNA β-actin subunit content in each sample. The results are expressed with respect to the control group, which was

normalized to 1. The primers used are shown in Table 1. In all cases, each PCR was performed with triplicate samples.

Table 1. PCR primer sequences

Target gene	Sense primer (5' to 3')	Antisense primer (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	No. of cycles	Size (bp)
<i>Nrf2</i>	CCATGCCTTCTTCCACGAA	AGGGCCCATGGATTCAGTT	–	40	–
<i>Nqo1</i>	GCGTCTGGAGACTGTCTGGG	CGGCTGGAATGGACTTGC	60	40	170
<i>Ho1</i>	GCGAAACAAGCAGAACCCA	GCTCAGGATGAGTACCTCCA	58	40	185
<i>Gst-a1</i>	CGGTACTTGCCTGCCTTTG	ATTTGTTTTGCATCCACGGG	59	40	248
<i>Sod1</i>	CACTCTAAGAAACATGGCG	CTGAGAGTGAGATCACACG	60	40	40
<i>Sod2</i>	TTCAGCCTGCACTGAAG	GTCACGCTTGATAGCCTC	60	40	669
<i>Sod3</i>	CTTCACCTGGTTGAGAAGATAG	GATCTGTGGCTGATCGG	60	40	735
<i>Cat</i>	ATGGCTTTTGACCCAAGCAA	CGGCCCTGAAGCTTTTTGT	60	40	68
<i>Gr</i>	GCGGGCCCTGGCATTG	GGACCAGCGCCCATCTG	60	40	132
<i>β-Actin</i>	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTAATGTCACGCACGATTTC	60	40	150

Nrf2, Nuclear factor E2-related factor 2; *Nqo1*, NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene; *Ho1*, heme oxygenase 1 gene; *Gst-a1*, glutathione S-transferase $\alpha 1$ gene; *Sod*, Superoxide dismutase gene; *Cat*, Catalase gene; *Gr*, Glutathione reductase gene.

3.3.2.4. Enzyme assays

The activity of CAT was measured by monitoring the consumption of H₂O₂ at 240 nm (Aebi, 1984). This method is based on the principle that the absorbance will decrease due to the decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 240 nm. The amount of H₂O₂ converted into H₂O and O₂ in 1 min under standard conditions is accepted as the enzyme reaction rate. GR was measured by the method modified by Carlberg & Mannervik (1975). The reaction was initiated by the addition of 0.1 mM NADPH to the mixture of enzyme in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 containing 2 mM EDTA and 0.5 mM GSSG. The change in absorbance was monitored at 340 nm for 3 min by a UV–Vis Thermo Scientific model Evolution 300 dual beam spectrophotometer. One unit of GR activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 μ mol of NADPH per minute ($\epsilon_{340 \text{ nm}}$ for NADPH 6.22 mM⁻¹

cm⁻¹). SOD activity was determined based on the inhibition of the reduction of cytochrome C in the presence of Sod at 550 nm (McCord & Fridovich, 1969). The SOD-like activity of the complexes was studied at 25 °C by an indirect method using cytochrome c as superoxide oxidants (indicator). The superoxide radical anion was generated *in situ* by the xanthine oxidase reaction, and detected spectrophotometrically by monitoring the formation of the reduced form of cytochrome c at 550 nm in a Thermo Scientific model Evolution 300 dual beam spectrophotometer.

3.3.2.5. Statistical analyses

The results are expressed as means \pm SD. The normality of the variables was confirmed by the Shapiro–Wilk test and homogeneity of variance by the Levene test. Statistical differences among the four groups of treatments were assessed by one-way ANOVA analyses, followed by the Bonferroni or Games Howell test, depending on the homogeneity of the variables. The significance level was 95% in all cases ($P < 0.05$). All the data were analysed by the computer application SPSS for Windows[®] (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

3.3.3. Results

During the 12 months of the dietary treatment, food consumption was similar in all the groups, and no differences were detected in the body weights of the animals as a result of consuming tea.

As we expected, ADR caused the activation of AREs in the liver. As shown in **Figure 1A**, the levels of *Nrf2* expression were high in the C + ADR group. The expression in the D1 + ADR group was variable and did not show statistical difference from the other groups. The *Nrf2* expression was also high in the D2 + ADR group, where the expression of this transcription factor was nine times greater than on the C + ADR group.

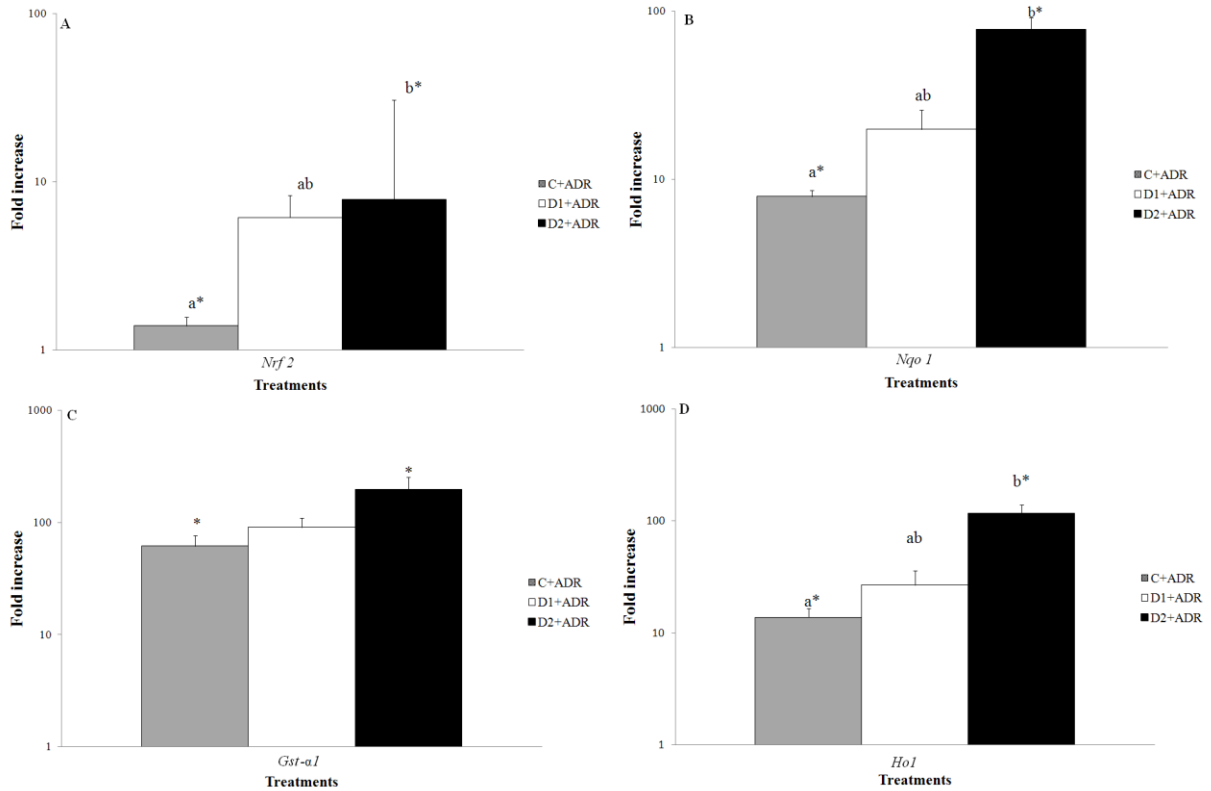


Figure 1. (A) Expression of the *Nrf2* gene determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. (B) Expression of the *Nqo1* gene determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. (C) Expression of the *Gst* gene determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. (D) Expression of the *Ho1* gene determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. The bars represent the means \pm s.e. ($n = 5$) fold increase relative to the control. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments; * indicates significant differences compared with the control ($P < 0.05$).

As a result, the genes regulated by NRF2 were highly expressed in the ADR and white tea treatments. The expression of *Nqo1* (**Figure 1B**) was up-regulated in the C + ADR group compared with the control. The D1 + ADR group showed no statistical differences compared with the other groups. *Nqo1* was up-regulated in the D2 + ADR group, which showed the highest expression of this gene. The *Gst* expression (**Figure 1C**) was significantly up-regulated in the C + ADR group. It was also elevated in the D1 + ADR group. No differences with respect the other groups were observed in the expression of *Gst* in D1+ADR were observed. The expression of *Gst* in the D2 + ADR group was up-regulated compared with the control, but it did not differ significantly compared with the C + ADR group, although the significance was 0.071. The

expression of *Ho1* (**Figure 1D**) showed a similar pattern to *Nrf2* and *Nqo1* and was higher in the C + ADR group compared with the control. It was also high in the D1 + ADR group (no difference in its expression with the other groups). The D2 + ADR group showed the highest expression of the HO1 gene.

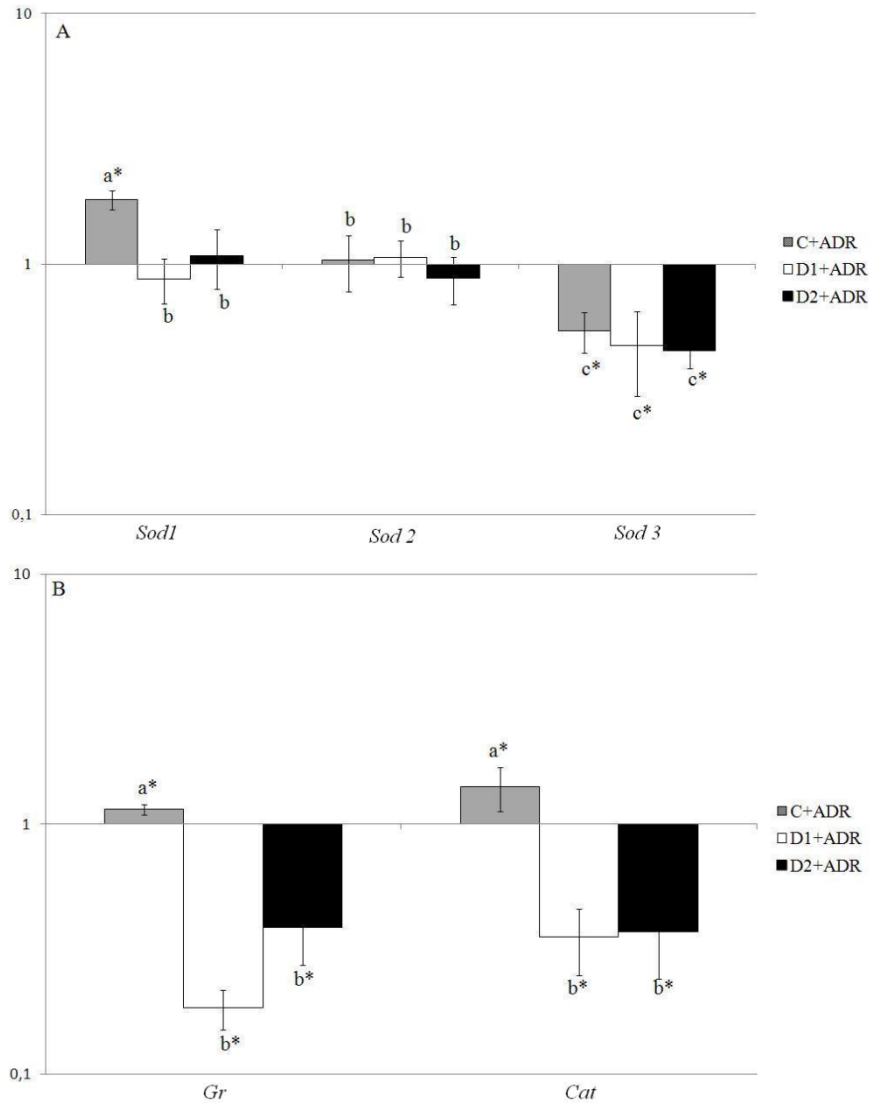


Figure 2. (A) Expression of the *Sod* (1, 2 & 3) genes determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. (B) Expression of the *Cat* and *Gr* genes determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. The bars represent the means \pm s.e. ($n = 5$) fold increase relative to the control. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments; * indicates significant differences compared with the control ($P < 0.05$).

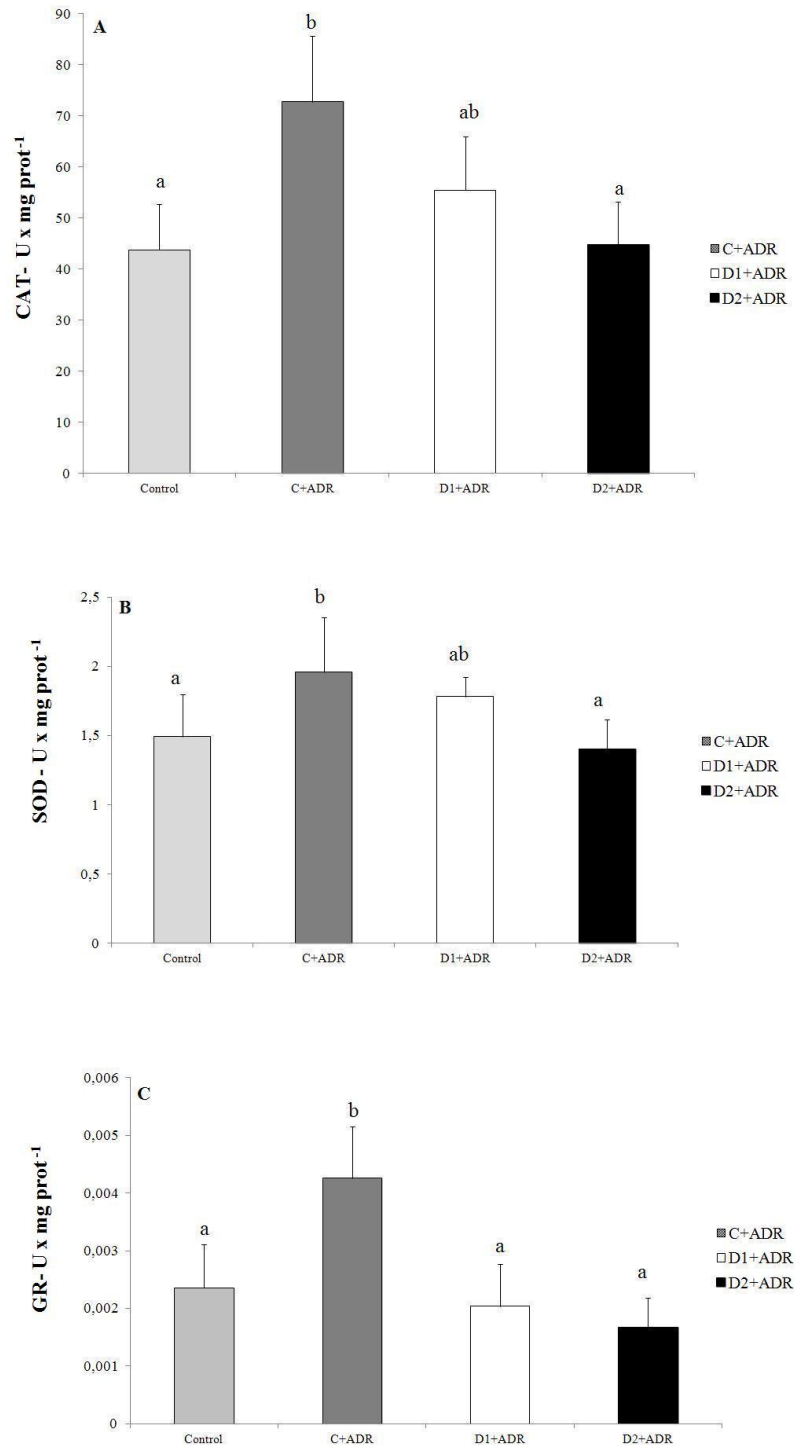


Figure 3. (A) Liver catalase (CAT) activity expressed in units of CAT per milligrams of proteins. (B) Liver superoxide dismutase (SOD) activity expressed in units of SOD per milligram of proteins. (C) Liver glutathione reductase (GR) activity expressed in units of GR per milligram of proteins. Values are the mean \pm SD of five animals per group. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments ($P < 0.05$).

The expression of SOD isoenzymes showed different patterns (**Figure 2A**). For example, *Sod2* expression did not show any change and was similar in all groups including control, while *Sod3* expression showed a significant decrease in C + ADR, D1 + ADR and D2 + ADR groups compared with the control. *Sod1*, *Cat* and *Gr* expression exhibited a similar pattern, being a significantly higher in the C + ADR group and inhibited in the D1 + ADR and D2 + ADR groups (**Figure 2A and 2B**).

CAT activity (**Figure 3A**) showed a significant increase in the C + ADR group and remained at basal levels in the D1 + ADR and D2 + ADR groups. The activity of SOD and GR (**Figure 3B and 3C**) exhibited a similar pattern, displaying a significant increase in the C + ADR groups and expression similar to the control in the D1 + ADR and the D2 + ADR groups.

3.3.4. Discussion

A previous study found that the long-term (12 months) administration of white tea extract in drinking water reversed the deleterious effects of acute oxidative stress generated by ADR in different organs (liver, heart and brain) (Espinosa *et al.*, 2012). The aim of the present study was to understand and clarify the mechanisms by which the ingestion of a white tea extract protects against acute oxidative stress.

The administration of a powerful oxidizing agent (ADR) to animals activated different mechanisms and pathways related to endogenous antioxidant defence to alleviate the damage caused by this agent, and significantly increased the synthesis of the cytoplasmic NRF2 transcription factor compared with the control animals (**Figure 1A**). These data were in concordance with the mechanism described and agrees with others authors who reported an increase at NRF2 after an oxidative perturbation. For instance, Mercado *et al.* (2011) observed that H₂O₂ treatment increased the concentration of NRF2 in human bronchial epithelial cell line (BEAS2B). Qaisiya *et al.*, 2014 described that bilirubin could cause oxidative stress and increase the levels of NRF2. They worked with the neuroblastoma SH-SY5Y cell line. The cells exposed to a toxic concentration of unconjugated bilirubin (140 nM) showed an increased intracellular ROS levels and enhanced nuclear accumulation of NRF2 protein (Mercado *et al.*, 2011; Qaisiya *et al.*, 2014).

NRF2 belongs to the basic region-leucine zipper family. NRF2 localises in the cytoplasm, where it interacts with Keap1 forming a complex. It is an immediate target of reactive oxygen species or electrophilic species, which attack the NRF2-Keap1 complex, dissociating it into NRF2 and Keap1 (Zhang, 2006). Stabilised NRF2 then translocates to the nucleus and promotes the expression of many antioxidant proteins and phase II detoxifying enzymes such as NQO1, GST and HO1 (Xu *et al.*, 1998; Kobayashi & Yamamoto, 2005).

Both the increase of oxidative stress and the elevation of NRF2 in our rats activated two different pathways. Firstly, the phase II enzymes expression (*Nqo1*, *Gst* and *Ho1*) (**Figures 1B, 1C and 1D**) was activated for the detoxification of xenobiotics, the function of which is to neutralise the toxic agent, ADR. Secondly, the synthesis and/or the activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GR) (**Figures 2 and 3**) responsible for preventing oxidative stress caused by the drug (ADR) were activated. The increase of CAT and SOD activity after treatment of ADR has been showed in others studies (Yin *et al.*, 1998). Moreover, our data showed that expression of *Cat* and *Sod1*, but not *Sod2*, were not all increased.

In spite of the activation of both defence pathways in response to ADR, our previous study demonstrated that the endogenous response of cells was insufficient to neutralise the pro-oxidant and cytotoxic effect of ADR because the antioxidant capacity was not restored and oxidative parameters were increased (Espinosa *et al.*, 2012).

Regarding the animals ingested the tea extract for a long period, the extent of the increase in *Nrf2* expression was dose-dependent and significantly higher than in animals not given the extract. This result may explain the protective effect of white tea against acute oxidative stress caused by ADR demonstrated in our previous research (Espinosa *et al.*, 2012).

The activation of NRF2 may be a novel strategy to prevent or ameliorate the liver injury caused by toxins (Xu *et al.*, 2008). This is supported by results obtained by other authors. Curcumin has been shown to attenuate the effect of dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through NRF2 mediated induction of HO1 (Farombi *et al.*, 2008). Aleksunes & Manautou (2007) proposed that the NRF2 is crucial for cytoprotection by coordinating activating detoxification genes and preventing liver

damage. Chen *et al.* (2000) showed that most catechins, epigallocatechin-3-galate and EGCG in green tea are effective at inducing the ARE-mediated activity of the luciferase enzyme in isolated HepG2 cells. They deduced that green tea catechins activated the EpRE/ARE (Chen *et al.*, 2000).

In this study, we show for the first time that white tea up-regulates the expression of phase II enzymes (*Nqo1*, *Gst* and *Ho1*) by significantly increasing levels of the NRF2 expression compared with those of a control group treated with ADR.

The three SOD isoenzymes analyzed were cytosolic homodimeric copper/zinc SOD (SOD1), the mitochondrial homotetrameric manganese SOD (SOD2), and the proteoglycan-bound copper/zinc SOD or extracellular SOD (SOD3) [10]. These SODs catalyze the conversion of O_2^- to a less harmful product, H_2O_2 , which is then converted to H_2O by catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx).

Expression of *Cat*, *Sod* and *Gr* (**Figures 2A and 2B**) did not increase in rats treated with either tea dose (D1 + ADR and D2 + ADR) while the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GR (**Figures 3A, 3B and 3C**) in the same groups showed a dose-dependent response, indicating restoration of normal activity, i.e. that present in the control group. The magnitude of the antioxidant effect of the tea extract in the body can be seen from the lack of increase in the expression / activity of SOD, CAT and GR in the treated groups. Even at higher doses, a decrease in the activity of these enzymes was observed relative to the control, although we expected to observe an increase in the antioxidant capacity and a decrease in the oxidative parameters (Espinosa *et al.*, 2012). It is important to remember that the animals consumed the white tea for most of their lives (12 months), which meant a high level of penetration of white tea compounds in all tissues. The protection reported previously was measured at microsomal level and was evident in all the organs analysed (liver, heart and brain) (Espinosa *et al.*, 2012).

The expression of *Sod2* was unaltered, neither ADR nor the long term intake of white tea affects the expression of *sod* in the mitochondria. The *Sod3* expression was down-regulated in control + ADR, D1 + ADR and D2 + ADR groups which suggest that the long time intake of white tea cannot activate *Sod3*. These results could indicate the existence of different activation pathways or that *Sod 3* does not have an ARE sequence.

Furthermore, this could be related with the fact that the enzyme activity occurs outside the cell (Fridovich, 1997). Additional research is required in this respect.

The antioxidant effect of the tea extract in our experimental model can be attributed to the large number and diversity of the polyphenols in white tea (Almajano *et al.*, 2011). Thus, in the two lines of antioxidant defence (enzymes and metabolites), white tea components appear to be ‘sufficient’ to deal with the stress induced by ADR. They seem to provide a first line of defence (polyphenols) that does not require ‘de novo’ antioxidant enzyme activities because the antioxidative potential of the extract is powerful enough to attenuate the oxidative damage induced by ADR, returning the tissue to its basal *redox status*. This may be due to its complexity, its antioxidant compounds and/or synergistic actions among them. For this reason, only the detoxification enzymes were synthesized to metabolize the ADR.

We conclude that the long-term intake of white tea extract activates the NRF2/ARE response associated with the detoxification of xenobiotics and the neutralisation of ADR before it can cause increased oxidative damage. These data explain the beneficial effects of tea extract in reducing oxidative damage and cytotoxicity caused by ADR. The antioxidant activity of white tea seems to play an important role in regulating the activity of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase. Our results reveal that the quantity and the quality of white tea polyphenols and catechins administered in our experiment were sufficient to neutralise free radicals and the resulting oxidative stress. It was not necessary to increase the level of the corresponding enzymes, a fact confirmed and reinforced by diminishing response to an increased dose of the tea extract.

Additional studies on the effects of particular polyphenols on the expression of AREs and antioxidative enzymes may shed further light on the mechanisms responsible for the regulation of nutritional factors.

Acknowledgments

This work was supported by the “Ministerio de Ciencia y Tecnología” of Spain under project AGL2005-08088-C02-01 and Beca FPU (AP2006-02642). The authors thank M^a Pilar Almajano for the extract of white tea, Alberto Cuesta Peñafiel for his

invaluable advice and assistance, Elvira Larqué Daza, Daniel Gonzalez Silvera and Rebeca Martinez-Tomás for their technical support.

3.3.5. References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aleksunes, L. M., & Manautou J. E. (2007). Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicologic Pathology*, 35:459–473.
- Almajano, M. A., Carbó, R., López-Jiménez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108:55–63.
- Almajano, M. P., Vila, I., & Gines, S. (2011). Neuroprotective effects of white tea against oxidative stress-induced toxicity in striatal cells. *Neurotoxicity Research*, 20, 372–378.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250:5475–5480.
- Chen, J., Yu, R., Owuor, E.D., Kong, A. N. (2000). Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Archives of Pharmacal Research*, 23:605–612.
- Cutts, S. M., Parson, P. G. Sturm, R. A., & Philiphs, D. R. (1996). Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *Journal of Biology and Chemistry*, 271(10), 5422–5429.
- Espinosa, C., López-Jiménez, J.Á., Cabrera, L., Larqué, E., Almajano, M. P., Arnao, M. B., Zamora, S., & Pérez-Llamas, F. (2012). Protective effect of white tea extract against acute oxidative injury caused by adriamycin in different tissues. *Food Chemistry*, 134:1780–1785.
- Farombi, E. O., Shrotriya, S., Na, H-K., Kim, S. H., & Surh, Y.J. (2008). Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food and Chemical Toxicology*, 46:1279–1287.

- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515–18517.
- Galleano, M., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2009). Cocoa, chocolate, and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 483–490.
- Goodman, J., Hochstein, P., & Angeles, L. (1977). Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 77, 797–803.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Comments on review of free radicals in biology and medicine. *Free Radicals Biology & Medicine*, 12(1), 93–95.
- Kim, M.-J., Choi, J.-H., Yang, J.-A., Kim, S.-Y., Kim, J.-H., Lee, J.-H., Kim, J.-K., & Rhee, S.-J. (2002). Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutritional Research*, 22, 733–744.
- Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, 385–394.
- Kong, A. N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R., & Mandlekar, S. (2001). Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metabolism Reviews*, 33:255–271.
- Lee, J.-M., & Johnson, J. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 37:139–143.
- Li, Y., & Jaiswal, A. K. (1992). Regulation of Human NAD (P) H⁺: Quinone Oxidoreductase Gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *Journal of Biology & Chemistry*, 267:15097–15104.

- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic Function for Erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biology & Chemistry*, 244:6049–6055.
- Mercado, N., Thimmulappa, R., Thomas, C. M., Fenwick, P. S., Chana, K. K., Donnelly, L. E., Biswal, S., Ito, K., & Barnes, P. J. (2011). Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406:292–298.
- Meewes, C., Brenneisen, P., Wenk, J., Kuhr, L., Ma, W., Alikoski, J., Poswig, A., Krieg, T., & Scharffetter-Kochanek, K. (2001). Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 30:238–247.
- Prester, T., Holtzclaw, W. D., Zhang, Y., & Talalay, P. (1993). Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:2965–1969.
- Qaisiya, M., Coda Zabetta, C. D., Bellarosa, C., & Tiribelli, C. (2014). Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cell Signalling*, 26:512–520.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D., & Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110:852–858.
- Rushmore, T. H., & Pickett, C. B. (1990). Transcriptional Subunit Gene Regulation of the Rat Glutathione. Characterization of a xenobiotic response element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 265:14648–14653.
- Santana-Rios, G., Orner, G. A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S. Y., & Dashwood, R. H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, 495:61–74.

- Sasaki, H., Akamatsu, H., & Horio, T. (2000). Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT. *Journal of Investigative Dermatology*, 114:502–507.
- Schimmel, K. J. M., Richel, D. J., van den Brink, R. B. A., & Guchelaar, H. J. (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 181–191.
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., & Ekström, A. M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123(4), 985–991.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3:768–780.
- Suzuki, E., Yorifuji, T., Takao, S., Komatsu, H., Sugiyama, M., Ohta, T., & Al., E. (2009). Green tea consumption and mortality among Japanese elderly people: The prospective Shizuoka elderly cohort. *Annals of Epidemiology*, 19, 732–739.
- Wang, D., Xu, K., Zhong, Y., Luo, X., Xiao, R., Hou, Y., Bao, W., Yang, W., Yan, H., Yao, P., & Liu, L. (2011). Acute and subchronic oral toxicities of Pu-erh black tea extract in Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 156–164.
- Xu, W., Hellerbrand, C., Köhler, U., Bugnon, P., Kan, Y.-W., Werner, S., & Beyer, T. (2008). The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Laboratory Investigation*, 88, 1068–1078.
- Yin, X., Wu, H., Chen, Y., & Kang, Y.J. (1998). Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochemical Pharmacology*, 56:87–93.
- Zhang, D. D. (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews*, 38, 769–789.

3.4. CAPITULO EXPERIMENTAL 4

INGESTA A LARGO PLAZO DE TÉ BLANCO PREVIENE EL DAÑO OXITADIVO CAUSADO POR ADRIAMICINA EN RIÑÓN

3.4.1. Introduction

Las propiedades beneficiosas del té se conocen desde hace siglos y han sido estudiadas durante décadas. Entre estas propiedades se incluyen la de prevenir diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardíacas y procesos neurodegenerativos (Serafini *et al.*, 2002). Estas propiedades se atribuyen a los flavonoides presentes en el té, ya que los beneficios antioxidantes que posee se asocian con patologías caracterizadas con una alta producción de estrés oxidativo (Galleano *et al.*, 2009). Sin embargo los mecanismos fisiológicos que relacionan las propiedades antioxidante de los polifenoles y su efecto en la salud están lejos de ser comprendidos (Galleano *et al.*, 2009).

Las diferencias entre los distintos tipos de té se deben al origen del material base y a la manera de procesarlo. Así, el procesamiento del té verde y blanco es diferente. Mientras que para producir el té verde se utilizan hojas verdes de *Camelia sinensis*, se enrollan y se vaporizan para disminuir la oxidación, en la obtención del té blanco se procesan hojas muy verdes o brotes cosechados en la primavera temprana, que son vaporizados y secados rápidamente para prevenir la oxidación (Rusak *et al.*, 2008).

Las principales catequinas que se encuentran en el té son la epicatequina (EC), la epicatequina galato (ECG), la epigalato catequina (EGC) y la epigalato catequina galato (EGCG) variando su contenido entre los distintos tipos de té. La EGCG es la mayoritaria en el té blanco y verde, sin embargo en el té blanco se encuentran en mayor proporción la cafeína, el ácido gálico, la teobromina, EGC y la ECG, lo que puede estar relacionado con su mayor actividad antioxidante (Santana-Rios *et al.*, 2001).

La incidencia de enfermedades crónicas renales está incrementando en países desarrollados y en desarrollo. En general, se reconoce que muchos pacientes con enfermedades crónicas renales son más propicios a morir en accidentes cardiovasculares antes que de una disfunción renal (Schiffrin *et al.*, 2007). De todos los síntomas más comunes de la enfermedad crónica renal, (disfunción endotelial, inflamación, estrés oxidativo, anemia, proteinuria, cambios en el metabolismo de la vitamina D, etc.) el estrés oxidativo ha atraído un gran interés por parte de los investigadores.

Un estudio de cohortes que comprenden > 13.000 pacientes ancianos reveló que el incremento en la incidencia de eventos cardiovasculares podría, en parte, estar relacionada con el hecho de que pacientes con enfermedades renales tienen menos probabilidad de recibir tratamientos preventivos frente a enfermedades cardiovasculares (Shlipak *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos que relacionan la susceptibilidad a los accidentes cardiovasculares en pacientes de enfermedades crónicas renales no están del todo claros.

El complejo NRF2 es un factor de transcripción de la familia que posee una región leucinas en forma de cremallera (cnc bZip) cap “n” collar, y que controla la expresión de diversos genes citoprotectores que codifican enzimas antioxidantes y detoxificantes (Niture & Jaiswal, 2009; Giude *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2010; Magesh *et al.*, 2012). Este factor de transcripción se encuentra en todos los tejidos, pero se activa en respuesta a un amplio rango de estimulaciones oxidativas y electrofílicas, entre las que se incluyen las especies reactivas de oxígeno y algunos agentes químicos. Ésto le da al NRF2 la capacidad de gestionar con amplio alcance los mecanismos de defensa antioxidantes de la célula. Estudios recientes demostraron que NRF2 modula la expresión de genes antioxidantes a través de la interacción con los elementos de respuesta antioxidante, ARE (Giudice *et al.*, 2010). Bajo condiciones fisiológicas normales y de bajo estrés oxidativo, NRF2 está confinado en el citoplasma asociado con la proteína supresora KEAP1m y es degradado mediante la ruta ubiquitín proteasoma. Situaciones de estrés oxidativo y factores electrofílicos estimulan la disociación del complejo NRF2-KEAP1, lo que promueve el transporte y translocación de NRF2 al núcleo para regular positivamente la expresión de los genes antioxidantes que posean la secuencia NRF2/ARE (Itoh *et al.*, 2010; Magesh *et al.*, 2012). Entre estos genes se incluyen la hemo oxigenasa 1 (*Ho1*), superóxido dismutasa (*Sod*), peroxiredoxina 1, NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (*Nqo1*) y la glutamato cisteína ligasa (Kim *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2000).

La adriamicina (ADR) o doxorubicina es una quinona de la familia de las antraciclinas, una clase de antibiótico aislado por primera vez de *Streptomyces peucetius* en la década de los 60. La adriamicina previene a replicación del ADN intercalándose entre los pares de bases (Cutts *et al.*, 1996). En humanos se usa como agente quimioterápico contra una gran variedad de tumores entre los cuales se incluyen

linfomas, leucemias y tumores sólidos. In vivo, la ADR es capaz de generar una gran variedad y número de radicales libres con efecto citotóxico (Goodman *et al.*, 1977; Halliwell & Gutteridge, 1989). Estudios clínicos en humanos han revelado que el tratamiento con algunos antioxidantes no revirtió completamente los efectos cardiotoxicos de la ADR (Schimmel *et al.*, 2004) y las investigaciones siguen adelante para encontrar agentes que los prevengan o reviertan.

Este trabajo viene precedido de dos publicaciones previas, en las cuales se demostró que el tratamiento a largo plazo con té blanco protegía frente al estrés agudo producido por la ADR en diferentes tejidos (Espinosa *et al.*, 2012), y el siguiente trabajo, todavía en prensa, que ratificó esta realidad, y se intentó clarificar los mecanismos por los cuales el té llega a proteger frente la ADR en el hígado.

El objetivo de este trabajo viene a continuar el de los anteriores, intentando esclarecer los mecanismos protectores a niveles genéticos y enzimáticos que activa el consumo a largo plazo de té blanco en los riñones, órganos muy particulares debido a sus diferentes funciones (tanto en las labores de filtrado de sangre, como su capacidad para establecer gluconeogénesis...). Para ello, analizaremos tanto la expresión del factor *Nrf2* como la expresión de las enzimas a las que éste regula (*Nqo1*, *Gst-a1*, *Ho1*, *Cat*, *Sod 1*, *Sod 2*, *Sod 3* y *Gr*), así como la actividad de las enzimas relevantes en el estado redox celular (SOD, CAT y GR). También analizaremos la actividad antioxidante total y los parámetros oxidativos en proteínas y lípidos.

3.4.2. Materials and methods

3.4.2.1. Experimental design

El protocolo de este estudio está de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia, España. Veintidós ratas Sprague-Dawley fueron cogidas al destete de Centro Animal Universitario REGA-ES300305440012 (Murcia, Spain). Los animales recibieron una dieta a base de pienso comercial para roedores (Harlan 2014 Global Rodent Maintenance, Barcelona, Spain) y fueron mantenidos en jaulas separadas en grupos de tres o cuatro, permaneciendo los machos en jaulas distintas de las hembras.

Los animales, n=22 (una mezcla homogénea de machos y hembras) fueron mantenidos en una habitación con condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C), humedad relativa $55 \pm 5\%$, frecuencia de ventilación (18 veces/h) y un fotoperíodo 12:12 luz-oscuridad. Durante 12 meses, las ratas recibieron diferentes dosis de té en el agua de bebida. El grupo control (n=12) recibió en el biberón agua destilada, el grupo con la dosis 1 (D1) (n=5) recibió 0.15 mg de extracto sólido de té blanco / Kg de peso corporal (4mg de polifenoles / Kg de peso corporal), y el grupo con la dosis 2 (D2) (n=5) recibió una dosis de 0.45 mg de extracto sólido de té blanco / Kg de peso corporal (12 mg de polifenoles / Kg de peso corporal). La bebida estuvo disponible continuamente, y las ratas bebieron *ad libitum*. Estimamos que estas dosis de té contienen el equivalente a las consumidas por humanos que beben entre cero y tres tazas de té al día, reflejando la costumbre occidental (Wang *et al.*, 2011), y nueve copas de té al día, reflejando la costumbre oriental (Suzuki *et al.*, 2009) donde la mayoría de la población consume más de siete tazas diarias. Después de 12 meses, todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal de ADR (10 mg / Kg de peso corporal), excepto la mitad de los animales control, que recibieron una inyección de suero salino. De esta manera, cuatro grupos experimentales fueron establecidos: control (C), control + ADR (C+ADR), dosis 1 de té blanco + ADR (D1+ADR) y dosis 2 de té blanco + ADR (D2+ADR). Cuarenta y ocho horas después de la administración de ADR, y manteniéndose la noche anterior en ayunas, las ratas fueron pesadas y sacrificadas mediante anestesia (sodium thiopental). Los riñones fueron extraídos e inmediatamente sumergidos en solución salina fría. Se congelaron a -80°C hasta el análisis. Para el análisis de enzimas, una pequeña parte de riñón fue homogenizada en un tampón fosfato manteniéndose todo el tiempo a temperaturas cercanas a 0°C . Para el análisis de enzimas y la medición de la capacidad antioxidante hidrofílica, grupos carbonilo e hidropéroxidos, parte de las muestras fueron homogenizadas en un tampón fosfato.

3.4.2.2. Preparation of tea infusion

El extracto de té fue preparado en Barcelona (Spain) siguiendo el protocolo descrito por Almajano *et al.* (2008). La infusión de té fue liofilizada, y el extracto se guardó a -20°C hasta su uso. Los fenoles totales contenidos en el té fueron analizados mediante un ensayo de Folin-Ciocalteu, y el perfil de las catequinas principales se determinó mediante electroforesis capilar. El té usado contiene 2180 ± 161 mg de polifenoles

totals / 100 gramos de hoja de té, expresado como mg. equivalente de ácido gálico por litro de infusión. El contenido individual de catequinas del té blanco se analizó por RP-HPLC (Almajano *et al.*, 2011). La principal catequina observada fue la epigalocatequina-3-galato (EGCG) (1525 ± 113.4 mg/100 g tea leaves). Otros muchos polifenoles estaban también presentes incluyendo epigalocatequina (159 ± 15.2 mg/100 g tea leaves) y epicatequina (54.3 ± 2.5 mg/100 g tea leaves), así como metilxantinas, incluyendo teobromina y cafeína (Almajano *et al.*, 2011).

3.4.2.3.1. *Hydrophilic antioxidant activity (HAA)*

La HAA fue medida en el riñón mediante el protocolo descrito por Arnao, Cano and Acosta (1999), que esta basado en la habilidad de los antioxidantes de la muestra de reducir el catión radical 2,2'-azino-bis-3-(ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), determinado por la decoloración del ABTS⁺⁺, y midiendo el incremento de absorbancia a 730 nm. Esta actividad es calculada comparando los valores de la muestra con una curva estándar de ácido ascórbico y expresada como equivalentes de ácido ascórbico (mmol) por miligramos de proteína.

3.4.2.3.2. *Carbonyl groups*

La concentración de grupos carbonilo en plasma, que representa la oxidación protéica, se termina por el reactivo 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), según el método de Reznick & Packer (1994), modificado por Bailey (2001). The carbonyl content was expressed in nmol/mg protein.

3.4.2.3.3. *Hydroperoxides*

La técnica descrita por Jiang *et al.*, (1992) se uso para determinar los hidroperóxidos. Se basa en la reacion del Fe²⁺ que se oxida a Fe³⁺ en condiciones ácidas. La reacción se caracteriza por la donación de un ión negativo mediado por la acción del reactivo de Fox. Se usa como indicador, el xilenol orange, sensible a la oxidación del Fe. En el caso de los hidroperóxidos, el Fe actúa como un metal de transición. La intensidad del color naranja del xilenol incrementa con la presencia de hidroperoxidos. El AMN (ammonium ferrous sulphate) es la fuente de Fe para la peroxidación lipídica, mientras que el AAPH (2-2 azobis amidinopropane) es un fuerte inductor de la peroxidación.

3.4.2.4. *Quantitative real-time PCR*

Los niveles de *Nrf2*, *Ho1*, *Nqo1*, *Gst- α 1*, *Cat*, *Gr*, *Sod1*, *Sod2* y *Sod3* fueron determinados mediante PRC cuantitativa a tiempo real. El ARN total fue extraído de 0.5 g de riñón de rata usando TRIzol Reagent (Invitrogen). Éste fue cuantificado, y la pureza se evaluó espectrofotométricamente; los ratios 260:280 fueron 1.8-2.0. El ARN fue tratado con DNAsa I (Promega) para eliminar la contaminación de ADN. ADN complementario (ADNc) fue sintetizado de 1 μ g de RNA total usando la SuperScript III reverse transcriptasa (Invitrogen) con oligo-dT18 primer. La expresión de los genes seleccionados con relevancia en el estado redox se analizó mediante PCR a tiempo real, la cual fue llevada a cabo en una maquina ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). La mezcla de reacción (que contenía 10 μ l de 2 \times SYBR Green supermix, 5 μ l de primers [0.4 μ M cada uno] y 5 μ l de modelo de cDNA) fue incubada 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60°C y, finalmente, 15 a 95°C, 1 min a 60°C y 15 seg. a 95°C. Para cada ARNm, la expresión genética fue corregida por el contenido en β -actina de cada muestra. Los primers usados pueden verse en la **Tabla 1**. En todos los casos, cada PRC fue realizada por triplicado.

3.4.2.5. *Enzyme assays*

La actividad de CAT fue medida por monitorización del consumo de H₂O₂ a 240nm (Aebi, 1984). Este método se basa en el principio de que la absorbancia disminuirá debido a la descomposición del H₂O₂ por la catalasa a 240nm. La cantidad de H₂O₂ convertida en H₂O y O₂ en un minuto bajo condiciones estándar se acepta como la tasa de la reacción enzimática. La enzima GR se midió mediante el método modificado por Carberg & Mannervik (1975). La reacción se inició por la adición de 0.1 mM NADPH a una mezcla de enzima en tampón fosfato 50mM a pH 7.0 conteniendo 2 mM de EDTA y 0.5 mM GSSG. El cambio en la absorbancia fue monitorizado a 340 nm durante 3 min por un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific model Evolution 300 dual beam. Una unidad de actividad de GR se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μ mol de NADPH por minuto (ϵ_{340} nm para NADPH 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹). La SOD se determinó basándose en la inhibición de la reducción del citocromo C en presencia de SOD a 550 nm (McCord & Fridovich, 1969). La actividad SOD de los complejos fue estudiada a 25°C por el método indirecto usando citocromo C

y oxidante superóxido (indicador). El anión radical superóxido fue generado *in situ* por la xantina oxidasa, y detectado espectrofotométricamente mediante la monitodización de la formación del citocromo C reducido a 550 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific model Evolution 300 dual beam.

Table 1. PCR primer sequences

Target gene	Sense primer (5' to 3')	Antisense primer (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	No.of cycles	Syze (bp)
<i>Nrf2</i>	CCATGCCTTCTTCCACGAA	AGGGCCCATGGATTTTCAGTT	–	40	–
<i>Nqo1</i>	GCGTCTGGAGACTGTCTGGG	CGGCTGGAATGGACTTGC	60	40	170
<i>Ho1</i>	GCGAAACAAGCAGAACCCA	GCTCAGGATGAGTACCTCCA	58	40	185
<i>Gst-α1</i>	CGGTACTTGCCTGCCTTTG	ATTTGTTTTGCATCCACGGG	59	40	248
<i>Sod1</i>	CACTCTAAGAAACATGGCG	CTGAGAGTGAGATCACACG	60	40	40
<i>Sod2</i>	TTCAGCCTGCACTGAAG	GTCACGCTTGATAGCCTC	60	40	669
<i>Sod3</i>	CTTCACCTGGTTGAGAAGATAG	GATCTGTGGCTGATCGG	60	40	735
<i>Cat</i>	ATGGCTTTTGACCCAAGCAA	CGGCCCTGAAGCTTTTTGT	60	40	68
<i>Gr</i>	GCGGGCCCTGGCATTG	GGACCAGCGCCCATCTG	60	40	132
<i>β-Actin</i>	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTC	60	40	150

Nrf2, nuclear factor E2-related factor 2; *Nqo1*, NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene; *Ho1*, heme oxygenase 1 gene; *Gst-α1*, glutathione S-transferase α1 gene; *Sod*, superoxide dismutase gene; *Cat*, catalase gene; *Gr*, glutathione reductase gene.

3.4.2.6. Statistical analyses

Los resultados se expresaron como las medias \pm SD. La normalidad de las variables fue confirmada por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Leven. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron estudiadas mediante un análisis de ANOVA de una sola vía, seguido del test de Bonferroni o Games Howell, dependiendo de la homogeneidad de las variables. El nivel de significancia fue 95% en todos los casos ($P < 0.05$). Todos los datos fueron analizados por la aplicación informática SPSS for Windows® (versión 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

3.4.3. Results

Durante los 12 meses del tratamiento, la ingesta de comida fue similar en todos los grupos, y no se detectaron diferencias entre los pesos corporales de los animales como resultado de la ingesta de té.

La **Figure 1** muestra la actividad antioxidante y la concentración de hidroperóxidos y grupos carbonilo (**A**, **B** and **C**). La actividad antioxidante sufrió una disminución significativa en el grupo C + ADR, con una respuesta dosis dependiente en los grupos D1+ADR y D2+ADR, donde la actividad antioxidante recuperó sus niveles basales (**Figura 1A**). Los grupos carbonilo e hidroperóxidos mostraron un patrón similar. La oxidación incrementó en el grupo C + ADR mientras que en los grupos D1+ADR y D2+ADR se recuperaron gradualmente los niveles basales (**Figura 1B, 1C**).

Las correlaciones entre los diferentes parámetros oxidativos fueron analizadas (AAH, carbonyl and hydroperoxide groups) y se muestran en la **Tabla 2**. No existen correlaciones significativas entre los parámetros, excepto entre los grupos carbonilo y la AAH ($R = -0.699$; $p < 0.001$). Entre la AAH y los hidroperóxidos hay una correlación de $R = -0.393$; $p = 0.078$ y entre los hidroperóxidos y los grupo carbonilo una correlación de $R = 0.384$; $p = 0.085$.

La **Figura 2** muestra la expresión de los genes *Nrf2*, *Nqo1*, *Ho1* y *Gst-α1*. El presente estudio mostró que la ADR causó la activación de la respuesta ARE en el riñón. Como se observa en la **Figura 2A**, la expresión de *Nrf2* se elevó significativamente en el grupo C + ADR. En los grupos D1+ADR y D2+ADR la expresión del *Nrf2* fue menor que en los grupos C + ADR y C.

El estudio mostró que la expresión de los genes antioxidante y detoxificantes (*Nqo1*, *Ho1*, *Gst-α1*, *Gr*, *Cat* and *Sod1*) incrementaron en el grupo (**Figuras 2 y 3**). Sin embargo, la expresión de *Sod3* y *Sod2* no difirió significativamente comparada con el grupo control (**Figura 3**). La expresión de los genes *Nqo1* y *Ho1* mostró un descenso dosis dependiente en los grupos D1+ADR y D2+ADR, volviendo a los niveles basales en grupo D2+ADR. La expresión de *Gst-α1*, *Gr* y *Cat* en los grupos D1+ADR y D2+ADR permaneció significativamente por debajo del grupo C + ADR y también del grupo control, viéndose disminuida su expresión (**Figuras 2 y 3**). La expresión de *Gr*

en incrementó en el grupo C+ADR pero no se encontraron diferencias significativas con los otros grupos (**Figure 3**).

Table 2.- Correlations between oxidation state and hydrophilic antioxidant activity (HAA).

		HAA-Carbonyl groups	HAA- Hydroperoxides	Carbonyl groups - Hydroperoxides
Kidney	R	-0.699	-0.393	0.384
	<i>p</i>	0.000*	0.078	0.085

R — Pearson's correlation coefficient. * Significant differences at $p < 0.01$.

3.4. Mecanismos por los cuales el té blanco previene el estrés oxidativo en riñón

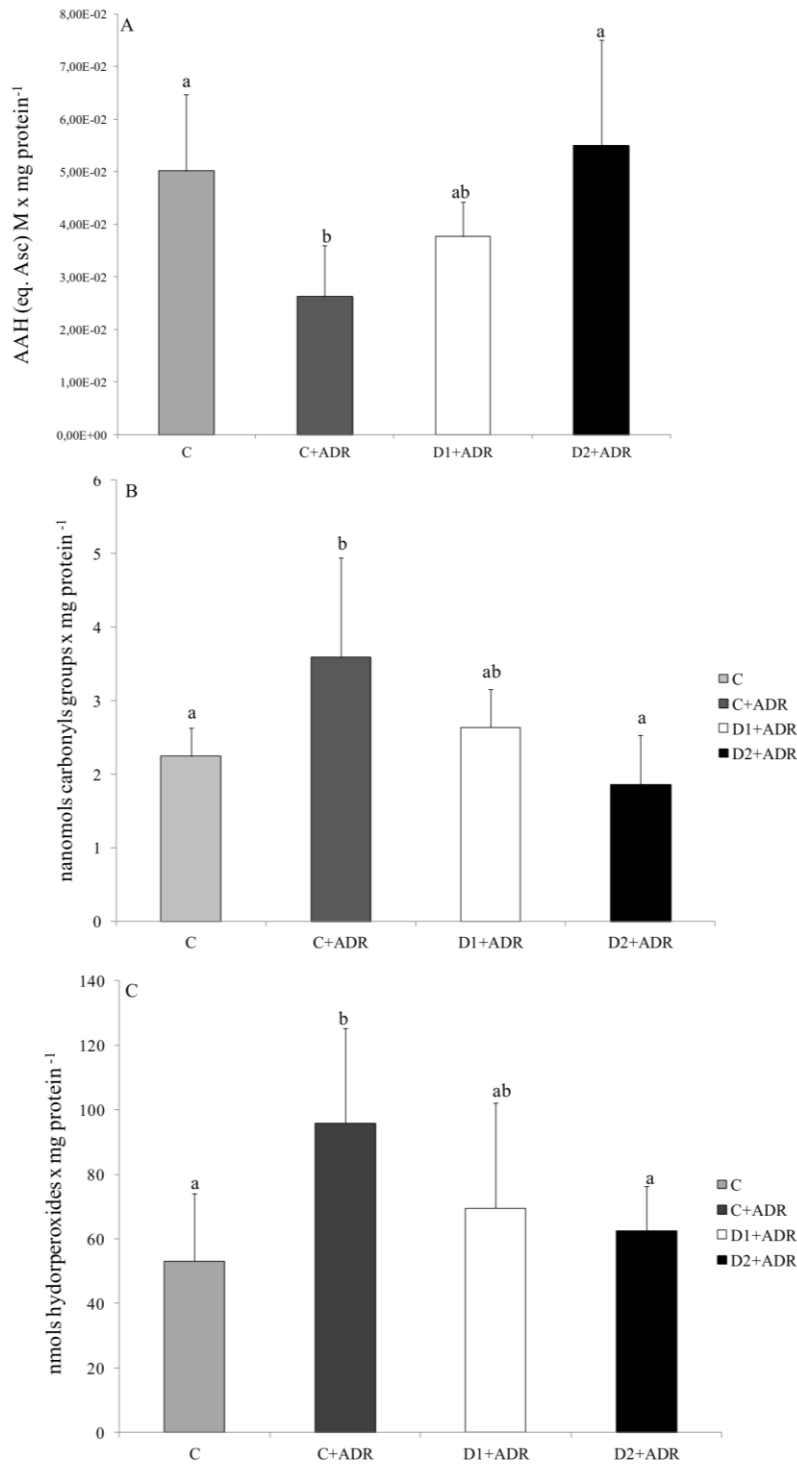


Figure 1. (A) Hydrophilic antioxidant activity (HAA) expressed in equivalents of ascorbic acid (mM) per mg of protein. (B) Concentration of carbonyl groups expressed in nanomols per mg of protein. (C) Concentration of hydroperoxides expressed in nanomols per mg of protein. Values are the mean \pm SD of 5 animals per group. Values with different letters indicated statistically significant differences among treatments ($p < 0.05$).

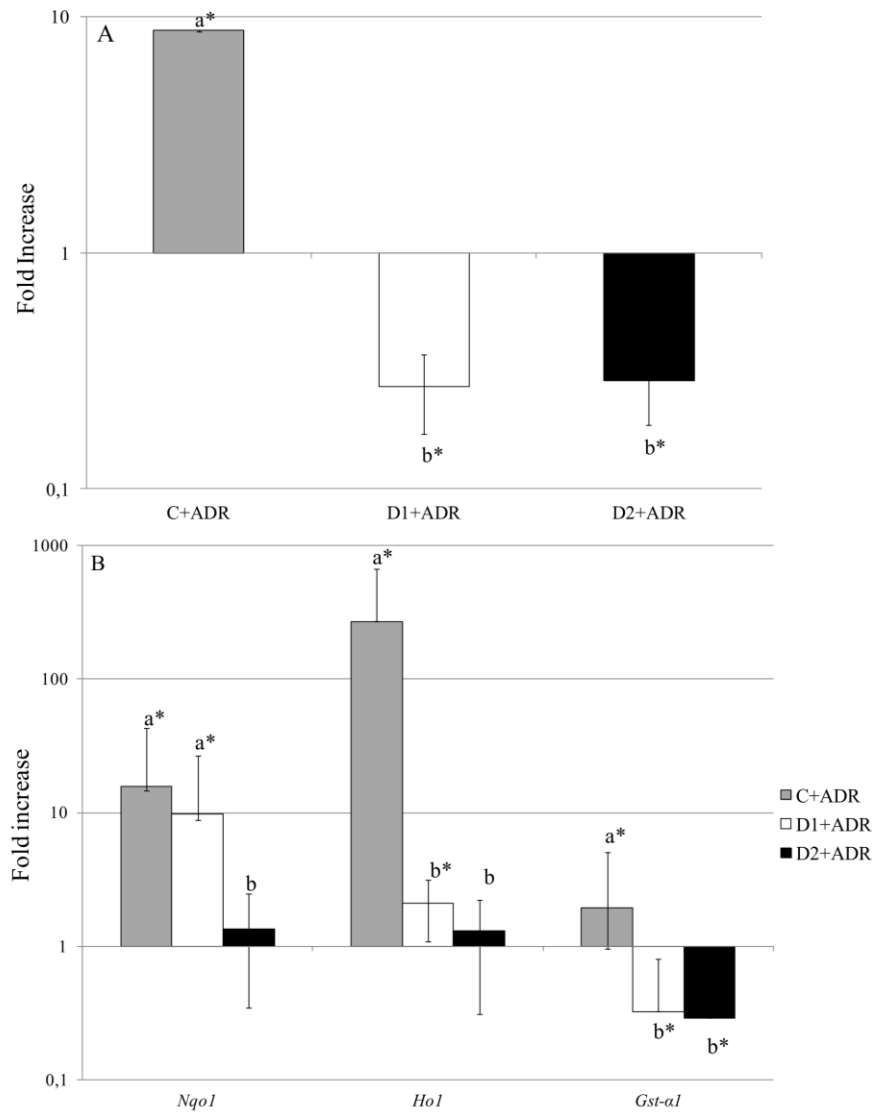


Figure 2. (A) Expression of the *Nrf2* gene determined by real-time PCR in the kidney of rats after intraperitoneal injection of ADR. (B) Expression of the *Nqo1*, *Gst* and *Ho1* genes determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. The bars represent the mean \pm s.e. ($n = 5$) fold increase relative to the control. Values with different letters indicate statistically significant differences between treatments; * indicates significant differences compared with the control ($P < 0.05$).

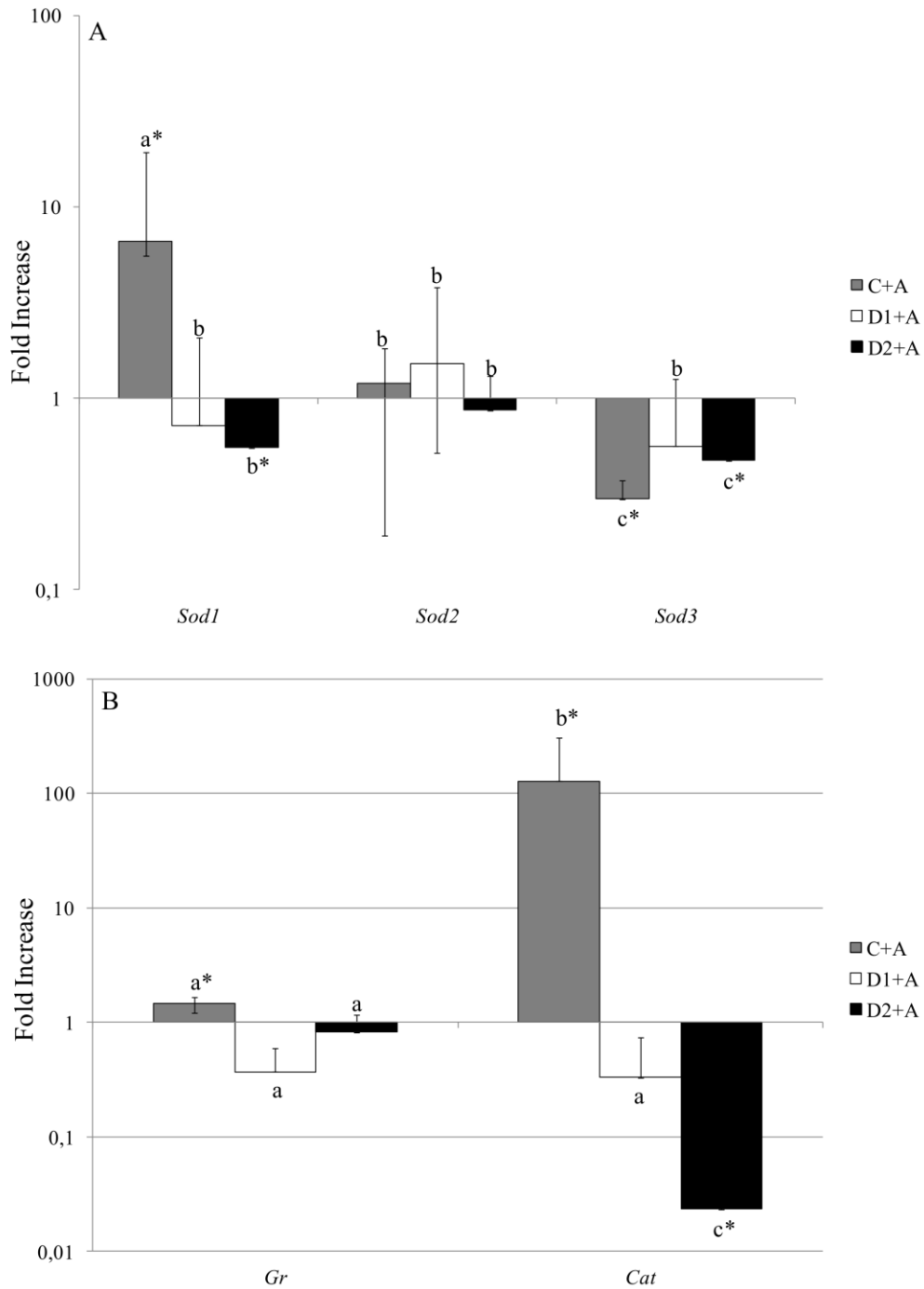


Figure 3. (A) Expression of the *Sod* (1, 2 & 3) genes determined by real-time PCR in the kidney of rats after intraperitoneal injection of ADR. (B) Expression of the *Cat* and *Gr* genes determined by real-time PCR in the liver of rats after intraperitoneal injection of ADR. The bars represent the means \pm s.e. ($n = 5$) fold increase relative to the control. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments; * indicates significant differences compared with the control ($P < 0.05$).

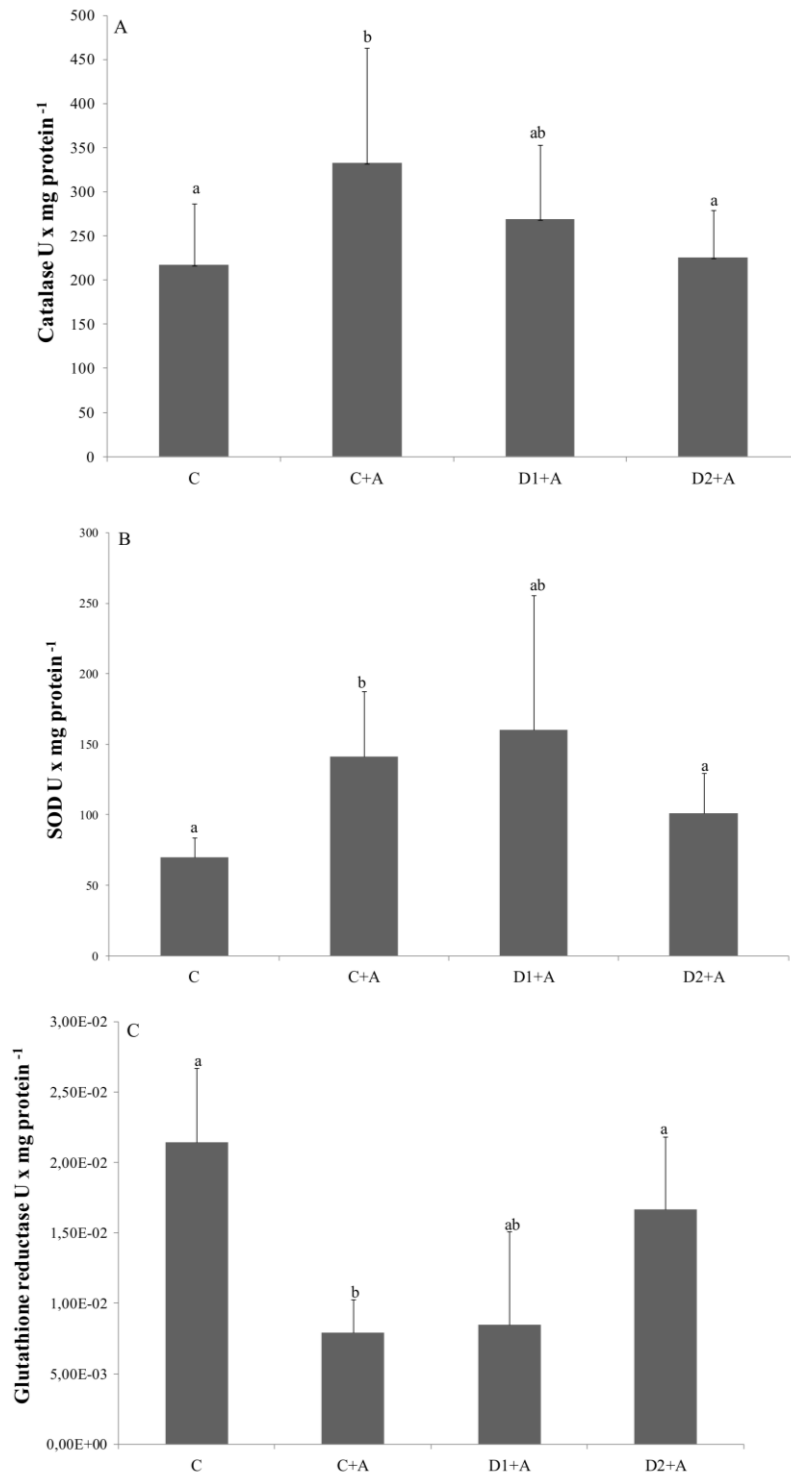


Figure 4. (A) Kidney catalase (CAT) activity expressed in units of CAT per milligram of protein. (B) Kidney superoxide dismutase (SOD) activity expressed in units of SOD per milligram of protein. (C) Kidney glutathione reductase (GR) activity expressed in units of GR per milligram of protein. Values are the mean \pm SD of five animals per group. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments ($P < 0.05$).

3.4.4. Discussion

Publicaciones previas a este trabajo han estudiado el efecto del consumo a largo plazo del extracto de té blanco frente al estrés oxidativo agudo provocado por ADR (Espinosa *et al.*, 2012, 2014). El propósito de este artículo fue el estudio del *estatus* oxidativo y los mecanismos de defensa antioxidante, tanto genéticos como enzimáticos del riñón tras un tratamiento a largo plazo con té blanco en condiciones normales y tras una agresión causada por un agente fuertemente oxidante, y comparar los resultados obtenidos con los órganos previamente estudiados (Espinosa *et al.*, 2012, 2014).

Los resultados de la actividad antioxidante (AAH) en el riñón muestran una disminución de la capacidad antioxidante en el grupo control + ADR (Figura 1A), coincidiendo con un incremento de los parámetros de oxidación proteica (Figura 1B) y oxidación lipídica (Figura 1C). Es decir, que la ADR ha provocado un fuerte impacto oxidativo en el riñón, disminuyendo su defensa antioxidante y dañando las proteínas y los lípidos del mismo sin que las defensas antioxidantes naturales del riñón hayan podido reparar o restaurar la situación observada en el grupo control. Sin embargo, en las ratas tratadas con las diferentes dosis de té blanco, si se observa una respuesta frente al daño de la ADR. La capacidad antioxidante vuelve, no todavía con la dosis 1 de té, pero sí con la dosis 2 de té, a los niveles observados en las ratas control. También vemos esta respuesta dosis dependiente en los análisis de grupos carbonilos e hidroperóxidos (Figura 1A, B y C). El hecho de que exista una correlación inversa entre la actividad antioxidante y la oxidación proteica $R = -0.699$; $P < 0.001$ (bastante relevante significativamente) refuerza y da más peso a los datos obtenidos y aunque las otras correlaciones no son significativas, si que poseen una gran relevancia a la hora de relacionar los parámetros analizados.

Con estos análisis podemos ratificar el hecho de que el té blanco ingerido a largo plazo protege frente al estrés oxidativo causado por la ADR. Pero para entender los mecanismos por los cuales esto llega a ser llevado a cabo hemos realizado otra serie de pruebas.

Para empezar, nos hemos centrado en el factor de transcripción NRF2, el cual, en situaciones normales de *estatus redox* “inalterado”, se encuentra unido a la proteína KEAP1, complejo que de no ser alterado es degradado vía ubiquitinación proteosoma

(Hou *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2013). En situaciones de estrés oxidativo, el complejo NRF2- KEAP1 se disocia permitiendo la entrada de NRF2 en el núcleo (Lu *et al.*, 2011). Una vez en el núcleo, va a reconocer las secuencias ARE diseminadas por el ADN y se va a unir a ellas, promoviendo la expresión de los genes de respuesta antioxidantes y las enzimas de fase II.

El estudio mostró que en el riñón, la ADR ha provocado un incremento en la expresión de *Nrf2* (**Figura 2A**). Este incremento en la expresión del NRF2 causa una activación de otros genes, como se observó en los análisis de *Gst-a1*, *Nqo1*, *Ho1*, *Cat*, *Sod1* y *Gr*. Todos éstos tuvieron un incremento significativo respecto al grupo control (**Figura 2 B y 3**) lo cual puede ser considerado como una respuesta mediada por el factor NRF2 causada por el estrés oxidativo provocado por la ADR. Estos hallazgos son consistentes con otros que mostraron que el factor NRF2 activa un set de genes para hacer frente a un significativo estímulo oxidativo: por ejemplo, Sahin *et al.* (2012) encontró que la respuesta al estrés oxidativo causada por incremento de temperatura activó también la respuesta NRF2/ARE. En el presente estudio, el incremento de la expresión de los genes *GST-a1*, *Nqo1*, *Ho1*, *Cat*, *Gr* y *Sod1* fue seguida por un incremento en la actividad de las enzimas analizadas (CAT y SOD) (**Figuras 4A y 4B**). La disminución de la actividad de GR frente al estrés oxidativo es una observación interesante debido a que en el anterior estudio esto no se observó. El hígado incrementó su actividad en el grupo C + ADR, en respuesta al estrés oxidativo (Espinosa *et al.* 2014). Sin embargo, su actividad disminuyó en el riñón, en el mismo grupo experimental, siendo esto consistente con lo publicado por Yeung *et al.*, (1991) quien indica que la GR no reacciona de la misma manera contra un estrés oxidativo agudo en el hígado y en el riñón, por lo que su regulación debe ser diferente. Esto puede ser debido a la relación establecida entre las enzimas GR y las otras como CAT, SOD y/o GPx, las cuales necesitan glutatión reducido, (el cual es en parte renovado por la GR) para funcionar. El aporte de glutatión reducido a una tasa muy alta puede disminuir la vida media del enzima, su actividad en cara al estrés oxidativo, que precisamente es cuando se necesita fabricar más enzima. Sin embargo, en el hígado, posiblemente debido a su función detoxificadora, esta enzima se ve reforzada y muestra incrementos de actividad en situaciones de alta demanda (antioxidantes o situaciones de estrés oxidativo).

Del análisis de la actividad antioxidante la oxidación proteica y lipídica (**Figura 1**), se deduce que los antioxidantes no fueron suficientes para neutralizar el efecto oxidativo de la ADR. Estos resultados son consistentes con aquellos vistos en nuestros anteriores trabajos, donde describíamos como la defensa antioxidante de los animales del grupo control+ADR no fueron suficientes para neutralizar el daño probocado (Espinosa *et al.*, 2012, 2014).

Además, en los animales consumieron el extracto de té blanco durante un largo periodo de tiempo, diferentes respuestas fueron observadas en el grupo control+ADR.

El consumo a largo plazo de extracto de té blanco protegió contra el daño oxidativo causado por la ADR, como hemos visto en los resultados obtenidos midiendo la actividad antioxidante, la concentración de grupos carbonilo y los hidroperóxidos (**Figure 1**), cuyos niveles volvieron a aquellos observados en los grupos control de manera dosis dependiente. Estos resultados son consistentes con los estudios previos que indican que el aporte de un antioxidante puede neutralizar el daño oxidativo causado por la ADR, en hígado, corazón y cerebro (Espinosa *et al.*, 2012, 2014). Sin embargo, los resultados en la bibliografía son contradictorios en este sentido: por ejemplo, en nuestro trabajo previo se obtuvo una reducción significativa de los parámetros oxidativos (Espinosa *et al.*, 2012, 2014) y, en otros trabajos la reducción de los efectos tóxicos de la ADR se observó también cuando se administra vitamina E sin disminuir la capacidad quimioterapéutica del agente (Myers *et al.*, 1976). En contraste, otros vieron que la vitamina E aumentaba el efecto tóxico de la ADR (Alberts *et al.*, 1978), o que la vitamina E no tubo efecto contra la ADR (Van Vleet *et al.*, 1980). Kurbacher *et al.* (1996) observó efectos tóxicos sinérgicos cuando administraba simultaneamente ácido ascórbico y ADR en dos líneas de células de tumor de mama (MCF-7 and MDA-MB-231). Estos autores sugirieron que el mecanismo por el cual el efecto tóxico aumentaba, estaba relacionado con las propiedades antioxidantes del ascórbico, como también sugirió Miura *et al.* (1994).

En cuanto a la activación del factor de transcripción NRF2, los resultados contrastan con los observados en nuestras publicaciones previas, donde observábamos que el té blanco administrado a largo plazo incrementaba en gran manera la expresión de *Nrf2*, promoviendo la expresión de las enzimas antioxidantes y detoxificantes (Espinosa *et al.*, 2014). Sin embargo, en el riñón, la respuesta los grupos dose 1 + ADR and dose + ADR

2 resultó en una disminución de la expresión del *Nrf2* hasta el punto de ser significativamente menor que el grupo control (**Figura 2A**). Esta regulación negativa del gen podría explicar la expresión similar en los genes *Nqo1*, *Ho1*, *Sod1*, y una disminución significativa comparada con el grupo control de los genes *Gst-a1*, *Cat* y *Gr* (**Figuras 2B y 3**).

Los resultados del análisis de la expresión de genes mostró un patrón lógico que relaciona las actividades de cada enzima con sus expresiones (excepto en el caso de la SOD y GR). Estos genes (*Cat* and *Sod1*) incrementaron su expresión y actividad en el grupo C+ADR y se mantuvieron o disminuyeron su expresión y actividad en los grupos D2+ADR (**Figure 3 and 4**). Estos resultados concuerdan con los observados en nuestro trabajo previo (Espinosa et al., 2014), donde sugerimos la posibilidad de que los polifenoles de té, tras suministrarse durante un largo periodo de tiempo, debido a sus propiedades antioxidantes y a su relativa gran concentración fueron suficientes para neutralizar los efectos negativos de la ADR. Así mismo, a través de los mecanismos de regulación negativa, la activación de los genes es controlada, y se disminuye la síntesis de enzimas antioxidantes ya que estos no hacen falta. Esta hipótesis podría explicarse por el hecho de que los polifenoles se localizan en la interfase de la célula-citosol (Verstraeten et al., 2003), espacio muy susceptible de ser objetivo del primer ataque de la ADR. Existen varios estudios con liposomas compuestos por fosfatidilcolina y fosfatidiserina donde se ha visto que la (-)-epicatechin (EC) se absorbe oligomeros en la superficie de los liposomas e inhibe la oxidación lipídica por oxidantes hidrofobicos (Verstraeten et al., 2003). La fuerza de las interacciones establecidas entre los oligomeros y EC y la superficie de las membranas depende en gran medida de la naturaleza de los grupos polares de los fosfolipidos, en orden galactolipids> phosphatidylcholine> phosphatidylserine (Oteiza et al., 2005). A través de estas interacciones, los flavonoides pueden ser atrapados en las membranas de la superficie y ejercer efectos protectivos locales. Si estos polifenoles se localizan en la superficie celular son relativamente funcionales, pueden neutralizar la oxidación causada por ADR, y consecuentemente la activación de las enzimas antioxidantes podría no ser requerida. Investigación adicional en este campo es requerida.

En un estudio similar en hígado, la expresión de los enzimas de fase II (*Nqo1*, *Ho1* and *GST-a1*) fue mas elevada en los grupos D1+ADR y D2+ADR que en el grupo

control y C + ADR (Espinosa et al., 2014). Sin embargo, en el presente estudio la expresión de estas enzimas es menor que en el grupo C+ ADR, y similar a la expresión de grupo control en los genes *Ho1* and *Nqo1*, e incluso significativamente menor en el gen *GST-α1* (**Figure 2B**). Más estudios en este campo son requeridos para clarificar los diferentes niveles expresión observada en los genes.

En cuanto a la superóxido dismutasa, se analizaron tres isoenzimas. La SOD citosólica homodimérica Cu/Zinc (SOD1), la SOD mitocondrial homotetramérica Mn (SOD2), y la SOD unida al proteoglicano Cu/Zinc o extracelular (SOD3) (Fridovich, 1997). Estas SODs catalizan la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a un producto menos dañino, H_2O_2 , el cual es transformado a H_2O por la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

El análisis de la expresión de las tres isoenzimas de SOD mostraron una expresión que se mantuvo inalterada en la *Sod 2*, por lo que podemos concluir que ni la ADR ni el tratamiento a largo plazo con el té blanco afectaron a la expresión de SOD en la mitocondria. La expresión de *Sod 3* se mantuvo reprimida comparada con el control en los grupos C + ADR, D1 + ADR y D2 + ADR, sugiriendo que el tratamiento a largo plazo con el té blanco no tubo efecto en la expresión de *Sod 3*. Estos resultados podrían indicar una diferencia en la ruta de activación de esta enzima, o que *Sod 3* no tiene secuencia ARE que une a NRF2. Este comportamiento podría explicarse también por el hecho de que la actividad de esta enzima sucede en el exterior celular. Estos resultados son consistentes con los descritos en un trabajo similar en hígado (Espinosa et al., 2014). Estudios adicionales son requeridos para explicar o justificar las hipótesis propuestas, necesiándose más investigación en esta área.

Como mencionábamos anteriormente, la GR podría tener otro tipo de regulación. Tanto la actividad como la expresión difieren entre los órganos (Espinosa et al., 2014) y entre las demás enzimas antioxidantes, pero las diferentes expresiones podrían explicarse por la relación entre las enzimas explicada anteriormente. La actividad de la GR en los grupos tratados con las dos dosis de té blanco volvió a los niveles de actividad basal encontrados en grupo control de manera dosis dependiente. Finalmente, el tratamiento con té blanco retornó la GR a sus niveles basales.

Para concluir, el té blanco administrado durante un largo periodo de tiempo protegió al riñón contra el efecto oxidativo de la ADR tanto a nivel proteico como lipídico,

manteniendo los niveles antioxidantes observados en los animales control. La respuesta asociada NRF2/ARE es activada en orden de detoxificar y neutralizar el daño oxidativo producido por la ADR antes de que ocurra: sin embargo, los animales que no fueron tratados con té no pudieron contrarrestar este daño. Los resultados son claros en cuanto que las propiedades de té neutralizan el daño oxidativo y citotóxico de la ADR. La capacidad antioxidante del té blanco y su habilidad para establecerse o situarse en la interfase citosol-membrana parece jugar un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo y la activación de la respuesta NRF2, el cual activa o inhibe la síntesis de enzimas antioxidantes y de fase II. Estos resultados revelan que la calidad y cantidad de los polifenoles y catequinas en el té blanco utilizado en nuestro estudio fue suficiente para neutralizar los radicales libres y el resultante estrés oxidativo. No fue necesario la activación de los enzimas antioxidantes y de fase II, lo que se confirma y se refuerza por la respuesta dosis dependiente cuando incrementamos la dosis de té blanco. Existen diferencias en la respuesta causada por la ADR en el hígado y en el riñón. Estudios adicionales son necesarios para comprender las diferencias entre órganos y clarificar los mecanismos envueltos en la regulación de los genes implicados en la defensa antioxidante y modulada por diferentes componentes de la dieta.

Acknowledgments

This work was supported by the “Ministerio de Ciencia y Tecnología” of Spain under project AGL2005-08088-C02-01 and Beca FPU (AP2006-02642). The authors thank M^a Pilar Almajano for the white tea extract, Alberto Cuesta Peñafiel for his invaluable advice and assistance and Elvira Larqué Daza, Daniel Gonzalez Silvera and Rebeca Martinez-Tomás for their technical support.

3.4.5. References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Alberts, D. S., Yei-Mei Peng, & Moon, T. E. (1978). α -tocopherol pretreatment increases adriamycin bone marrow toxicity. *Biomedicine Express*, 29(6), 189–191.
- Almajano, M. A., Carbó, R., López-Jiménez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108:55–63.
- Almajano, M. P., Vila, I., & Gines, S. (2011). Neuroprotective effects of white tea against oxidative stress-induced toxicity in striatal cells. *Neurotoxicity Research*, 20, 372–378.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250:5475–5480.
- Cutts, S. M., Parson, P. G. Sturm, R. A., & Philipps, D. R. (1996). Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *Journal of Biology and Chemistry*, 271(10), 5422–5429.
- Espinosa, C., López-Jiménez, J.Á., Cabrera, L., Larqué, E., Almajano, M. P., Arnao, M. B., Zamora, S., & Pérez-Llamas, F. (2012). Protective effect of white tea extract against acute oxidative injury caused by adriamycin in different tissues. *Food Chemistry*, 134:1780–1785.
- Espinosa, C., Pérez-Llamas, F., Guardiola, F. A., Esteban, M. A., Arnao, M. B., Zamora, S., & López-Jiménez, J. Á. (2014). Molecular mechanisms by which white tea intake prevents oxidative-induced stress in vivo. *Journal of Physiology and Biochemistry*. doi:10.1007/s13105-014-0357-9.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515–18517.

- Galleano, M., Verstraeten, S. V, Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 23–30.
- Giudice, A., Arra, C., & Turco, M. C. (2010). Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 647, 37–74.
- Goodman, J., Hochstein, P., & Angeles, L. (1977). Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 77, 797–803.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Comments on review of free radicals in biology and medicine. *Free Radicals Biology & Medicine*, 12(1), 93- 95.
- Itoh, K., Mimura, J., & Yamamoto, M. (2010). Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1665–78.
- Jiang, Z-Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous Iron oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202, 384–389.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(9), 1304–1039.
- Kim, M.-J., Choi, J.-H., Yang, J.-A., Kim, S.-Y., Kim, J.-H., Lee, J.-H., Kim, J.-K., & Rhee, S.-J. (2002). Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutritional Research*, 22, 733–744.
- Kurbacher, C. M., Wagner, U., Kolster, B., Andreotti, P. E., Krebs, D., & Bruckner, H. W. (1996). Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Letters*, 103(2), 183–189.

- Lu, H., Cui, W., & Klaassen, C. D. (2011). Nrf2 protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced oxidative injury and steatohepatitis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(2), 122–135.
- Magesh, S., Chen, Y., & Hu, L. (2012). Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews*, 32(4), 687–726.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for Erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biology & Chemistry*, 244:6049–6055.
- Miura, Y. H., Tomita, I., Watanabe, T., Hirayama, T., & Fukui, S. (1998). Active oxygens generation by flavonoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21(2), 93–96.
- Myers, C. E., Bonow, R., & Palmeri, S. (1983). A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Seminars in Oncology*, 10(1), 53–55.
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? *Clinical and Developmental Immunology*, 12(1), 19–25.
- Reznick, A. Z., & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 257–263.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D., & Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110:852–858.
- Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, Z., Tuzcu, M., & Sahin, N. (2012). Curcumin ameliorates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4035–4041.

- Santana-Rios, G., Orner, G. A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S. Y., & Dashwood, R. H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, 495:61–74.
- Schiffrin, E. L., Lipman, M. L., & Mann, J. F. E. (2007). Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*, 116(1), 85–97.
- Schimmel, K. J. M., Richel, D. J., van den Brink, R. B. A., & Guchelaar, H. J. (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 181–191.
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., & Ekström, A. M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123(4), 985–991.
- Shlipak, M. G., Heidenreich, P. A., Noguchi, H., Chertow, G. M., Browner, W. S., & McClellan, M. B. (2002). Association of renal insufficiency with treatment and outcomes after myocardial infarction in elderly patients. *Annals of Internal Medicine*, 137(7), 555–562.
- Singh, A., Happel, C., Manna, S. K., Acquaaah-Mensah, G., Carrerero, J., Kumar, S., Nasipuri, P., Krausz, K. W., Wakabayashi, N., Dewi, R., Boros, L. G., Gonzalez, F. J., Gabrielson, E., Wong, K. K., Girnun, G., & Biswal, S. (2013). Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2921–2934.
- Suzuki, E., Yorifuji, T., Takao, S., Komatsu, H., Sugiyama, M., Ohta, T., & Al., E. (2009). Green tea consumption and mortality among Japanese elderly people: The prospective Shizuoka elderly cohort. *Annals of Epidemiology*, 19, 732–739.
- Van Vleet, J. F., Ferrans, V. J., & Weirich, W. E. (1980). Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *American Journal of Pathology*, 99(1), 13–42.
- Verstraeten, S. V., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and

disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology & Medicine*, 34(1), 84–92.

Wang, D., Xu, K., Zhong, Y., Luo, X., Xiao, R., Hou, Y., Bao, W., Yang, W., Yan, H., Yao, P., & Liu, L. (2011). Acute and subchronic oral toxicities of Pu-erh black tea extract in Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 156–164.

3.5. CAPITULO EXPERIMENTAL 5

EFFECTO DE LA INGESTION A LARGO PLAZO DE TÉ BLANCO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO AGUDO RATAS.

3.5.1. Introduction

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se producen de forma natural en las rutas celulares del metabolismo aeróbico, incluyéndose la fosforilación oxidativa, las cadenas de transporte de electrones de la mitocondria y microsomas, la actividad de las enzimas oxidoreductasas, y reacciones inmunológicas como la fagocitosis (Halliwell & Gutteridge, 2007). Los radicales libres son neutralizados por un elaborado sistema de defensa compuesto por enzimas tales como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y numerosos antioxidantes no enzimáticos, incluyendo vitamina A, E y C, glutatión ubiquinona, flavonoides y otros.

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta. Por supuesto, las frutas, los vegetales, diversas bebidas (té, vino, zumos), plantas, y algunas hierbas están cargadas con grandes dosis de polifenoles antioxidantes. Los compuestos fenólicos han incrementado el interés de los consumidores y fabricantes por los numerosos estudios epidemiológicos que han sugerido asociaciones entre el consumo de bebidas o comidas ricas en polifenoles y la prevención de ciertas enfermedades crónicas como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Manach *et al.*, 2005; Duthie, 2007).

Té (*Camellia sinensis*) posee propiedades beneficiosas en la prevención de enfermedades como el cáncer, patologías cardíacas, y enfermedades neurodegenerativas (Serafini *et al.*, 2002). Estos efectos han sido atribuidos al contenido de flavonoides del té, los cuales pueden ser beneficiosos en situaciones patológicas asociadas con un alto nivel de producción de radicales libres (Galleano *et al.*, 2009).

La cantidad de ácidos grasos y el nivel de antioxidantes encontrados en membranas biológicas difieren entre especies y entre tejidos de la misma especie. La variación en las cadenas largas de ácidos grasos peroxidables y los antioxidantes encontrados en las membranas celulares las hacen vulnerables a la peroxidación lipídica. Los ácidos grasos insaturados son más susceptibles de ser dañados por las especies reactivas de oxígeno (ROS), la sensibilidad a la peroxidación lipídica incrementa conforme aumenta el número de dobles enlaces en los ácidos grasos (North *et al.*, 1994). La medida de la peroxidación lipídica es uno de los ensayos más comúnmente utilizados en las situaciones de inducción de daño oxidativo por radicales libres (Svingen *et al.*, 1979; Sevanian & Hochstein, 1985).

La adriamicina (ADR) es una quinona que pertenece al grupo de las antraciclinas. La ADR se utiliza en quimioterapia para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como linfomas, leucemias o tumores sólidos debido a su habilidad de prevenir la replicación celular (Cutts *et al.*, 1996). Además, la ADR produce ROS *in vivo* una vez es metabolizada, causando toxicidad en los pacientes y representando un serio problema en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, los estudios clínicos en humanos han mostrado que el tratamiento con ciertos antioxidantes no revierten completamente los efectos cardiotoxicos de la ADR, comenzando así una búsqueda de agentes que eliminen estos efectos secundarios (Schimmel *et al.*, 2004).

Investigaciones previas mostraron que el tratamiento a largo plazo con té blanco inhibe el efecto oxidativo de la ADR en diferentes tejidos (hígado, corazón y cerebro) (Espinosa *et al.*, 2012), y mostraron los mecanismos envueltos en la protección del té blanco en el estrés oxidativo en el hígado (Espinosa *et al.*, 2014). El objetivo de este trabajo es analizar los efectos de la ADR y la ingesta a largo plazo del extracto de té blanco en el plasma y en el perfil de ácidos grasos de hígado y corazón en ratas.

3.5.2. Materiales y método

3.5.2.1. Diseño experimental

El protocolo de estudio estuvo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Bioética de la universidad de Murcia, España. Veintidós ratas Sprague–Dawley al destete fueron recogidas del University Animal Center REGA-ES300305440012 (Murcia, Spain). Los animales recibieron una dieta comercial para roedores (Harlan 2014 Global Rodent Maintenance, Barcelona, Spain) y se guardaron en jaulas separadas en grupo de tres o cuatro, con machos y hembras separados.

Los animales, n=22 (Un número igual de machos y hembras) fueron mantenidas en una habitación en condiciones controladas: temperatura 23 ± 2 °C, humedad relativa $55 \pm 5\%$, frecuencia de ventilación 18 veces/h y un fotoperíodo de 12:12 h luz–oscuridad. Durante 12 meses, las ratas recibieron diferentes dosis de té en el agua de bebida. El grupo control (n=12) recibió agua destilada; el grupo dosis 1 (D1) (n=5) recibió 15 mg de extracto sólido de té/kg de peso corporal (4 mg de polifenoles /kg de peso corporal), y el grupo dosis 2 (D2) (n=5) recibió una dosis de 45 mg de extracto sólido de té/kg de

peso corporal (12 mg de polifenoles/kg de peso corporal) disuelto en agua destilada. El agua estuvo disponible continuamente, y las ratas bebieron *ad libitum*. Nosotros estimamos que estas dosis contienen una cantidad de té equivalente a aquellas consumidas en humanos que beben entre cero y tres tazas de té al día, reflejando la costumbre occidental (Surch, 2003), y nueve tazas de te al dia, reflejando al costumbre oriental (Suzuki *et al.*, 2009). Tras 12 meses, todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal de ADR (10 mg/kg body weight), excepto la mitad de los animales control, que recibieron una inyección de solución salina. De esta manera, se establecieron cuatro grupos experimentales: control, control + ADR (C + ADR), dosis 1 de té blanco + ADR (D1 + ADR) y dosis 2 de té blanco + ADR (D2 + ADR). Cuarenta y ocho horas después de la administración de la ADR, tras una noche de ayunas, las ratas se pesaron y se sacrificaron bajo anestesia (sodium thiopental). Muestra de plasma fueron obtenidas de las ratas recientemente anestesiadas y se guardaron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. El corazón y el hígado fueron obtenidos e inmediatamente puestos en frío en una solución salina. Los microsomas, obtenidos según el protocolo de Philipp and Shapiro (1979), fueron guardados congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

3.5.2.2. Preparación de la infusión de té

El extracto de té fue preparado en Barcelona (Spain) siguiendo el protocolo descrito por Almajano *et al.*, (2008). Las infusiones de té se liofilizaron, y el extracto fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El contenido total de fenoles fue analizado por el método de Folin–Ciocalteu, y el perfil de las catequinas mas importantes fue determinado por electroforesis capilar. El té blanco usado contiene 2180 ± 161 mg del total de polifenoles/100 g de hoja de té, expresado en mg equivalentes de ácido gálico por litro de infusión. El contenido en catequinas individuales del té blanco fue analizado por RP-HPLC (Almajano *et al.*, 2011). La principal catequina observada fue la epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (1525 ± 113.4 mg/100 g tea leaves). Muchos otros polifenoles estuvieron también presentes, incluyendo epigallocatequina (159 ± 15.2) y epicatequina (54.3 ± 2.5) (mg/100 g tea leaves), así como metilxantinas como la teofilina y la cafeína (Almajano *et al.*, 2011).

3.5.2.3. *Actividad antioxidante hidrofílica (HAA)*

La HAA se midió en plasma usando el método descrito por Arnao *et al.*, (1999), que está basado en la habilidad de los antioxidantes de la muestra de reducir el catión radical 2,2'-azino-bis-3-(ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), determinado por la decoloración del ABTS⁺, y midiendo el incremento de absorbancia a 730 nm. Esta actividad es calculada comparando los valores de la muestra con una curva estándar de ácido ascórbico y expresada como equivalentes de ácido ascórbico (mmol) por miligramos de proteína. Las muestras se analizaron por triplicado.

3.5.2.4. *Hidroperóxidos*

La técnica descrita por Jiang *et al.*, (1992) se usó para determinar los hidroperóxidos. Se basa en la reacción del Fe²⁺ que se oxida a Fe³⁺ en condiciones ácidas. La reacción se caracteriza por la donación de un ión negativo mediado por la acción del reactivo de Fox. Se usa como indicador, el xilenol orange, sensible a la oxidación del Fe. En el caso de los hidroperóxidos, el Fe actúa como un metal de transición. La intensidad del color naranja del xilenol incrementa con la presencia de hidroperóxidos. El AMN (ammonium ferrous sulphate) es la fuente de Fe para la peroxidación lipídica, mientras que el AAPH (2-2 azobis amidinopropane) es un fuerte inductor de la peroxidación.

3.5.2.5. *Grupos carbonilo*

La concentración de grupos carbonilo en plasma, que representa la oxidación proteica, se termina por el reactivo 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), según el método de Reznick & Packer (1994), modificado por Bailey (2001). El contenido en grupos carbonilo fue expresado en nmol/mg protein.

3.5.2.6. *Extracción lipídica y análisis de ácidos grasos*

La cantidad total de lípidos se determinó gravimetricamente después de la extracción, esencialmente por el método descrito por Folch *et al.* (1957). El contenido total del extracto lipídico fue sujeto a transesterificación catalítica usando el método descrito por Christie (2003). Los metil-ésteres de ácidos grasos (FAME) obtenidos fueron separados y cuantificados por cromatografía de gas-líquido usando un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard 5890 equipado con una columna (SPTH-2560, SUPELCO, 100

m×0.25 mm I.D., 0.20 µm thickness). Los picos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención con un estándar apropiado de FAMES (purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). La concentración individual de ácidos grasos se expresó como porcentajes del total de ácidos grasos. Varios parámetros de interés, como la suma de los ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), y poliinsaturados (PUFA), ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, ácidos grasos de más de 20 átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces) y el índice de peroxidación lipídica (PI, como índice de susceptibilidad) se calcularon.

3.5.2.7. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± SD. La normalidad de las variables se calculó con el test de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de las varianzas por el test de Levene. Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon mediante una ANOVA de una sola vía, seguida por el test de Bonferroni o el de Games Howell, dependiendo de la homogeneidad de las variables. La composición de ácidos grasos de cada grupo se representa como la media ± SD. Las comparaciones entre los valores de los grupos se hicieron mediante una ANOVA de una sola vía, y el test de Tukey-b para comparaciones múltiples. El nivel de significancia fue del 95% en todos los casos ($P < 0.05$). Todos los datos se analizaron con la aplicación SPSS for Windows® (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

3.5.3. Resultados

Durante los 12 meses que duró el tratamiento, la ingesta de alimento fue similar en todos los grupos, y no hubo diferencias significativas entre los pesos de los animales como consecuencia del consumo de té (Data not shown).

El análisis de HAA (**Figure 1**) y grupos carbonilo (**Figure 2**) no mostró ninguna diferencia significativa entre grupos. Sin embargo, se pudo observar una tendencia a disminuirse la capacidad antioxidante del grupo C+ADR y a recuperar los niveles en los grupos tratados con té y los grupos carbonilos indicaron un ligero incremento en la oxidación de los aminoácidos en el grupo control + ADR pero no en los grupos D1+ADR y D2+ADR.

El análisis de los hidroperóxidos (**Figure 3**) mostró un incremento significativo en el grupo control + ADR. El grupo dosis 1 + ADR no mostró diferencias con los grupos control + ADR y dosis 2 + ADR. El grupo dosis 2+ADR mostró una restauración de los niveles basales.

El análisis de ácidos grasos de los microsomas de hígado y corazón (**Table 1** y **Table 2**, respectivamente) no mostró diferencias entre los grupos. Sin embargo, el PXI mostró una tendencia a incrementarse en el grupo C+ADR y a disminuir en el grupo en los grupos D1+ADR y D2+ADR comparándose con el grupo control.

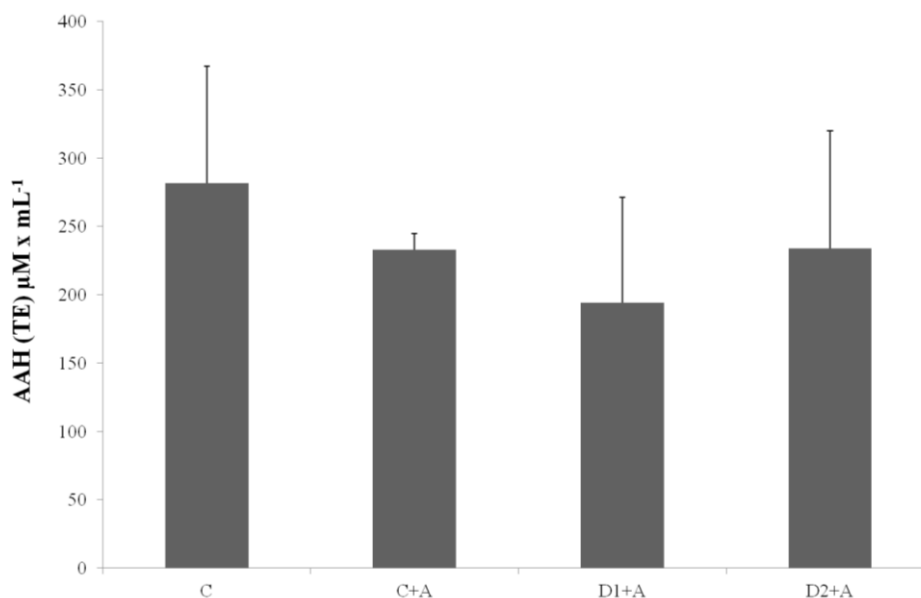


Figure 1. Hydrophilic antioxidant activity (HAA) expressed in equivalents of ascorbic acid (M) per mg of protein. Values are the mean \pm SD of 5 animals per group. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments ($p < 0.05$).

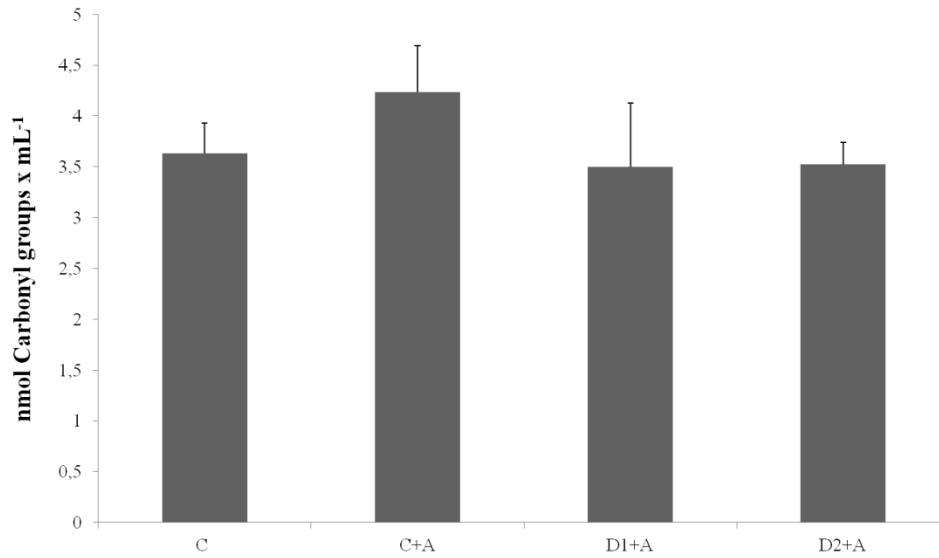


Figure 2. Concentration of carbonyl groups expressed in nanomols per mg of protein. Values are the mean \pm SD of 5 animals per group. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments ($p < 0.05$).

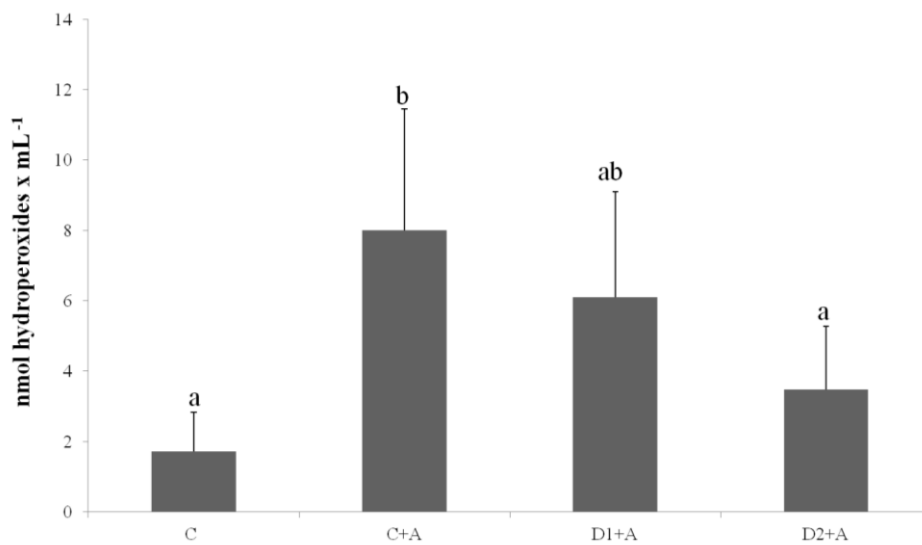


Figure 3. Concentration of hydroperoxides expressed in nanomols per mg of protein. Values are the mean \pm SD of 5 animals per group. Values with different letters indicate statistically significant differences among treatments ($p < 0.05$).

Table 1. Fatty acid composition (% of total fatty acid) of lipids in rat liver. Some minor fatty acids (<0.1 g/100 g of fatty acids) are not shown. Data are expressed as mean \pm standard deviation. UI: Unsaturation Index. PXI: Lipids Peroxidation Index.

	Control (n=4)	Control + ADR (n=6)	Dose 1 + ADR (n=5)	Dose 2 + ADR (n=5)
SFA	39,9 \pm 0,3	37,7 \pm 8,9	41,5 \pm 1,4	41,7 \pm 1,3
MUFA	7,7 \pm 0,2	9,1 \pm 3,8	9,7 \pm 0,8	8,3 \pm 1,3
n-6 PUFA	42,6 \pm 0,3	42,7 \pm 7,4	39,2 \pm 2,5	40,5 \pm 1,9
n-3 PUFA	9,6 \pm 0,7	10,4 \pm 1,8	9,4 \pm 1,4	9,4 \pm 0,9
Total PUFA	52,3 \pm 0,3	53,2 \pm 6,4	48,7 \pm 1,4	49,9 \pm 1,1
n-3/n-6	0,22 \pm 0,01	0,25 \pm 0,06	0,24 \pm 0,05	0,23 \pm 0,003
UI	202,6 \pm 3,8	206,5 \pm 12,9	190,3 \pm 7,4	194,2 \pm 4,6
PXI	195,8 \pm 6,1	198,8 \pm 10,3	181,6 \pm 13,2	187,1 \pm 8,4

Table 2. Fatty acid composition (% of total fatty acid) of lipids in rat heart. Some minor fatty acids (<0.1 g/100 g of fatty acids) are not shown. Data are expressed as mean \pm standard deviation. UI: Unsaturation Index. PXI: Lipids Peroxidation Index.

	Control (n=4)	Control + ADR (n=6)	Dose 1 + ADR (n=5)	Dose 2 + ADR (n=5)
SFA	35,0 \pm 13,1	48,9 \pm 5,7	43,5 \pm 6,9	41,7 \pm 11,3
MUFA	29,7 \pm 18,9	12,6 \pm 1,9	20,0 \pm 3,8	28,1 \pm 10,3
n6 PUFA	23,7 \pm 10,3	30,5 \pm 5,6	25,1 \pm 7,2	17,3 \pm 6,4
n3 PUFA	11,4 \pm 8,6	7,8 \pm 0,9	11,3 \pm 3,5	12,8 \pm 7,6
Total PUFA	35,1 \pm 10,9	38,3 \pm 6,1	36,4 \pm 8,2	30,1 \pm 1,2
n-3/n-6	0,6 \pm 0,77	0,26 \pm 0,06	0,47 \pm 0,19	0,97 \pm 0,81
UI	160,2 \pm 45,7	149,9 \pm 20,9	149,7 \pm 26,8	146,1 \pm 27,1
PXI	134,0 \pm 62,7	135,5 \pm 22,1	128,8 \pm 27,6	126,1 \pm 30,6

3.5.4. Discusión

En un estudio previo, analizamos diferentes órganos (hígado, cerebro y corazón) observando una respuesta al tratamiento a largo plazo de té blanco, el cual previno a los órganos del daño oxidativo causado por la ADR (Espinosa *et al.*, 2012).

En el plasma los resultados no fueron tan claros como los anteriormente publicados. El efecto prooxidante que la toxina causó en el grupo control+ADR, mostró una tendencia a disminuir la capacidad antioxidante hidrofílica (**Figure 1**). Weiss *et al.* (1992), consideraron a la adriamicina como un agente que ejerce su efecto tras ser metabolizada, produciendo el daño oxidativo cerca del sitio donde se forman los radicales libres (mitochondria, microsomes, etc.), pero no llegando al plasma; es decir, que causa su mayor daño en el medio intracelular antes que en el extracelular. Por supuesto, esto podría explicar el efecto atenuado observado en el plasma.

El efecto de la adriamicina en los lípidos y las proteínas del plasma se hizo más evidente que el efecto observado en la HAA. Hubo un incremento significativo en la concentración de hidroperóxidos y una tendencia a incrementarse la concentración de grupos carbonilos en el plasma tras la administración de la droga. La ADR causó oxidación en el plasma, un efecto que se hizo más evidente en el análisis de hidroperóxidos, quizás por que el el FOX es el método más sensible, conveniente y simple para determinar oxidación lipídica en plasma (Jiang *et al.*, 1992).

Se ha publicado que el té tiene propiedades antitumorales y antimutagénicas mediante el bloqueo de la unión de las sustancias que promueven tumores a sus sitios de receptores (Santana-Rios *et al.*, 2001), como hormonas, y factores de crecimiento (Komori *et al.*, 1993; Stammler & Volm 1997) y se le atribuyen efectos paliativos en la neurodegeneración causada por isquemia (Koutelidakis *et al.*, 2009). La mayoría de estos estudios se realizaron con té verde, pero hay pocos estudios realizados con té blanco. Algunos trabajos han mostrado el efecto protector de ambos tipos de té en ratón, donde la capacidad antioxidante total incremento en diferentes órganos y tejidos como el corazón, estómago (Koutelidakis *et al.*, 2009) y el colon (Koutelidakis *et al.*, 2010).

En las muestras de plasma, el efecto protector del té se analizó por la técnica que mide HAA descrita por Arnao *et al.* (1999). Ninguno de los análisis mostró un

incremento en la capacidad antioxidante del plasma en ratas tratadas con té comparadas con el las ratas control (**Figure 1**). Resultados similares similares se describieron en ratones tratados con té blanco, los cuales no aumentaron significativamente su actividad antioxidante en plasma (Koutelidakis *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que, tras la administración de antioxidantes como el selenio con el fin de contrarrestar los efectos oxidativos de la ADR, se observaron cambios significativos en el hígado, pero no en el plasma (Bordoni *et al.*, 2008). La disminución en el daño oxidativo en el plasma debido a la administración de té blanco no se vió reflejada en la concentración de grupos carbonilo, los cuales solo muestran un ligero incremento en el grupo control + ADR (**Figure 2**). Sin embargo, esta tendencia se hace estadísticamente significativa en el análisis de hidroperóxidos, los cuales vuelven a su estado basal con la dosis más baja de té blanco (**Figure 3**). Estos datos son consistentes con otros estudios realizados con té verde en plasma de ratas, los cuales vieron una recuperación de los peróxidos causados por daño oxidativo debido a etanol (Ostrowska *et al.*, 2004) y un incremento de la actividad antioxidante y descenso de la peroxidación lipídica (Serafini *et al.*, 2000), y con nuestras propias investigaciones que describen el efecto protector del té blanco a largo plazo (Espinosa *et al.*, 2012; 2014).

Muy pocos estudios han investigado el posible efecto prooxidante de la ADR y el té en el perfil de ácidos grasos (FA) en microsomas de hígado, y hasta nuestro conocimiento, ninguno ha estudiado sus efectos en microsomas de corazón.

Este estudio no mostró cambios significativos en el perfil de ácidos grasos de microsomas de hígado tras la administración de ADR (**Table 1**). Solamente una tendencia se observó mostrando una menor proporción del SFA total. Los resultados podrían estar de acuerdo con lo descrito por Català *et al.* (2007), quien encontró una disminución, aunque significativa en su caso, en la cantidad de SFA y los ácidos araquidónico y docosahexaenoico en la mitocondria de hepatocitos tras el tratamiento de la ADR. Los efectos en la mitocondria podrían ser explicados por que allí es donde la droga realiza su mayor acción prooxidante (Hoye *et al.*, 2008).

Nuestros resultados también fallaron al mostrar cambios en la proporción de SFA total y en el ratio n-3 / n-6, y solo una ligera tendencia a elevarse el total de MUFAs se observó. Resultados similares tras el tratamiento con la misma droga fueron descritos por otros autores (Biagi *et al.*, 1993). Por supuesto, en hepatocitos de rata tratados con

ADR y/o selenio, este último como antioxidante, Bordoni et al. (2008) no observó cambios en la concentración de los ratios de SFA, MUFAs y PUFAs. Solo hubo una ligera tendencia a elevarse la concentración de ácido araquidónico porque la ADR no tubo efecto y el selenio incrementó la actividad de la δ -6-desaturase (Bordoni *et al.*, 2008).

Nuestro estudio no identificó ningún cambio significativo en el perfil de ácidos grasos de microsomas de corazón tras la administración de ADR (**Table 2**) y sólo mostró alguna tendencia en SFA, MUFAs y PUFAs. Además, hubo una tendencia del UI a disminuir, y del PXI a aumentar en el grupo control + ADR, lo que podría explicarse por el estrés oxidativo en los dobles enlaces de los ácidos grasos, los cuales son susceptibles de ser dañados por la ADR. Como el corazón es uno de los órganos más dañados por la ADR (Signal & Iliskovic, 1998), los efectos observados del té blanco podrían ser hallazgos importantes para nuestra investigación.

En conclusión, el efecto protector del té blanco a largo plazo se hizo solo evidente en el análisis de hidroperóxidos en plasma, probablemente por que el método utilizado fue el apropiado para uso en plasma. Sin embargo, es evidente que la ADR causó daño oxidativo en plasma y el tratamiento con el té blanco protegió contra este daño. El perfil de ácidos grasos no mostró diferencias significativas, aunque las ligeras tendencias observadas podrían haber sido causadas por el tratamiento con ADR y el efecto protector del té blanco contra el estrés oxidativo.

Acknowledgments

This work was supported by the “Ministerio de Ciencia y Tecnología” of Spain under project AGL2005-08088-C02-01 and Beca FPU (AP2006-02642). The authors thank M^a Pilar Almajano for the extract of white tea and Elvira Larqué Daza, Daniel Gonzalez Silvera and Rebeca Martinez-Tomás for technical support.

3.5.5. References

- Almajano, M. A., Carbó, R., López-Jiménez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108:55–63.
- Almajano, M. P., Vila, I., & Gines, S. (2011). Neuroprotective effects of white tea against oxidative stress-induced toxicity in striatal cells. *Neurotoxicity Research*, 20, 372–378.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. *Free Radical Research*, 31, 389–396.
- Bailey, P. J. (2001). The cleavage of a cluster carbonyl next term C---O bond by trifluoromethanesulphonic anhydride. *Journal of Organometallic Chemistry*, 420, 21–23.
- Biagi, P., Bordoni, A., Hrelia, S., Celadon, M., Turchetto, E. (1993). The effect of dietary polyenylphosphatidylcholine on microsomal delta-6-desaturase activity, fatty acid composition, and microviscosity in rat liver under oxidative stress. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 4(12), 690–694.
- Bordoni, A., Danesi, F., Malaguti, M., Di Nunzio, M., Pasqui, F., Maranesi, M., & Biagi, P. L. (2008). Dietary Selenium for the counteraction of oxidative damage: fortified foods or supplements? *British Journal of Nutrition*, 99, 191–197.
- Catalá, A., Zvara, A., Puskás, L. G., Kitajka, K. (2007). Melatonin-induced gene expression changes and its preventive effects on adriamycin-induced lipid peroxidation in rat liver. *Journal of Pineal Research*, 42(1), 43–49.
- Christie, W.W. (2003). Lipid analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. *Oily Press/PJ Barnes & Associates, Bridgwater, Somerset, U.K.*

- Cutts, S. M., Parsons, P. G., Sturm, R., Phillips, D. R. (1996). Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5422–5429.
- Duthie, S. J. (2007). Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 665–674.
- Espinosa, C., López-Jiménez, J.Á., Cabrera, L., Larqué, E., Almajano, M. P., Arnao, M. B., Zamora, S., & Pérez-Llamas, F. (2012). Protective effect of white tea extract against acute oxidative injury caused by adriamycin in different tissues. *Food Chemistry*, 134:1780–1785.
- Espinosa, C., Pérez-Llamas, F., Guardiola, F. A., Esteban, M. A., Arnao, M. B., Zamora, S., & López-Jiménez, J. Á. (2014). Molecular mechanisms by which white tea intake prevents oxidative-induced stress in vivo. *Journal of Physiology and Biochemistry*. doi:10.1007/s13105-014-0357-9.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Galleano, M., Oteiza, P. I., Fraga, C. G. (2009). Cocoa, chocolate, and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54, 483–490.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. *Clarendon Press Oxford*, UK. 2007:704.
- Hoye, A.T., Davoren, J.E., Wipf, P., Fink. M.P., Kagan, V.E. (2008). Targeting mitochondria. *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 87–97.
- Jiang, Z-Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous Iron oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202, 384–389.

- Komori, A., Yatsunami, J., Okabe, S., Abe, S., Hara, K., Suganuma, M., Kim, S. J., & Fujiki, H. (1993). Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 23(3), 186–190.
- Koutelidakis, A. E., Serafini, M., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2010). Oxidative activity of some iron compounds on colon tissue homogenates from mice after administration of green tea, white tea and *Pelargonium purpureum*. *Food Chemistry*, 120(3), 895-901.
- Koutelidakis, A. E., Argiri, K., Serafini, M., Proestos, C., Komaitis, M., Pecorari, M., & Kapsokefalou, M. (2009). Green tea, white tea, and *Pelargonium purpureum* increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition* 25:453–458.
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), 77–84.
- North, J. A., Spector, A. A., Buettner, G. R. (1994). Cell fatty acid composition affects free radical formation during lipid peroxidation. *American Journal of Physiology*, 267(1), 77–88.
- Ostrowska, J., Łuczaja, W., Kasacka, I., Różanskic, A., & Skrzydlewska, E. (2004). Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol*, 32, 25–32.
- Philipp, B. W., Shapiro, D. J. (1979). Improved methods for the assay and activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Journal of Lipid Research*, 20(5), 588–593.
- Santana-Rios, G., Orner, G. A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S. Y., & Dashwood, R. H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, 495:61–74.
- Schimmel, K. J. M., Richel, D.J., van den Brink, R. B. A., Guchelaar, H. J. (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 181–191.

- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., Ekstrom, A. M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123(4), 985–991.
- Serafini, M., Laranjinha, J., Almeida, L., Maiani, G. (2000). Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(11-12), 585–590.
- Sevanian, A., Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annual Review of Nutrition*, 5, 365–390.
- Singal, P. K., Iliskovic, N. (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine: Research & Reviews*, 339(13), 900–905.
- Stammler, G., & Volm, M. (1997). Green tea catechins (EGCG and EGC) have modulating effects on the activity of doxorubicin in drug-resistant cell lines. *Anti-Cancer Drugs*. 8(3) 265–268.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3, 768–780.
- Sutherland, B., Rahman, R. M., Appleton, I. (2006). Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(5), 291–306.
- Suzuki, E., Yorifuji, T., Takao, S., Komatsu, H., Sugiyama, M., Ohta, T., & Al., E. (2009). Green tea consumption and mortality among japanese elderly people: The prospective Shizuoka elderly cohort. *Annals of Epidemiology*, 19, 732–739.
- Svingen, B. A., Buege, J. A., O’Neal, F. O., Aust, S. D. (1979). The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 254(13), 5892–5899.
- Reznick, A. Z., & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzimology*, 233, 257–263.

Weiss, R.B. (1992). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?
Seminars in Oncology, 19(6), 670–686.

4. Discusión

4. Discussion

El estrés oxidativo es posiblemente una de las causas más importantes de una serie de enfermedades degenerativas y, dado que el organismo obtiene parte de su defensa antioxidante a partir de algunos componentes de la dieta, existe una relación directa entre la alimentación y el estado oxidativo, y por ende, entre nutrición y salud.

Sin duda, uno de los logros importantes de este trabajo ha sido la aplicación del tratamiento a largo plazo, con un periodo de ingesta de té blanco de 12 meses. Es importante resaltar que estos 12 meses son equivalentes a la totalidad de la etapa adulta de la vida en ratas. Esto nos ha permitido obtener resultados más fiables, con cierta seguridad de que los polifenoles del té han llegado a todo el organismo, y también respecto a lo novedoso/innovador del presente estudio, ya que la mayoría de las investigaciones suelen realizarse durante cortos periodos de tiempo y administrando dosis de antioxidantes relativamente altas. Sin embargo, el suministro de té que aportamos en la dieta está equiparado a dosis de consumo habitual tanto en población occidental (Wang *et al.*, 2011) como oriental (Suzuki *et al.*, 2009). Por todo ello, los resultados obtenidos son, en general, más apropiados para ser extrapolados a humanos.

Los primeros pasos de la presente investigación, en relación con el consumo de té blanco a diferentes dosis, dieron como resultado la publicación de un primer artículo, cuyo objetivo fue analizar el efecto que tenía la administración de té blanco sobre la ingesta de alimento, absorción de minerales, digestibilidad proteica y crecimiento en ratas (Pérez-Lamas *et al.*, 2011). Se llegó a la conclusión de que el té no alteraba ninguno de los factores mencionados anteriormente, excepto que reducía en un 15-18% la absorción de Fe. Estos datos preliminares sentaron las bases para el diseño de un segundo estudio a largo plazo.

Partiendo de esta base, se estableció una dinámica de trabajo que permitió el ensayo con tres grupos experimentales, que difieren en el tratamiento administrado en el agua de bebida. El primero, un grupo de animales control, al que se les administró agua destilada como bebida; el segundo, un grupo que tomó en el agua de bebida una dosis de té blanco de 15 mg extracto seco de té/kg peso corporal; y en tercer lugar, un grupo al que se le administró en el agua de bebida una dosis de té blanco de 45 mg extracto seco de té /kg peso corporal. Al término de este tratamiento, de 12 meses de duración, a

una parte de los animales se les administró mediante inyección intraperitoneal una dosis de adriamicina (ADR) de 10 mg/kg peso corporal y, tras 48 horas, se procedió a la anestesia con pentotal sódico (53 mg/kg de peso corporal) y extracción de las muestras de sangre, hígado, corazón, cerebro y riñón.

Los primeros resultados permitieron establecer una correlación significativa entre los niveles de capacidad antioxidante y las concentraciones de grupos carbonilo e hidroperóxidos, a mayor capacidad antioxidante total, se produce una menor generación de grupos carbonilo e hidroperóxidos, y viceversa, en los diferentes tejidos estudiados. Las relaciones estadísticamente significativas entre los resultados de los distintos métodos utilizados en este estudio muestran la efectividad de los mismos para valorar tanto el efecto pro-oxidante de la ADR como el efecto protector del té blanco frente a un daño oxidativo agudo.

Los resultados sobre las medidas de capacidad antioxidante muestran diferencias entre los órganos ensayados (corazón, hígado y cerebro). Por tanto, cada órgano tiene un nivel de capacidad antioxidante determinado, por lo que en función de los niveles basales de defensa, así se encontrará cada órgano protegido frente al estrés oxidativo agudo. Estos resultados están en concordancia con lo descrito previamente por Koutelidakis *et al.*, (2009), que indican que los niveles de antioxidantes basales en corazón son significativamente inferiores a los encontrados en pulmón, bazo, hígado, riñón y cerebro. Esta mayor susceptibilidad del tejido miocárdico al daño oxidativo agudo podría ser explicada, al menos en parte, por la menor concentración de enzimas protectores contra los radicales libres, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) en este tejido (Doroshov *et al.*, 1980; Olson *et al.*, 1981).

En un segundo trabajo, la ADR mostró tener un significativo efecto tóxico sobre los microsomas de hígado, corazón y cerebro, produciéndose una disminución de la capacidad antioxidante total, y un aumento de las concentraciones de grupos carbonilo e hidroperóxidos. Esta reducción de la capacidad antioxidante total en los microsomas representa un mayor consumo de moléculas antioxidantes y un incremento de la oxidación en los tejidos.

Estudios previos han descrito el efecto antioxidante dosis-dependiente de las catequinas del té verde en hígado de rata expuestas a daño oxidativo provocado por radiaciones de microondas, como los realizados *in vivo* por Kim *et al.* (2002). Nuestros primeros datos mostraron que los valores de la capacidad antioxidante de los tres órganos parecen aumentar de manera dosis-dependiente hasta valores similares a los obtenidos en los animales control. Tras la administración de la menor dosis de té blanco durante un año (dosis 1, equivalente a tres tazas de té al día en humanos), la recuperación de los niveles de capacidad antioxidante total es comparable a la de los animales control, es más, si observamos el efecto de la administración de té a la dosis mayor (dosis 2, equivalente a nueve tazas de té al día en humanos), existe incluso una tendencia a sobreelevar los niveles de capacidad antioxidante basal. Un mismo comportamiento es observado en los datos que muestran la oxidación de los tejidos (hidroperóxidos y grupos carbonilo), aumentando su concentración con la administración de ADR y disminuyendo de una manera dosis-dependiente con las dosis de té blanco.

Estudios clínicos han mostrado que los tratamientos con agentes antioxidantes no parecen suficientes para revertir en su totalidad los efectos cardiotoxicos de la ADR (Schimmel *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros datos en corazón indican que la administración del extracto de té blanco redujo de forma significativa la concentración de grupos carbonilo hasta valores incluso por debajo de los valores basales. Los resultados indican que los polifenoles del té pueden presentar otros mecanismos protectores además de los antioxidantes. Otros autores han documentado que algunos flavonoides son capaces de reducir la cardiotoxicidad producida por la ADR, no exclusivamente por su capacidad antioxidante (Mladenka *et al.*, 2010). De hecho, se ha descrito que existen mecanismos bioquímicos que explican su capacidad protectora, además de su capacidad intrínseca de neutralizar especies reactivas de oxígeno y quelar metales. Estos mecanismos están relacionados con las interacciones polifenol-lípido y polifenol-proteína (Fraga, 2007).

Continuamos así, analizando la actividad enzimática en órganos relevantes como hígado y riñón. La magnitud del efecto antioxidante del té, en ambos órganos, es tan importante que la actividad de las enzimas SOD, GR y CAT no llega a elevarse, incluso en las dosis más altas se observa una disminución de su proporción respecto al control,

cuando lo esperado hubiese sido la elevación de las mismas, ya que se observa un incremento de la capacidad antioxidante hidrofílica y una disminución de parámetros oxidativos. El efecto antioxidante del té blanco es capaz de neutralizar el daño, y el organismo puede, de alguna manera, reconocer que la actividad de estas enzimas no es necesaria y disminuir su actividad.

Es importante recordar que los animales estuvieron ingiriendo té blanco la mayor parte de su vida (12 meses), lo que permitió un alto grado de penetración en todos los tejidos de los principios antioxidantes, ya que la protección observada se da a nivel microsomal y en todos los órganos analizados. Se manifestó el efecto protector del té blanco en el plasma, viéndose los valores de hidroperóxidos re-establecidos con la dosis más alta de té. Recordamos que los efectos beneficiosos del té blanco se observaban incluso en el cerebro, así que los polifenoles atravesaron la barrera hemato-encefálica, por lo que casi con toda seguridad, se pueda observar su efecto en todos los tejidos del cuerpo.

Sin embargo, la actividad de la GR de riñón muestra un comportamiento totalmente opuesto, lo que concuerda con Yeung et al., (1991), que indica que la GR no reacciona de la misma manera en el hígado que en el riñón, por lo que su regulación debe ser diferente.

Para poder entender el comportamiento observado en los parámetros de estrés oxidativo, así como en las enzimas antioxidantes, nos dispusimos a analizar la expresión de los genes que codifican estas enzimas y también las implicadas en su regulación. Por ello, comenzamos a estudiar los cambios en el factor de transcripción NRF2.

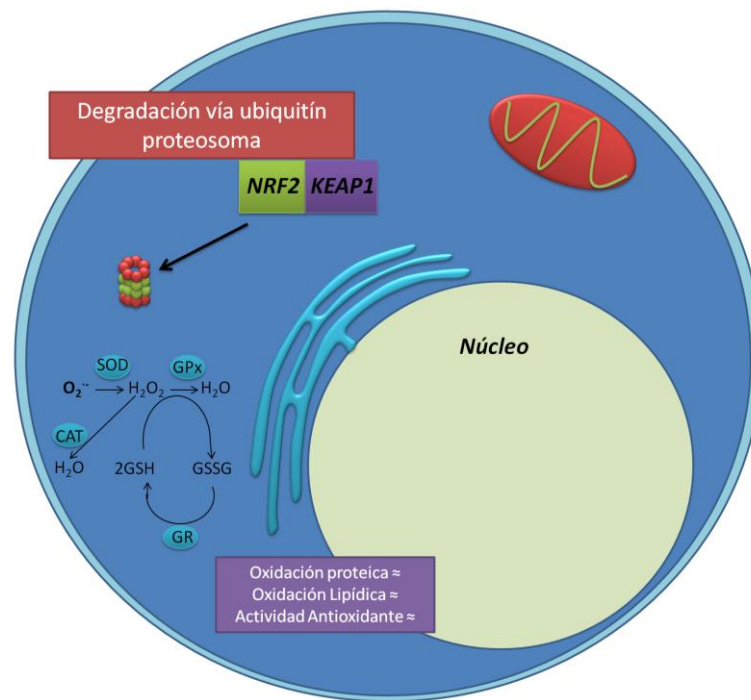


Figura 19. Esquema de la ruta de degradación del NRF2 en situación de *status redox* normal vía ubiquitín proteosoma.

Se le ha atribuido un papel central en la defensa contra el estrés oxidativo al factor de transcripción NRF2, perteneciente a una familia caracterizada por sus regiones básicas de leucinas a modo de cremallera (leucine zipper family). De hecho, NRF2 se localiza en el citoplasma, donde interactúa con la proteína KEAP1 (actin-binding protein Kelch-like) y que es objetivo de manera inmediata de especies reactivas de oxígeno o electrófilas, que atacan el complejo NRF2-KEAP1, disociándose éste en NRF2 y KEAP1 (Zhang, 2006). El NRF2 estabilizado se transloca entonces al núcleo, y promueve la expresión de varios genes relacionados con proteínas antioxidantes como SOD, CAT y GR; y enzimas detoxificantes de fase II como NQO1, GST y hemo oxigenasa (HO1) (Kobayashi & Yamamoto, 2005; Xu *et al.*, 2008).

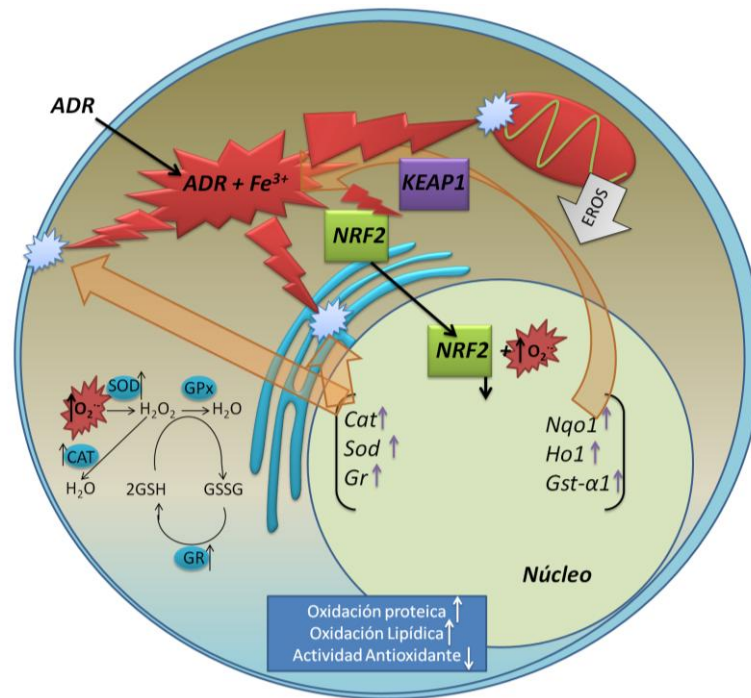


Figura 20. Esquema del funcionamiento del factor de transcripción NRF2 ante un estrés oxidativo agudo.

El presente trabajo mostró que el gen *Nrf2* se expresa de manera diferente en el hígado y en el riñón. Mientras que en ambos órganos la expresión de *Nrf2* aumenta cuando se les administra adriamicina (lo que cabría esperar puesto que la ADR provoca estrés oxidativo), cuando analizamos la expresión del factor en los grupos tratados con las diferentes dosis de té y ADR, se observa una sobre-expresión de *Nrf2* en el hígado, que aumenta con las dosis de té blanco, mientras que en el riñón se produce una inhibición de la expresión del factor conforme aumenta la dosis de té.

Probablemente, estas diferencias sean debidas a la diferente función que desempeñan los dos órganos. El hígado cumple una función más detoxificadora, siendo además éste el que recibe el daño en primer lugar y posiblemente con más intensidad. Por ello, la expresión de *Nrf2* se mantiene alta en este órgano y sube con las dosis de té de una manera dosis-dependiente, logrando elevar las enzimas de fase II con el fin de detoxificar el agente (no así las enzimas antioxidantes, siendo éstas inhibidas) y, como indican los análisis de capacidad antioxidante y grupos carbonilo e hidroperóxidos, protegiendo del daño oxidativo al hígado.

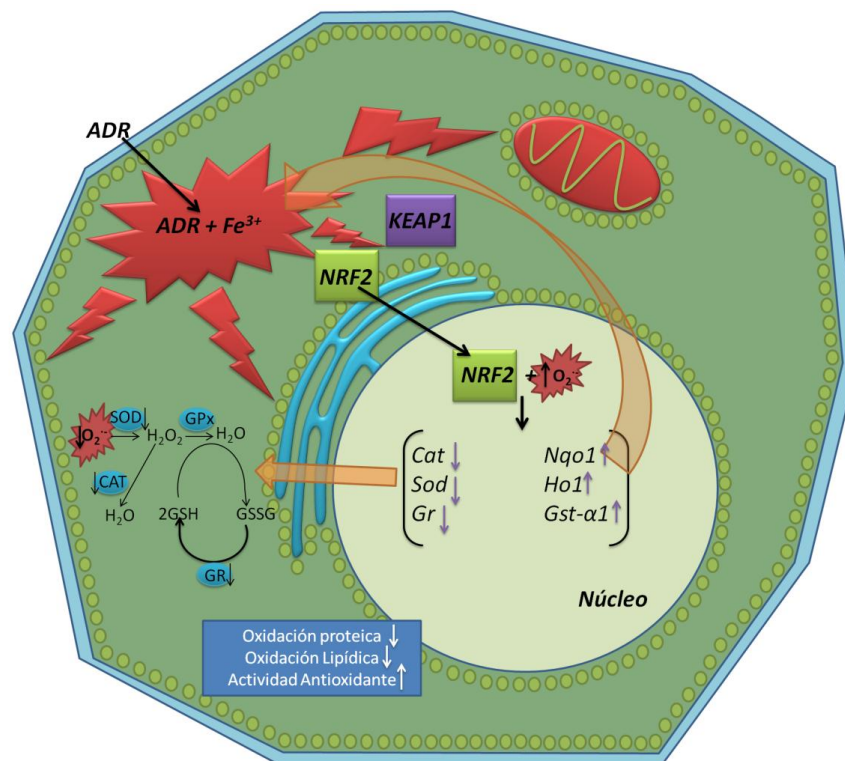


Figura 21. Esquema del funcionamiento del factor de transcripción NRF2 frente un estrés oxidativo agudo, en hígado de rata tratada 12 meses con una alta dosis de té blanco, y que ha absorbido los polifenoles del mismo, permaneciendo éstos en la interfase membrana-citosol.

Por otro lado, en el riñón, la expresión de *Nrf2* se ve reducida con el incremento de consumo de té blanco, disminuyéndose también la expresión de enzimas antioxidantes y de fase II. Sin embargo, la capacidad antioxidante se mantiene elevada y los grupos carbonilo e hidroperóxidos disminuyen, sugiriéndose que los polifenoles del té blanco han actuado de barrera frente a este daño oxidativo, no siendo necesaria la activación de la maquinaria genética para afrontar este evento oxidativo. Éste es un mecanismo plausible debido no sólo a la cantidad y calidad de los polifenoles suministrados, sino también al hecho de que los animales recibieron en el agua de bebida este aporte de té durante 12 meses, tiempo suficiente para que la “defensa” se hiciera patente en todo el cuerpo del animal. Además, es un hecho relevante que los polifenoles se sitúen entre las membranas y el citosol (Verstraeten *et al.*, 2003), provocando una barrera protectora importante y evitando los efectos tóxicos de la ADR. Esto podría explicar, al menos en parte, la inhibición de las enzimas antioxidantes producida por la ingesta de té blanco en el riñón y la inhibición de la expresión del gen *Nrf2* y, por lo tanto, de las enzimas antioxidantes y de fase II.

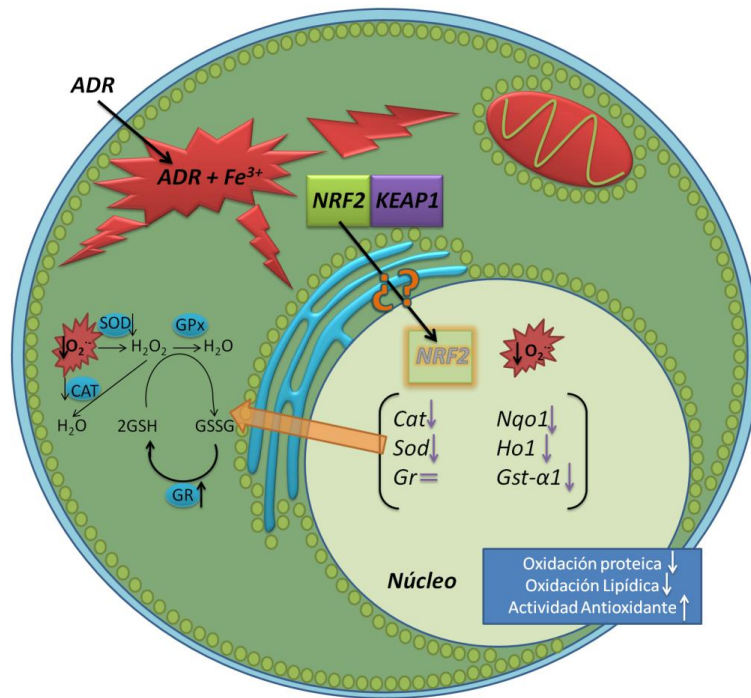


Figura 22. Esquema del funcionamiento del factor de transcripción NRF2 ante un estrés oxidativo agudo, en riñón de rata tratada 12 meses con una alta dosis de té blanco, y que ha absorbido los polifenoles del mismo, permaneciendo éstos en la interfase membrana-citosol.

La elevación de la concentración plasmática de los compuestos antioxidantes del extracto de té blanco inhibe la expresión de los genes responsables de la defensa antioxidante. Otra posible interpretación, dado que los citados compuestos alcanzan todos los tejidos del organismo por el tratamiento a largo plazo, es que la elevación de la concentración en los diferentes tejidos provocaría el efecto similar, aunque ambos procesos se podrían estar dando de forma simultánea. Este proceso es un equilibrio dinámico muy activo, y a veces muy difícil de evidenciar.

En cualquier caso, se requieren estudios adicionales para comprender estas diferencias encontradas entre órganos, y para seguir clarificando los mecanismos implicados en la regulación de la expresión los genes de defensa antioxidante y la modulación de éstos realizada por compuestos antioxidantes administrados en la dieta.

5. Conclusiones

CONCLUSIONES

Primera. La administración durante 12 meses de té blanco a dosis de 4 y 12 mg de polifenoles/kg de peso corporal y día no produjo cambios en crecimiento, ingesta de alimento y utilización digestiva y metabólica de la dieta en los animales de estudio.

Segunda. En condiciones basales, la capacidad antioxidante del corazón es menor que la encontrada en otros órganos analizados (hígado, cerebro y riñón), posiblemente debido a la menor concentración de enzimas antioxidantes que presenta, lo que sugiere que el tejido presenta una mayor susceptibilidad al daño causado por estrés oxidativo.

Tercera. La administración de adriamicina provoca estrés oxidativo agudo en todos los tejidos analizados (hígado, corazón, cerebro, riñón y plasma), produciendo una disminución en la capacidad antioxidante total y un aumento en las concentraciones de grupos carbonilo e hidroperóxidos.

Cuarta. La administración de adriamicina activa el factor de transcripción citoplasmático NRF2, que provoca la elevación en la expresión de los genes que codifican las enzimas de respuesta antioxidante: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa; y de la expresión de genes que codifican las enzimas de fase II: NADPH quinona óxido-reductasa 1, glutatión-S-transferasa 1 y hemo oxigenasa 1.

Quinta. El daño oxidativo producido por la administración de adriamicina eleva la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa en hígado, respuesta antioxidante que no es suficiente para neutralizar el daño provocado.

Sexta. La administración crónica de té blanco a las dosis citadas neutraliza los efectos oxidativos de la adriamicina en hígado, corazón, cerebro y riñón, restaurando de manera dosis-dependiente la capacidad antioxidante total y la concentración de grupos carbonilos e hidroperóxidos. El efecto protector del té en plasma sólo se evidencia en la reducción de la concentración de hidroperóxidos.

Séptima. En hígado, órgano detoxificante por excelencia, el tratamiento con té blanco incrementa la expresión del gen del factor de transcripción NRF2 de manera dosis-dependiente. Este efecto se ve relacionado con la elevación de la expresión de los genes que codifican las enzimas detoxificantes o de fase II, pero no con los que

codifican las enzimas antioxidantes, que incluso tienen su expresión inhibida. Posiblemente sea debido a la protección que ejerce el té frente al estrés oxidativo agudo.

Octava. En el riñón, por el contrario, la ingestión de té blanco por los animales tratados con adriamicina, no sólo no eleva la expresión del factor de transcripción NRF2, sino que la disminuye, debido a que este órgano a diferencia de lo que ocurre en el hígado, sólo llegan los metabolitos prooxidantes de la adriamicina y los antioxidantes del té, siendo la actividad de estos últimos suficientemente eficaz para no requerir la activación de los mecanismos de defensa relacionados con el factor de transcripción NRF2.

CONCLUSIÓN GENERAL

La ingestión a largo plazo de té blanco contrarresta los efectos oxidativos de la adriamicina, incrementando la capacidad antioxidante y disminuyendo los marcadores de oxidación proteica y lipídica en todos los órganos analizados (hígado, corazón, cerebro y riñón). En el plasma, solamente se hace patente en el análisis de la oxidación de los lípidos plasmáticos. El té activa la expresión del gen del factor de transcripción NRF2 en el hígado que, habiendo sido insuficiente para neutralizar los efectos de la adriamicina por sí solo, junto con los polifenoles del té blanco, contrarresta los efectos negativos del agente, promoviendo la síntesis de enzimas de fase II (NQO1, GST- α 1 y HO1), no siendo necesario el incremento de actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GR). En el riñón, el tratamiento con té blanco es suficiente para neutralizar los efectos oxidantes de la adriamicina, no siendo necesario que se incremente la actividad y la síntesis de las enzimas antioxidantes (excepto la GR que si ve incrementada su actividad) y de fase II. El tratamiento con adriamicina y con té blanco a largo plazo no afecta significativamente al perfil de ácidos grasos de hígado y corazón.

6. Bibliografía

6. Bibliografía

A

Abbas, K., Breton, J., Planson, A.-G., Bouton, C., Bignon, J., Seguin, C., Riquier, S., Toledano, M. B. & Drapier, J.-C. (2011). Nitric oxide activates an Nrf2/sulfiredoxin antioxidant pathway in macrophages. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(1), 107–114.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.

Ahmad, N., Feyes, D. K., Nieminen, A. L., Agarwal, R., & Mukhtar, H. (1997). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(24), 1881–1886.

Astley, S. B., & Lindsay, D. G. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants (EUROFEDA). Conclusions. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1-3), 287–291.

B

Barja, G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(2), 235–251.

Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547–581.

Booser, D. J., & Hortobagyi, G. N. (1994). Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs*, 47(2), 223–258.

Brown, K. E., Kinter, M. T., Oberley, T. D., Freeman, M. L., Frierson, H. F., Ridnour, L. A., Tao, Y., Oberley, L.W. & Spitz, D. R. (1998). Enhanced γ -Glutamyl transpeptidase expression and selective loss of Cu-Zn superoxide dismutase in hepatic iron overload. *Free Radical Bio Med*, 24(4), 545–555.

Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2), 535–543.

C

Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605.

Chang, M. C., Bailey, J. W., & Collins, J. L. (1994). Dietary tannins from cowpeas and tea transiently alter apparent calcium absorption but not absorption and utilization of protein in rats. *Journal of Nutrition*, 124:283–288.

Chen, L., Bondoc, F. Y., Lee, M. J., Hussin, A. H., Thomas, P. E., & Yang, C. S. (1996). Caffeine induces cytochrome P4501A2: induction of CYP1A2 by tea in rats. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 24(5), 529–533.

Chen, L., Lee, M. J., Li, H., & Yang, C. S. (1997). Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 25(9), 1045–1050.

Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., & Hayes, J. D. (2013). Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*, 32(32), 3765–3781.

Cook, N., & Samman, S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66–76.

Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., & Lüscher, T. F. (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 119(10), 1433–1441.

Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043.

D

De Boer, V. C. J., Dihal, A., van der Woude, H., Arts, I. C. W., Wolfram, S., Alink, G. M., Rietjens, I. M. C. M. Keijer, J. & Hollman, P. C. H. (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of Nutrition*, 135(7), 1718–1725.

DeGraff, W., Hahn, S. M., Mitchell, J. B., & Krishna, M. C. (1994). Free radical modes of cytotoxicity of adriamycin and streptonigrin. *Biochemical Pharmacology*, 48(7), 1427–1435.

Doroshov, J. H., Locker, G. Y., & Myers, C. E. (1980). Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *The Journal of Clinical Investigation*, 65(1), 128–135.

Duthie, G. G., Duthie, S. J., & Kyle, A. M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutritional Research Reviews*, 13, 340–357.

E

El-aziz, M. A. A., Othman, A. I., & Amer, M. (2001). Potential Protective Role of Angiotensin- converting enzyme inhibitors captopril and enalapril against adriamycin-induced acute cardiac and hepatic toxicity in rats. *Journal of Applied Toxicology* 473, 469–473.

Enwonwu, C. O., & Meeks, V. I. (1995). Bionutrition and oral cancer in humans. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 6(1), 5–17.

- Erba, D., Grass, L., Josephy, D., Goldberg, D. M., & Diamandis, E. P. (2002). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35, 119–124.
- Erba, D., Riso, P., Bordoni, A., Foti, P., Biagi, P. L., & Testolin, G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 144–149.
- Erlejman, A. G., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2006). Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(8), 1247–1256.
- Erlejman, A. G., Jaggers, G., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2008). TNF α -induced NF-kappaB activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 186–195.
- Eyre, D. R., Paz, M. A., & Gallop, P. M. (1984). Cross-linking in collagen and elastin. *Annual Review of Biochemistry*, 53, 717–748.

F

- Fadillioglu, E., Oztas, E., Erdogan, H., Yagmurca, M., Sogut, S., Ucar, M., & Irmak, M. K. (2004). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 24(1), 47–52.
- Fraga, C. G. (2007). Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life*, 59(4-5), 308–315.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515–18517.

G

- Galleano, M., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2009). Cocoa, chocolate, and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 483–490.
- Galleano, M., Verstraeten, S. V, Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 23–30.
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727–741.
- Goodman, J., Hochstein, P., & Angeles, L. (1977). Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 77, 797–803.
- Griendling, K. K., & Ushio-Fukai, M. (2000). Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regulatory Peptides*, 91(1-3), 21–27.
- Griffiths, H. R., Unsworth, J., Blake, D. R., & Lunec, J. (1988). Oxidation of amino acids within serum proteins. *Free Radicals in Chemistry, Pathology and Medicine*, 439–454.
- Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S., & Xin, W. (1996). Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1304(3), 210–222.

H

- Hackett, A. M., Griffiths, L. A., Broillet, A., & Wermeille, M. (1983). The metabolism and excretion of (+)-[14C]cyanidanol-3 in man following oral administration. *Xenobiotica*, 13(5), 279–286.

- Halliwell, B. (1988). Oxygen radicals and tissue injury. In Proceedings of an Upjohn Symposium.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721–724.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50.
- Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73(2), 341–347.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 107–112.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine. *Clarendon Press, Oxford, UK.*, 704.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Comments on review of free radicals in biology and medicine. *Free Radicals Biology & Medicine*, 12(1), 93–95.
- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20(4), 145–147.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), 1141–1148.
- Hawkes, H.-J. K., Karlenius, T. C., & Tonissen, K. F. (2014). Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(1), 303–314.
- Hayes, J. D., McMahon, M., Chowdhry, S., & Dinkova-Kostova, A. T. (2010). Cancer Chemoprevention Mechanisms Mediated Through the Keap1–Nrf2 Pathway. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1713–1748.

- Hernaez, J. F., Xu, M., & Dashwood, R. H. (1998). Antimutagenic activity of tea towards 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline: effect of tea concentration and brew time on electrophile scavenging. *Mutation Research*, 402(1-2), 299–306.
- Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K. K., Iveković, D., & Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115(2), 441–448.
- Hou, Y., Xue, P., Bai, Y., Liu, D., Woods, C. G., Yarborough, K., Fu, J., Zhang, Q., Sun, G., Collins, S., Chan, J. Y., Yamamoto, M., Andersen, M.E. & Pi, J. (2012). Nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor 2 regulates transcription of CCAAT/enhancer-binding protein β during adipogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(2), 462–472.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., & Buttemer, W. A. (2007). Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiological reviews*, 87(11), 1175–1213.

J

- Jacob, R. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutritional Research*, 15, 755–766.
- Jacob, R., & Pianalto, F. (1997). Urinary carnitine excretion increases during experimental vitamin C depletion of healthy men. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(5), 265–269.
- Jeong, W., Bae, S. H., Toledano, M. B., & Rhee, S. G. (2012). Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(3), 447–456.
- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 4846–4851.

Jung, K., & Reszka, R. (2001). Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49(1-2), 87–105.

K

Kamihira, M., Nakazawa, H., Kira, A., Mizutani, Y., Nakamura, M., & Nakayama, T. (2008). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated by a quartz-crystal microbalance analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), 1372–1375.

Karaman, A., Fadillioglu, E., Turkmen, E., Tas, E., & Yilmaz, Z. (2006). Protective effects of leflunomide against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Pediatric Surgery International*, 22(5), 428–434.

Khan, S. G., Katiyar, S. K., Agarwal, R., & Mukhtar, H. (1992). Advances in Brief Enhancement of Antioxidant and Phase II Enzymes by Oral Feeding of Green Tea Polyphenols in Drinking Water to SKH-1 Hairless Mice: Possible Role in Cancer. *Cancer research*, 52(14), 4050–4052.

Kim, M.-J., Choi, J.-H., Yang, J.-A., Kim, S.-Y., Kim, J.-H., Lee, J.-H., Kim, J.-K., & Rhee, S.-J. (2002). Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutritional Research*, 22, 733–744.

Kishimoto, Y., Saito, N., Kurita, K., Shimokado, K., Maruyama, N., & Ishigami, A. (2013). Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(2), 579–84.

Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, 385–394.

Kong, A. N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R., & Mandlekar, S. (2001). Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the

antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metabolism Reviews*, 33:255–271.

Koo, M. W., & Cho, C. H. (2004). Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology*, 500, 177–185.

Kostyuk, V., Potapovich, I., Strigunova, E. N., Kostyuk, T. V, & Afanas'ev, I. B. (2004). Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428(2), 204–208.

Koutelidakis, A. E, Argiri, K., Serafini, M., Proestos, C., Komaitis, M., Pecorari, M., & Kapsokefalou, M. (2009). Green tea, white tea, and Pelargonium purpureum increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition* 25:453–458.

Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2002). Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer Chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 2883–2892.

L

Lee, J.-M., Calkins, M. J., Chan, K., Kan, Y. W., & Johnson, J. A. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12029–12038.

Li, A. S., Bandy, B., Tsang, S. S., & Davison, A. J. (2000). DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds in vitro. *Free Radical Research*, 33(5), 551–566.

Lipshultz, S. E., Cohen, H., Colan, S. D., & Herman, E. H. (2006). The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. *Leukemia & Lymphoma*, 47(8), 1454–1458.

Lou, Y. R., Lu, Y. P., Xie, J. G., Huang, M. T., & Conney, A. H. (1999). Effects of oral administration of tea, decaffeinated tea, and caffeine on the formation and growth of tumors in high-risk SKH-1 mice previously treated with ultraviolet B light. *Nutrition and Cancer*, 33(2), 146–153.

Lu, H., Cui, W., & Klaassen, C. D. (2011). Nrf2 protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced oxidative injury and steatohepatitis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(2), 122–135.

Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology & Medicine*, 66, 75–87.

M

Madhusudana, S. N., Shamsundar, R., & Seetharaman, S. (2004). In vitro inactivation of the rabies virus by ascorbic acid. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 21–25.

Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 113, 490–495.

May, J. M., Qu, Z.-C., Nazarewicz, R., & Dikalov, S. (2013). Ascorbic acid efficiently enhances neuronal synthesis of norepinephrine from dopamine. *Brain Research Bulletin*, 90, 35–42.

McConnachie, L. A., Mohar, I., Hudson, F. N., Ware, C. B., Ladiges, W. C., Fernandez, C., Chatterton-Kirchmeier, S., White, C. C., Pierce, R. H., & Kavanagh, T. J. (2007). Glutamate cysteine ligase modifier subunit deficiency and gender as determinants of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicological Sciences*, 99(2), 628–636.

McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 108(8), 652–659.

Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., & Motohashi, H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*, 22(1), 66–79.

- Miura, Y. H., Tomita, I., Watanabe, T., Hirayama, T., & Fukui, S. (1998). Active oxygens generation by flavonoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21(2), 93–96.
- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(6), 963–975.
- Morel, I., Abaléa, V., Sergent, O., Cillard, P., & Cillard, J. (1998). Involvement of phenoxyl radical intermediates in lipid antioxidant action of myricetin in iron-treated rat hepatocyte culture. *Biochemical Pharmacology*, 55(9), 1399–1404.
- Murphy, G. P., Lawrence, W. J., & Lenhard, R. E. (1995). *Textbook of Clinical Oncology (Society, A)*. Atlanta GA.

N

- Nakayama, T., Enoki, Y., & Hashimoto, K. (1995). Hydrogen peroxide formation during catechin oxidation is inhibited by superoxide dismutase. *Food Science and Technology International*, 1, 65–69.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279.

O

- Olson, R. D., Boerth, R. C., Gerber, J. G., & Nies, A. S. (1981). Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sciences*, 29(14), 1393–1401.
- Olson, R. D., & Mushlin, P. S. (1990). Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB Journal*, 4(13), 3076–3086.

Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? *Clinical and Developmental Immunology*, 12(1), 19–25.

Oz, E., & Ilhan, M. N. (2006). Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 286(1-2), 11–15.

P

Paek, J., Lo, J. Y., Narasimhan, S. D., Nguyen, T. N., Glover-Cutter, K., Robida-Stubbs, S., Suzuki, T., Yamamoto, M., Blackwell, T. K., & Curran, S. P. (2012). Mitochondrial SKN-1/Nrf mediates a conserved starvation response. *Cell Metabolism*, 16(4), 526–537.

Paganga, G., & Rice-evans, C. A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, 401, 78–82.

Paschka, a G., Butler, R., & Young, C. Y. (1998). Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Letters*, 130(1-2), 1–7.

Pérez-Llamas, F., González, D., Cabrera, L., Espinosa, C., López, J. A., Larqué, E., Almajano, M. P., & Zamora, S. (2011). White tea consumption slightly reduces iron absorption but not growth, food efficiency, protein utilization, or calcium, phosphorus, magnesium, and zinc absorption in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67(3), 331–337.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., Tata, V. De, & Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499–1503.

R

Rada, P., Rojo, A. I., Evrard-Todeschi, N., Innamorato, N. G., Cotte, A., Jaworski, T., Tobón-Velasco, J. C., Devijver, H., García-Mayoral, M. F., Van Leuven, F.,

Hayes, J. D., Bertho, G., & Cuadrado, A. (2012). Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP axis. *Molecular and Cellular Biology*, 32(17), 3486–3499.

Reiter, E., Jiang, Q., & Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5-6), 668–691.

S

Sanz, A., Pamplona, R., & Barjas, G. (2006). Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 6–11.

Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276–282.

Schimmel, K. J. M., Richel, D. J., van den Brink, R. B. A., & Guchelaar, H. J. (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 181–191.

Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., & Milner, J. a. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567–579.

Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., & Ekström, A. M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123(4), 985–991.

Serafini, M., Laranjinha, J., Almeida, L., & Maiani, G. (2000). Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(11-12), 585–590.

Shin, S., Wakabayashi, N., Misra, V., Biswal, S., Lee, G. H., Agoston, E. S., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2007). NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: influence on adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 27(20), 7188–7197.

- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Eng*, 25, 1580–1571.
- Singh, A., Happel, C., Manna, S. K., Acquah-Mensah, G., Carrerero, J., Kumar, S., Nasipuri, P., Krausz, K. W., Wakabayashi, N., Dewi, R., Boros, L. G., Gonzalez, F. J., Gabrielson, E., Wong, K. K., Girnun, G., & Biswal, S. (2013). Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2921–2934.
- Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5271), 59–63.
- Starke, P. E., Hoek, J. B., & Farber, J. L. (1986). Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 261(7), 3006–3012.
- Strehler, V. L. (1962). Time, Cells, and Aging. *Science* 1, 139(3553), 400.
- Suzuki, E., Yorifuji, T., Takao, S., Komatsu, H., Sugiyama, M., Ohta, T., & Al., E. (2009). Green tea consumption and mortality among Japanese elderly people: The prospective Shizuoka elderly cohort. *Annals of Epidemiology*, 19, 732–739.
- Suzuki, H., Chiba, T., Suzuki, T., Fujita, T., Ikenoue, T., Omata, M., Furuichi, K., Shikama, H., & Tanaka, K. (2000). Homodimer of two F-box proteins TrCP1 or TrCP2 binds to I κ B for signal-dependent ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2877–2884.

T

- Tenore, G. C., Campiglia, P., Giannetti, D., & Novellino, E. (2015). Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols. *Food Chemistry*, 169, 320–326.
- Terao, J., Piskula, M., & Yao, Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308(1), 278–284.

Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Research*, 62(18), 5196–5203.

V

Van Acker, F. A., Hulshof, J. W., Haenen, G. R., Menge, W. M., van der Vijgh, W. J., & Bast, A. (2001). New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(1), 31–37.

Verstraeten, S. V., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology & Medicine*, 34(1), 84–92.

Verstraeten, S. V., Mackenzie, G. G., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2008). (-)-Epicatechin and related procyanidins modulate intracellular calcium and prevent oxidation in Jurkat T cells. *Free Radical Research*, 42(10), 864–872.

Viguie, C. A., Frei, B., Shigenaga, M. K., Ames, B. N., Packer, L., & Brooks, G. A. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 75(2), 566–572.

W

Wallace, K. B. (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology*, 93(3), 105–115.

Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), 829–837.

Wang, D., Xu, K., Zhong, Y., Luo, X., Xiao, R., Hou, Y., Bao, W., Yang, W., Yan, H., Yao, P., & Liu, L. (2011). Acute and subchronic oral toxicities of Pu-erh black

tea extract in Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 156–164.

Wang, Z. Y., Wang, L. D., Lee, M. J., Ho, C. T., Huang, M. T., Conney, A. H., & Yang, C. S. (1995). Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by green and black tea. *Carcinogenesis*, 16(9), 2143–2148.

Wardman, P. (1989). Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 118, 1637–1755.

Weiss, R. B. (1992). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology*, 19(6), 670–686.

Wiernik, P. H., & Dutcher, J. P. (1992). Clinical importance of anthracyclines in the treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 6 s1, 67–69.

Wiseman, S. A., Balentine, D. A., & Frei, B. (1997). Antioxidants in tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(8), 705–718.

X

Xu, M., Bailey, A. C., Hernaez, J. F., Taoka, C. R., J., S. H. ., & Dashwood, R. H. (1996). Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis*, 17(7), 1429–1434.

Xu, W., Hellerbrand, C., Köhler, U., Bugnon, P., Kan, Y.-W., Werner, S., & Beyer, T. (2008). The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Laboratory Investigation*, 88, 1068–1078.

Y

Yagmurca, M., Erdogan, H., Iraz, M., Songur, A., Ucar, M., & Fadillioglu, E. (2004). Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin

nephrotoxicity in rats. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 348(1-2), 27–34.

Yang, C. S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D., Kuo, M. C., & Schantz, S. P. (1998). Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7(4), 351–354.

Yang, C. S., Lambert, J. D., & Sang, S. (2009). Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Archives of Toxicology*, 83(1), 11–21.

Yeung, J. H. (1991). Effects of glycerol-induced acute renal failure on tissue glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 13(1), 23–28.

Z

Zhang, D. D. (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews*, 38, 769–789.

Zhang, X-Y., Li, W-G., Wu, Y-J., & Gao, M-T. (2005). Amelioration of doxorubicin-induced myocardial oxidative stress and immunosuppression by grape seed proanthocyanidins in tumour-bearing mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(8), 1043–1052.

Zhang, Z., Liu, Q., Lantry, L. E., Wang, Y., Kelloff, G. J., Anderson, M. W., Wiseman, R. W., Lubet, R., & You, M. (2000). A germ-line p53 mutation accelerates pulmonary tumorigenesis: p53-independent efficacy of chemopreventive agents green tea or dexamethasone/myo-inositol and chemotherapeutic agents taxol or adriamycin. *Cancer Research*, 60(4), 901–907.

Páginas web consultadas:

Glutathione peroxidases signatures and profile. (n.d.)
<http://prosite.expasy.org/PDOC00396>. (Fecha del último acceso: 01.0.1.2015).