



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN NUTRICIONAL SOBRE ALGUNOS MARCADORES UTILIZADOS EN LAS CONSULTAS ANTIENVEJECIMIENTO



Francisco Javier Tejero Vargas

Facultad de Farmacia

2015/2016



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Trabajo Fin de Grado
Grado en Farmacia

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION NUTRICIONAL
SOBRE ALGUNOS MARCADORES UTILIZADOS EN
LAS CONSULTAS ANTIENVEJECIMIENTO



Francisco Javier Tejero Vargas

Tutor: **Antonio Ayala**

Lugar: Aula 2.2. Facultad de Farmacia

Trabajo experimental

Departamento: Bioquímica y

Biología molecular

Fecha: 7 julio 2016

Resumen

Hoy en día las personas se preocupan más por su salud, prevenir las enfermedades y controlar el envejecimiento. El envejecimiento es un proceso complejo, del cual nos interesan dos aspectos: 1) qué lo causa y 2) cuales son los factores que lo aceleran o enlentecen. En relación a la causa, hay muchísimas teorías, entre ellas la teoría de los Radicales Libres. En relación a los factores que aceleran/enlentecen el envejecimiento, ninguno de ellos por si solo va a tener un impacto importante en el plazo de vida, pero en conjunción y a largo plazo sí determinan una longevidad saludable.

Dentro de este esquema, un aspecto importante es la Nutrición. Una alimentación equilibrada es crucial para estar sano. Pero alimentarse bien implica seleccionar aquellos alimentos que nos benefician y evitar aquellos que nos perjudican.

En este trabajo, nos hemos centrado precisamente en uno de ellos, la harina de castaña, un producto novedoso desarrollado por una empresa ubicada en Alajar (Huelva), cuyas propiedades nutritivas y beneficiosas están siendo estudiadas por varios laboratorios. En nuestro caso, hemos estudiado de forma preliminar si la ingesta de harina de castaña puede repercutir en los niveles urinarios de una serie de marcadores que se suelen determinar en las consultas de Medicina Antienvejecimiento, como son el malondialdehído, vitamina C, calcio e iones y cloruro.

El estudio se ha realizado en animales de laboratorio (ratas Wistar) alimentados con una dieta normal durante un cierto periodo de tiempo y posteriormente alimentados con harina de castaña. Estos animales fueron colocados en lo que se denominan “jaulas de metabolismo”, que permiten la recolección de la orina.

Los resultados muestran que la harina de castaña cambia los niveles de algunos de estos marcadores y abren la puerta a la realización de un estudio más en profundidad.

Palabras claves: **Estrés oxidativo, envejecimiento, harina de castaña, radicales libres, marcadores antienvjecimiento.**

ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica
CRH: Hormona liberadora de corticotropina
DCPIP: 2,6-diclorofenolindofenol
DE: Desviación estándar
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ERN: Especies reactivas de nitrógeno
ERO: Especies reactivas de oxígeno
GPX: Glutación Peroxidasa
GSH: Glutación reducido
GST: Glutación S-transferasa
MA: Medicina Antienvjecimiento
MDA: Malondialdehído
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PTH: Paratohormona
PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados
TBARS: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
TBA: Ácido tiobarbitúrico
TCA: Ácido tricloroacético
TMP: 1,1,3,3-tetrametoxipropano
RL: Radicales libres
RLO: Radicales libres de oxígeno
RNA: Ácido ribonucleico
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SEM: Error estándar de la media
SOD: Superóxido dismutasa

Agradecimientos

Quisiera agradecer a varias personas la ayuda que me han prestado. En primer lugar a mi tutor Antonio Ayala por su simpatía, dedicación y atención dada para la realización de este trabajo.

También agradecer a Mario Muñoz su disposición, por enseñarme y aconsejarme, y arreglar cualquier desajuste durante la corrección del trabajo.

Mi primo Jesús Vargas., el cual me ha ayudado en la elaboración de la portada del trabajo.

Por último, agradecer a mi familia el apoyo y ánimo depositado en mí.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Teorías..... | 1 |
| 1.1.1. Estocásticas..... | 1 |
| 1.1.1.1. Teoría del error catastrófico..... | 1 |
| 1.1.1.2. Teoría del entrecruzamiento..... | 1 |
| 1.1.1.3. Teoría del desgaste..... | 2 |
| 1.1.1.4. Teoría de los Radicales Libres..... | 2 |
| 1.1.2. No estocásticas..... | 2 |
| 1.1.2.1. Teoría genética..... | 2 |
| 1.2. Estrés oxidativo..... | 3 |
| 1.3. Agentes antioxidantes exógenos y endógenos..... | 5 |
| 1.3.1. Antioxidantes exógenos..... | 5 |
| 1.3.2. Antioxidantes endógenos..... | 5 |
| 1.3.2.1. Superóxido dismutasa..... | 6 |
| 1.3.2.2. Catalasa..... | 6 |
| 1.3.2.3. Glutación peroxidasa..... | 6 |
| 1.3.2.4. Glutación-S-transferasa..... | 7 |
| 1.4. Determinaciones utilizadas en Medicina Antienvjecimiento..... | 7 |
| 1.4.1. Vitamina C..... | 8 |
| 1.4.2. Calcio..... | 8 |
| 1.4.3. Malondialdehído (MDA)..... | 10 |
| 1.4.4. Estrés adrenal..... | 10 |
| 1.5. Harina de castaña..... | 11 |
| 2. Objetivos..... | 12 |
| 3. Metodología..... | 15 |
| 3.1. Materiales..... | 15 |
| 3.2. Animales..... | 15 |
| 3.3. Recogida de muestras de orina..... | 15 |
| 3.4. Determinaciones..... | 15 |
| 3.4.1. Determinación cuantitativa del ácido L-ascórbico..... | 15 |
| 3.4.1.1. Fundamento..... | 15 |
| 3.4.1.2. Elaboración de la recta patrón..... | 16 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.4.1.3. | Determinación de las muestras de orina en ratas..... | 17 |
| 3.4.2. | Determinación de calcio..... | 18 |
| 3.4.2.1. | Fundamento..... | 18 |
| 3.4.2.2. | Elaboración de las concentraciones de calcio..... | 18 |
| 3.4.2.3. | Procedimiento para la determinación de calcio en orina... | 19 |
| 3.4.3. | Determinación de MDA..... | 19 |
| 3.4.3.1. | Fundamento..... | 19 |
| 3.4.3.2. | Elaboración de la recta patrón..... | 20 |
| 3.4.3.3. | Procedimiento para la determinación de MDA en orina... | 21 |
| 3.4.4. | Determinación de marcadores de estrés adrenal..... | 21 |
| 3.4.4.1. | Fundamento..... | 21 |
| 3.4.4.2. | Elaboración de la recta patrón..... | 21 |
| 3.4.4.3. | Procedimientos para la determinación de cloruro en orina. | 23 |
| 3.5. | Análisis estadístico..... | 23 |
| 4. | Resultados y discusión..... | 24 |
| 4.1. | Ingesta media diaria de dieta normal y harina de castaña..... | 24 |
| 4.2. | Niveles de vitamina C en orina..... | 25 |
| 4.3. | Niveles de MDA en orina..... | 26 |
| 4.4. | Niveles de calcio en orina..... | 27 |
| 4.5. | Niveles de iones cloruro en orina..... | 28 |
| 4.6. | Discusión..... | 29 |
| 5. | Conclusiones..... | 33 |
| 6. | Bibliografía..... | 34 |

1. Introducción

El envejecimiento puede ser definido como el proceso de pérdida progresiva de la integridad fisiológica, alteración funcional del individuo y aumento de la vulnerabilidad ante la muerte. Es un declive funcional que depende del tiempo, por lo que es el factor de riesgo más importante en la mayoría de enfermedades humanas (Zorrilla, 2002).

El envejecimiento es un proceso universal que ocurre en todos los seres vivos de forma irreversible y que conlleva una serie de cambios bioquímicos como son: una pérdida de la capacidad de regeneración, aumento de mutaciones en los cromosomas y una acumulación de células no deseadas (Zorrilla, 2002).

1.1. Teorías

Se han propuesto muchas teorías para explicar el proceso de envejecimiento, que se han dividido en dos grandes categorías:

Las que afirman que el proceso de envejecimiento es el resultado de la suma de alteraciones que ocurren en forma aleatoria y se acumulan a lo largo del tiempo (**teorías estocásticas**) y las que proponen que el envejecimiento está determinado genéticamente de forma que los organismos tienen un reloj interno que una vez activado determina el plazo de vida (**teorías genéticas**).

1.1.1. Teorías Estocásticas

1.1.1.1. Teoría del error catastrófico

Esta teoría propone que con el paso del tiempo se produciría una acumulación de errores moleculares, en la síntesis de proteínas y DNA, que en último término determinaría daño en la función celular (Aria, 2007).

1.1.1.2. Teoría del entrecruzamiento

Esta teoría propone que se forman enlaces o entrecruzamientos entre las proteínas y otras macromoléculas celulares, provocando el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades dependientes de la edad (Aria, 2007).

1.1.1.3. Teoría del desgaste

Esta teoría propone que cada organismo estaría compuesto de partes irremplazables, y que la acumulación de daño en sus partes vitales llevaría a la muerte de las células, tejidos, órganos y, finalmente, del organismo.

1.1.1.4. Teoría de los radicales libres:

Esta teoría formulada por Denham Harman sugiere que los radicales libres, formados endógenamente como subproductos de procesos metabólicos, pueden desempeñar un papel causal en el proceso del envejecimiento. La base de esta teoría es la producción de un estado crónico de estrés oxidativo en todas las células del organismo aeróbico, incluyendo las condiciones fisiológicas normales, debido a un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes (Salmon y cols., 2009).

Por lo tanto, el envejecimiento es el resultado de una inadecuada protección contra el daño producido en los tejidos por los radicales libres, los cuales son moléculas inestables y altamente reactivas con uno o más electrones no apareados, que pueden reaccionar con todas las moléculas que están a su alrededor.

Los radicales libres juegan un papel importante en ciertas patologías relacionadas con el envejecimiento, tales como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas, Enfermedad de Alzheimer y otras. Si logramos disminuir la generación de radicales libres o neutralizamos su daño, lograríamos disminuir estas enfermedades (Salmon y cols., 2009).

1.1.2. Teorías no estocásticas (genéticas y del desarrollo)

1.1.2.1. Teoría genética:

Una parte importante del envejecimiento está determinado por los genes, los cuales controlan el 30% de la longevidad o del plazo de vida. Son ya clásicos los experimentos de Hayflick, quien sugirió que el envejecimiento y las expectativas de vida de una especie son debida a una mayor capacidad proliferativa de sus células. Esta idea que, en principio, tuvo un gran impacto ha estado olvidada hasta que se empezó a hablar de los **telómeros**. El DNA telomérico está formado por secuencias simples repetidas en tándem (TTAGGG)_n con una longitud determinada. La enzima telomerasa añade esta secuencia de manera repetida en el extremo 3' del DNA telomérico.

Cuando los telómeros llegan a un tamaño “corto” crítico, las células entran en senescencia y de esta forma los telómeros parecen servir como un “reloj biológico de la división celular”, informando del número de divisiones producidas.

1.2. Estrés oxidativo

Los procesos de oxidación son muy importantes en bioquímica ya que los seres vivos obtienen de estos la mayor parte de su energía. Pero el oxígeno necesario para la vida puede provocar daños en macromoléculas y alteraciones en procesos celulares debido a una producción masiva de radicales libre de oxígeno (RLO), provocándose así un estado de estrés oxidativo (Guerrera, 2001).

El estrés oxidativo, se define como una alteración del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, produciéndose un desplazamiento de dicho equilibrio hacia los primeros, provocándose alteraciones a nivel biomolecular y modificaciones funcionales en el lugar donde se encuentran (Hui-Ting y cols., 2016).

Algunos de estos efectos sobre estas biomoléculas provocan la desnaturalización de las proteínas y enzimas, desnaturalización de ácidos nucleicos (DNA y RNA), produciéndose así una alteración en la síntesis de proteínas, el deterioro del colágeno y la elastina, la agresión de los lípidos de la membrana celular (Hui-Ting y cols., 2016).

Estas especies reactivas de oxígeno (ERO) son producidas durante las reacciones metabólicas (respiración mitocondrial y reacciones de detoxificación), en la isquemia y también en la exposición a determinados agentes externos como la luz ultravioleta, componentes del humo del tabaco, contaminación ambiental, etc. (Guerrera, 2001).

Existen algunos factores que favorecen también la producción de estrés oxidativo (Figura 1)

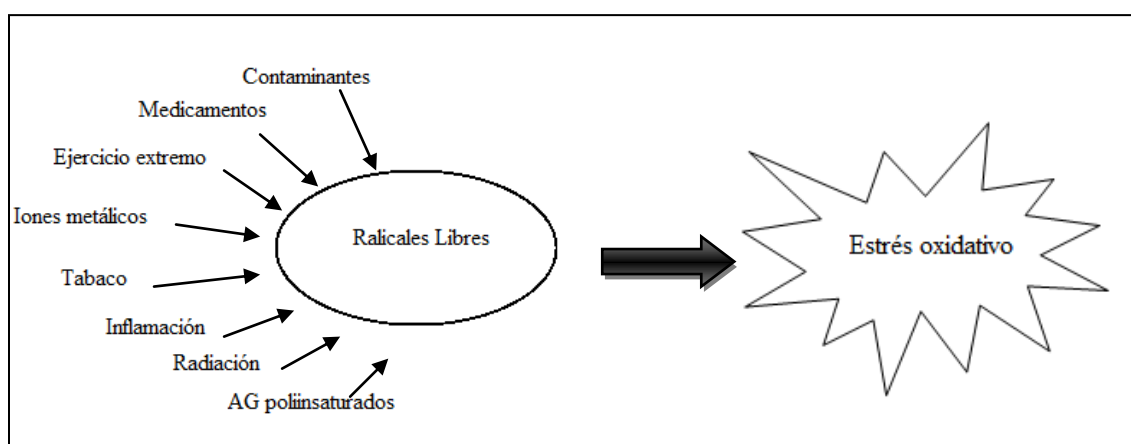


Figura 1. Ejemplos de factores productores de radicales libres y su consecuente estrés oxidativo.

Los RLO más importantes son el oxígeno molecular, el radical-anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y su precursor inmediato, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A continuación podemos verlas (Figura 2). También existen especies reactivas de nitrógeno (Tabla 1):

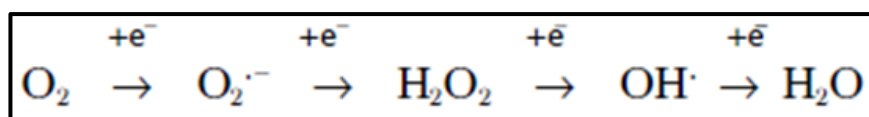


Figura 2. Especies reactivas de oxígeno.

| Radicales libres | No radicales |
|-----------------------------|---------------------------------|
| ERO | ERO |
| Superoxido: $O_2^{\cdot-}$ | Peróxido de hidrógeno: H_2O_2 |
| Hidroxil: OH^{\cdot} | Peróxidos orgánicos: ROOH |
| Peroxil: RO_2^{\cdot} | |
| ERN | ERN |
| Óxido nítrico: NO^{\cdot} | Ácido nitroso: HNO_2 |
| Radical nitrato: NO_3 | Peroxinitrito: ONOO |
| | Peroxinitrato: O_2NOO |

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) más importantes.

La presencia de electrones puede provocar su incorporación a una molécula de O_2 , originando el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual posee un electrón desapareado. Éste se forma en cualquier sistema capaz de generar electrones libres y que cuente con la presencia de oxígeno. Es un radical poco reactivo pero con capacidad de oxidar otros grupos de moléculas. Además, también es formado por neutrófilos, leucocitos, fibroblastos, macrófagos y células del endotelio vascular. El radical hidroperóxido (HO_2^{\cdot}) es mucho más reactivo, con capacidad de iniciar la peroxidación lipídica. Su importancia radica en la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En presencia de metales como hierro, cobre, cobalto y níquel, el peróxido de hidrógeno es transformado a $^{\cdot}OH$.

El daño oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno puede agravarse o inhibirse por las especies reactivas de nitrógeno, entre las que se incluye el óxido nítrico (NO^{\cdot}), capaz de inducir daño “*per se*” y combinado con las especies reactivas de oxígeno, aumentando el daño oxidativo (Sánchez y Méndez, 2013).

1.3. Agentes antioxidantes exógenos y endógenos

1.3.1. Antioxidantes exógenos

Algunos nutrientes de la dieta se comportan como antioxidantes, teniendo un papel importante en la defensa frente al estrés oxidativo. Uno de los más significativos es la vitamina C, un nutriente esencial capaz de neutralizar radicales libres además de jugar un papel importante en la regeneración del radical α -tocoferol, el cual produce cuando la vitamina E actúa sobre los procesos oxidativos que se producen en las partes lipídicas de las células, protegiendo las membranas celulares y lipoproteínas. Los carotenoides son otro grupo de antioxidantes dietéticos importantes, solubles en lípidos y utilizados en la peroxidación lipídica (Da costa y cols., 2012).

1.3.2. Antioxidantes endógenos

Existe una segunda línea de defensa, formada por agentes antioxidantes endógenos (Tabla 2), que no dependen de la dieta. Este grupo de antioxidantes puede actuar conjuntamente con los antioxidantes de tipo exógeno para la disminución del estrés oxidativo. Algunos de estos sistemas antioxidantes requieren micronutrientes para su funcionamiento.

| Antioxidantes endógenos | Ejemplos |
|-------------------------------------|---|
| Enzimas | Superóxido dismutasa Catalasa Glutación peroxidasa Paraoxanasa Glutación S-transferasa Glutación reductasa |
| No enzimáticas | Glutación Ácido lipoico |
| Proteínas de unión a metales | Ferritina Lactoferrina Transferrina |

Tabla 2. Antioxidantes endógenos frente a radicales libres.

1.3.2.1. Superóxido dismutasa

Esta enzima tiene funciones muy importantes dentro del organismo ya que convierte los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 3). Existen tres tipos de isoformas del SOD en los humanos. Isoforma SOD1 (SOD cobre/zinc), SOD2 (SOD Manganese) y SOD3 (SOD Cu/Zn extracelular).

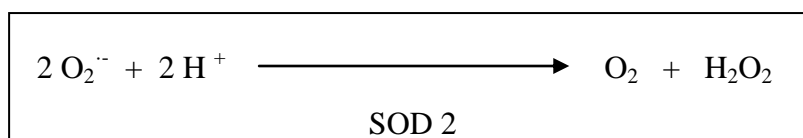


Figura 3. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa del paso del radical superóxido a peróxido de hidrógeno.

1.3.2.2. Catalasa

La catalasa juega un papel importante en la defensa del organismo ya que es otra enzima antioxidante que se encuentra dentro de los peroxisomas de las células y también del citoplasma de los eritrocitos. La catalasa consiste en cuatro subunidades, las cuales catalizan la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno a agua (Figura 4)

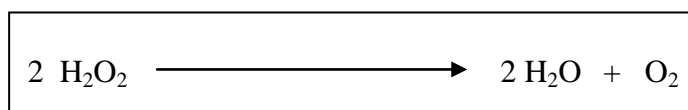


Figura 4. Conversión del peróxido de hidrógeno a agua catalizada por la catalasa.

1.3.2.3. Glutación peroxidasa

Las glutatión peroxidadas se encuentran formadas por una familia de enzimas dependientes de selenio, las cuales son: Glutatión peroxidasa 1 (GPX1), GPX2, GPX3 y GPX4 (Da costa y cols., 2012).

Esta familia de enzimas reduce el peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos intracelulares, grandes moléculas de peróxidos lipídicos, usando glutatión u otros compuestos reductores (Zorrilla, 2002).

El glutatión oxidado, para volver a pasar a glutatión reducido, necesita de la enzima glutatión reductasa, la cual solo provoca dicha reducción hasta glutatión reducido con la participación de NADPH, el cual se transforma en $NADP^+$ (Criado C y Moya M, 2009) (Figura 5).

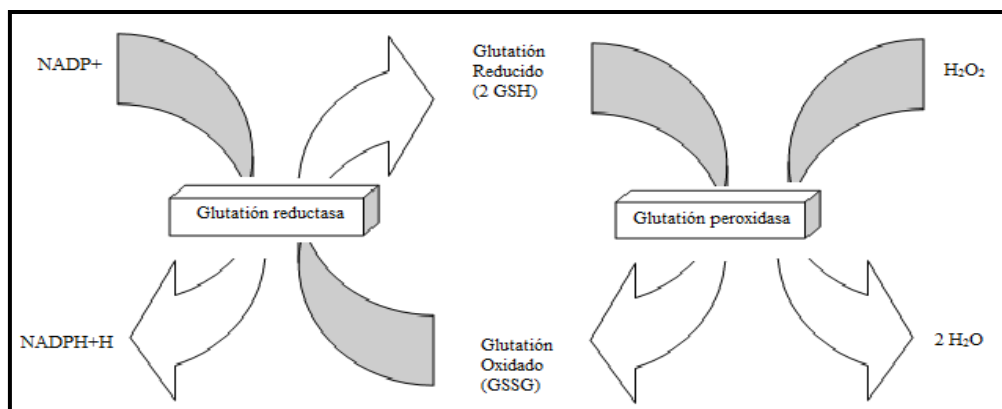


Figura 5. Reacciones de la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa.

1.3.2.4. Glutatión S-transferasa

La Glutatión S-transferasa es una enzima localizada en el citosol, mitocondrias y membranas celulares (Da costa y cols., 2012).

Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato, glutatión reducido (GSH) sobre el centro electrófilo de un gran número de xenobióticos.

Existen siete clases de GST citosólicas: las cuales se diferencian en su secuencia, propiedades inmunológicas y su papel fisiológico (Hayes y Pulford, 1995).

1.4. Determinaciones utilizadas en Medicina Antienvejecimiento

La medicina antienvjecimiento (MA) es una rama de la medicina centrada en retrasar la pérdida de las funciones biológicas que ocurre con la edad, con el objetivo de vivir más y mejor. En ella, para la valoración inicial del paciente y para su posterior seguimiento, se realizan pruebas bioquímicas y genéticas, consistentes en la determinación de una serie de paneles de marcadores de oxidación, de funciones fisiológicas, y de factores de riesgo, que nos ofrecen un diagnóstico a nivel nutricional, funcional. Todo ello permite establecer el conjunto de recomendaciones terapéuticas individualizadas y personalizadas a seguir.

Para elegir las determinaciones objeto de estudio en este trabajo, se ha considerado que en MA aspectos fundamentales son modular el equilibrio de los radicales libres, el nivel de antioxidantes, la gestión del estrés, y el estado de salud osea. Los test seleccionados tratan de identificar una serie de causas subyacentes de los problemas de salud que se suelen tratar en una consulta de MA y que se pueden realizar fácilmente en orina en la propia consulta, lo cual permite tener una idea general y rápida del estado inicial del

paciente y conocer aquellos aspectos en los cuales habría que profundizar más. Las determinaciones son:

Vitamina C, ya que al ser un potente antioxidante puede protegernos de agentes que aceleran el envejecimiento; **calcio** en orina, ya que una deficiencia del mismo provoca patologías como la osteoporosis y el raquitismo; **MDA**, marcador de peroxidación lipídica; **cloruro** en orina, que se mide como marcador del **estrés adrenal** (Sánchez y Méndez, 2013).

1.4.1. Vitamina C

El ácido ascórbico es una molécula con carga neutra que se puede protonar y convertirse en ascorbato. (Figuroa y Rivas, 2015). Los humanos no la pueden sintetizar y, por lo tanto, necesitan ingerirlo de una fuente externa. El efecto antioxidante del ascorbato se debe a su capacidad de donar electrones. Su actividad como antioxidante incluye la capacidad para oxidarse reversiblemente a radical y luego a ascorbilo (Figuroa y Rivas, 2015).

En cuanto a la distribución de la vitamina C en el organismo, los órganos con más alta concentración de la misma son las glándulas suprarrenales (550 mg / kg), el cerebro (140 mg / kg), el hígado (125 mg/ kg), y el músculo esquelético con una concentración de 35 mg / kg (Figuroa y Rivas, 2015). Las concentraciones séricas de ascorbato son de 5 mM.

Las necesidades diarias en mujeres y varones adultos es de 60 mg (Dettman y cols., 2007).

Las concentraciones plasmáticas de ácido ascórbico aumentan a medida que la dosis ingerida se eleva hasta lograr un pico con dosis de 90 a 150 mg en un día.

Cuando ocurre un fallo renal o está alterado el mecanismo de filtración glomerular, grandes cantidades de ascorbato pueden aparecer en la orina aun en presencia de bajos niveles de plasma o leucocitos (Dettman y cols., 2007).

1.4.2. Calcio

Los minerales son requeridos para una variedad de funciones. El 98% del calcio que tiene nuestro organismo se encuentra en los huesos, el 0,5% en los dientes y el resto se encuentra en circulación sanguínea y puede estar ligado a proteínas, en forma iónica o formando complejos con ácidos.

El calcio tiene las siguientes funciones: constitución de fluidos y tejidos, regulación cardíaca, componente de los sistemas enzimáticos, conducción nerviosa, mantenimiento de la estructura y calidad de la masa ósea, etc.

El calcio es considerado un macromineral, del cual necesitamos consumir más de 100 mg/día, entre 800-1.200 mg/día.

La concentración normal de calcio en la sangre es de 10 mg/dl con un rango entre 8,8 y 10,6 mg/dl. Los cambios en esta concentración pueden estar relacionados con alguna patología existente y no necesariamente con su bajo o alto consumo. La hipocalcemia puede presentarse en hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, sarcoidosis y prolongados períodos de inmovilización, ya que el músculo se atrofia y empieza a liberar calcio a los fluidos, lo que conlleva trastornos neuronales y enzimáticos, y problemas relacionados con la contracción muscular y la coagulación sanguínea.

La formación del hueso está relacionada con la estimulación de osteoclastos y osteoblastos y depende de factores endocrinológicos y nutricionales en los que intervienen la paratohormona (PTH) y la vitamina D, estimulando la resorción de calcio en el hueso cuando su concentración en sangre es baja.

El calcio es excretado diariamente a través del pelo, las uñas, la saliva, la orina y las heces.

Las patologías asociadas a un déficit en la ingesta de calcio son el raquitismo/Osteomalacia, caries dentales y la osteoporosis.

El calcio en los alimentos, después de su ingestión, es ionizado en el medio ácido del estómago y absorbido en el intestino delgado (duodeno y yeyuno), donde interacciona con los demás componentes de la dieta, formando complejos, cuya solubilidad depende de muchos factores que afectan la tasa de absorción. Algunas patologías como la atrofia gástrica, la hipoclorhidria o aclorhidria que acompaña el envejecimiento, la mala absorción intestinal y la pérdida tubular renal afectan la absorción de calcio. La disminución en la producción de estrógenos, la obesidad y el alto consumo de alcohol, café y sodio también afectan la absorción de calcio (Thakker, 2016).

Las fuentes de calcio son los productos lácteos, frutos secos, semillas de sésamo, verduras, aguas duras.

Las cantidades normales de calcio en orina es de 100-300 mg/día si se está consumiendo una dieta normal. Si por el contrario se está consumiendo una dieta baja en calcio, la cantidad en la orina será de 50-150 mg/día.

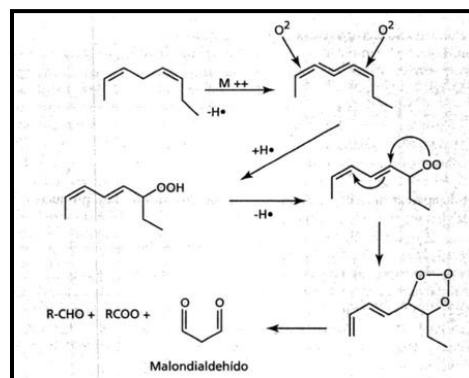
Unos niveles altos de calcio en orina, por encima de 300 mg/día, puede deberse a distintas patologías: nefropatía crónica, sarcoidosis, hiperparatiroidismo, etc. Por el contrario, unos niveles bajos de calcio en la orina puede deberse a trastornos de absorción de calcio (Thakker, 2016).

1.4.3. Malondialdehído (MDA)

El **Malondialdehído** es un marcador de peroxidación lipídica (Corredor, 2006). La peroxidación lipídica es un proceso que implica la degradación oxidativa de los fosfolípidos de la membrana celular, tales como ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Kwiecien S y cols., 2014).

En el primer paso de la peroxidación lipídica, los radicales libres de oxígeno separan un hidrógeno de la cadena de los ácidos grasos, reduciéndose los ROS a agua y los ácidos grasos a radicales libres. Estos radicales libres reaccionan con una molécula de oxígeno provocando un radical libre de oxígeno, el cual tiene capacidad para separar más hidrógenos de más otros ácidos grasos (Figura 6). Este proceso se acelera en presencia de hierro y cobre. Los peróxidos de lípidos son compuestos muy inestables y dan lugar al malondialdehído (MDA) (Kwiecien S y cols., 2014).

Figura 6. Reacciones de peroxidación lipídica. Gracias a la acción de los metales, el ácido graso poliinsaturado pierde un hidrógeno y se convierte en un radical libre que puede atacar a otros ácidos grasos poliinsaturados, propagando el efecto en cadena. El oxígeno ataca al radical libre y produce como producto peróxidos que, a su vez, son radicales libres. Estos radicales se pueden romper espontáneamente dando productos tales como el malondialdehído, que es tóxico (Corredor, 2006).



1.4.4. Estrés adrenal

El estrés adrenal es producido por un mal funcionamiento (agotamiento) de las glándulas suprarrenales, encargadas de liberar hormonas como el cortisol, proveniente de la zona fascicular de la corteza suprarrenal, y la aldosterona, secretada por la zona reticular, ambas implicadas en la reabsorción de iones sodio y cloruro que son excretados por orina. El cortisol, asimismo, se libera en situación de estrés, dejándose de lado la producción de otras hormonas necesarias para el organismo.

Tras un periodo prolongado de estrés crónico, se produce un agotamiento de las glándulas suprarrenales, provocando signos físicos como la fatiga, síntomas de depresión, hiperventilación, mala cicatrización de heridas, falta de apetito sexual, etc. Las personas que padecen fatiga adrenal tienen unos patrones de energía diarios como son la fatiga matutina, la dificultad para levantarse temprano por la mañana, etc. Las fases de respuesta al estrés afectan principalmente a la corteza adrenal y no a la médula. Las tres fases de respuesta son:

- **Fase de alarma (inicial):** Se produce una congestión inicial y la hipertrofia con depleción (pérdida de funcionamiento) de los almacenamientos de lípidos y vitamina C en la corteza suprarrenal. También un incremento en la secreción de cortisol seguido de una disminución en la misma, una disminución del peso corporal, una menor resistencia al estrés extra y la desaparición casi completa de los eosinófilos.
- **Fase de agotamiento:** Caracterizada porque se produce una disminución en la habilidad para sostener la respuesta al estrés, una disminución de los niveles de cortisol y envejecimiento prematuro.
- **Fatiga adrenal:** También conocida como hipoadrenia subclínica. La fatiga adrenal comienza después de un largo periodo de estrés o evento estresante agudo, por trabajo excesivo, participación intensa en deportes, etc. La producción de esta fatiga adrenal provoca una serie de patologías como: tos crónica, bronquitis o gripes recurrentes, asma y otras enfermedades respiratorias, anorexia, baja resistencia a las infecciones.

El cuadro clínico (entidades clínicas reportadas) de una persona afectada con fatiga adrenal se indica en la Tabla 3.

| | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| Disminución de la inmunidad | Función cardíaca débil | Pérdida del sentido del humor |
| Parálisis emocional | Pobre cicatrización de las heridas | Incremento y susceptibilidad a las infecciones |
| Alcoholismo y adicción a las drogas | Quemaduras | Incremento en los signos de perimenopausia |

Tabla 3. Cuadro que aparece debido a la fatiga adrenal.

Algunos de los factores agravantes del estrés adrenal son el estrés constante en la vida diaria, los pobres hábitos de alimentación, relaciones poco satisfactorias en la familia y el trabajo, la falta de ejercicio y actividades recreacionales. En contraposición, los factores de alivio del estrés adrenal son el descanso mental, físico y emocional, el sueño reparador, alivio de la situación de estrés, comidas regulares y la mejora de la relación con los amigos y familiares.

En el estrés adrenal, las pruebas clínicas más significativas que indican que se padece son: Linfadenitis cervical generalizada, piel seca y delgada, sudoración que puede ser olorosa, signos y síntomas de bajo funcionamiento tiroideo (Pérez, 2016).

Como marcador de estrés adrenal en el laboratorio se usan las concentraciones de ión cloruro en orina ya que las glándulas suprarrenales dejan de secretar cortisol y aldosterona, estando esta última implicada en la reabsorción de iones sodio y cloruro que van a ser excretados en orina (Pérez, 2016).

1.5. Harina de castaña

La castaña es un alimento sano muy nutritivo en el que predominan los azúcares y otros hidratos de carbono. Es más rico en sustancias nitrogenadas que la patata aunque menos que la harina de trigo, superándole en grasas, constituyendo un alimento sabroso.

La castaña, en Europa, se cultiva como el Castaño Español, cuyo nombre científico es *Castanea sativa*. Hay más especies en otras regiones del hemisferio boreal. (Fрати y cols., 2014).

El fruto pelado pesa 92% del total de la castaña y la proporción de agua varía de un 25-60%. Aceptando el 40% de agua la composición de la castaña es (Tabla 4):

| Composición | % |
|-------------------------|----------|
| Agua | 40% |
| Almidón | 25% |
| Azúcares | 19% |
| Sustancias nitrogenadas | 8% |
| Grasas | 3% |
| Celulosa | 3% |
| Cenizas | 2% |

Tabla 4. Composición de la harina de castaña.

La harina se obtiene moliendo las castañas mondadas a la salida del horno, antes de su enfriamiento y que se humedezcan. La harina es dulce, de color amarillo-pálida o gris-amarillenta, digestiva y contiene sustancias proteicas. Hay gran proporción de hidratos de carbono solubles, de fácil asimilación, entre los que se encuentran la sacarosa y la dextrina (Fрати y cols., 2014). La harina de castaña no contiene gluten ni sodio y posee un alto contenido en potasio, con lo cual es un alimento apto para celíaco y beneficioso para personas con problemas de arterioesclerosis, y personas con hipertensión.

Es una fuente de minerales como el magnesio, hierro, fósforo, zinc, teniendo consigo propiedades vasculares reconstituyentes y antiinflamatorias. También contiene calcio, lo que contribuye a una buena salud ósea. Es rica en fibra no soluble, favoreciendo el funcionamiento del tránsito intestinal y previniendo el cáncer de colon. El hecho de tener carbohidratos complejos favorece que se absorban lentamente los nutrientes, manteniendo los niveles de azúcar y creando un nivel de saciedad adecuado. Contiene una cantidad importante de antioxidantes. Entre los antioxidantes se encuentran las vitaminas A, C y E. Además, posee vitaminas del grupo B como son: B1, B2, B3, B5, B6 y B9, necesarias para el metabolismo y el crecimiento. Todas ellas aportan energía y colaboran en la conservación de una piel sana y saludable. Su contenido en vitamina B y fósforo lo convierte en un alimento ideal para proteger el sistema nervioso. Otro de los componentes de la harina de castaña es su contenido en vitamina K que ayuda a la coagulación de la sangre y producción de proteínas que forman los huesos, tejidos. Su alto contenido en ácido fólico la hace útil para regenerar tejidos y la cicatrización. Al contener triptófano, puede ayudar a combatir el insomnio. Además, contiene un bajo índice glucémico, baja los niveles de colesterol y evita el riesgo de padecer enfermedades de corazón. En cuanto a las grasas, posee niveles altos de ácidos grasos esenciales como el linoléico, beneficiosos para mantener la salud cardiovascular.

La harina de castaña está aconsejada en personas con anemia debido a su contenido en hierro, también para la memoria. Está recomendada en personas que sufren agotamiento físico y nervioso.

El contenido nutricional por 100 g de producto de harina de castaña se indica en Tabla 5:

| Características nutricionales | Gramos |
|--------------------------------------|---------------|
| Valor energético | 190 kcal |
| Grasas | 2,2g |
| • De las cuales saturadas | 0,4g |
| Hidratos de carbono | 36,5g |
| Fibra | 6,7g |
| Proteínas | 2,65 g |
| Agua | 52 g |

Tabla 5. Contenido nutricional de la harina de castaña.

2. Objetivos

Los principales objetivos de este trabajo son:

- I. Aprender a diseñar un estudio experimental para probar estrategias de intervención para controlar el envejecimiento. En este caso, el trabajo se centra en una intervención nutricional.
- II. Poner a punto los métodos de determinación de la vitamina C, MDA, calcio y estrés adrenal en orina.
- III. Demostrar que los métodos designados para el análisis de vitamina C, calcio, MDA y estrés adrenal se pueden utilizar en ratas.
- IV. Determinar si a corto plazo la inclusión de harina de castaña en la dieta mejora los niveles de MDA vitamina C, metabolismo del calcio y estrés adrenal.

3. Metodología

3.1. Materiales

Para la elaboración de los experimentos se utilizaron los siguientes materiales: Jaulas de metabolismo (Panlab); harina de castaña suministrada por la Finca La Allanada (Alajar, Huelva); espectrofotómetro U-2800 Digitab Hitachi; Vortex (Heidolph reax 2000); lector de placa Microplate Reader ASYS UVM340 (Biochrom, Cambridge, UK); campana de flujo laminar horizontal Telstar AH-100 (Telstar, Bristol, USA).

3.2. Animales

Se emplearon ratas hembras de la raza Wistar, de un peso entre 100-150 g, mantenidas en un medio de temperatura constante de 22 ± 1 °C, humedad relativa del 60%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, y acceso libre a comida y agua. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las «Guidelines of the European Union Council» (86/609/EU), siguiendo las regulaciones españolas (BOE nº.34/11370-421,2013) para el uso de animales de laboratorio, y fueron aprobadas por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

3.3. Recogida de muestras de orina

Se recogieron muestras de orina diariamente a seis ratas Wistar colocadas individualmente en las jaulas de metabolismo y alimentadas durante una semana con dieta normal y otra con harina de castaña. Las muestras se recogieron a las 15:00 de la tarde. Las jaulas de metabolismo son útiles para la obtención de orina pura sin contaminación (Kurien y cols., 2004).

3.4. Determinaciones

3.4.1 Determinación cuantitativa del ácido L-ascórbico

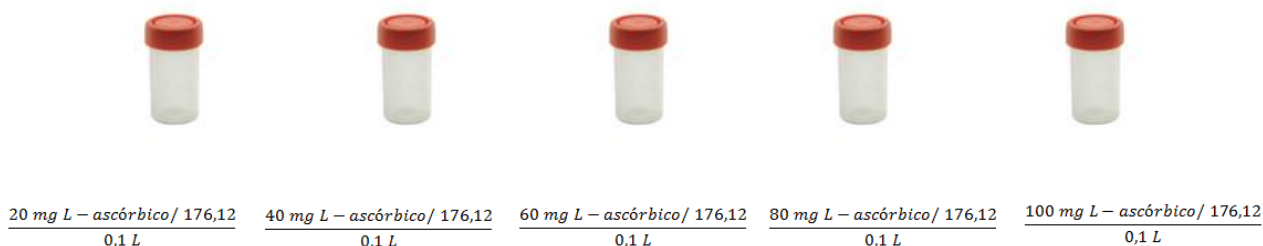
3.4.1.1. Fundamento

La vitamina C es una vitamina hidrosoluble necesaria para el crecimiento y desarrollo normales, con un poder antioxidante natural no enzimático. Es excretado por vía renal, en la orina. El ácido ascórbico tiene la propiedad de decolorar al 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), un indicador redox azul, utilizado en análisis químicos para la determinación de la vitamina C.

La cantidad de orina necesaria para decolorar el reactivo da información de la cantidad de vitamina C que tenemos en la muestra. La vitamina C, en esta reacción redox con el reactivo, se oxida a ácido dehidroascórbico mientras que el DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) se reduce a DCPIPH₂, compuesto incoloro (Birch y cols., 1993).

3.4.1.2. Elaboración de la recta patrón

Para la determinación de ácido ascórbico en orina, se realizó una recta patrón de esta vitamina en agua destilada (Figura 7). Las concentraciones del ácido L-ascórbico fueron:



Concentraciones:

[1,1] mM [2,27] mM [3,40] mM [4,54] mM [5,67] mM

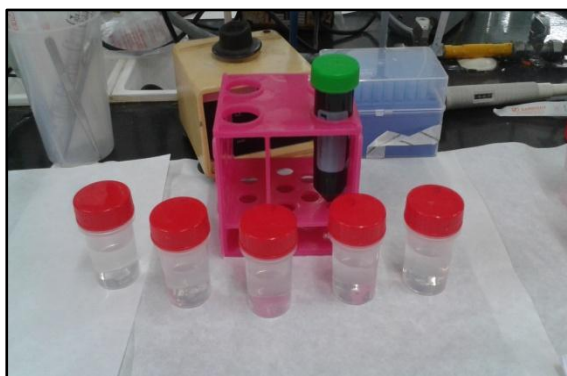


Figura 7. Preparación de los 5 frascos con las distintas concentraciones de Vitamina C y el reactivo preparado en un tubo de polipropileno de 100 ml.

Por otro lado, se preparó una disolución de 2,6-DCPIP al 0,32 % p/v en etanol.

A 50 µl de solución de 2,6-DCPIP, fueron añadidas gotas de las diferentes soluciones del patrón de ascorbato con una pipeta Pasteur, a la par que se agitaba el tubo, y se registraban cuántas gotas de cada solución eran necesarias para que el indicador azul DCPIP se tornara incoloro de forma permanente.

Mediante la recogida del número de gotas de cada disolución se obtiene la ecuación de la recta que relaciona de forma directa la concentración de vitamina C con el número de gotas necesarias para decolorar 50 µl de 2,6-DCPIP.

Los valores obtenidos para la realización de la recta fueron (Tabla 6 y Figura 8):

| Eje X (mg de ascorbato/100 mL) | Eje Y (Número de gotas solución ascorbato) |
|--------------------------------|--|
| 20 | 11 |
| 40 | 8 |
| 60 | 7 |
| 80 | 6 |
| 100 | 4 |

Tabla 6. Valores obtenidos para la recta patrón.

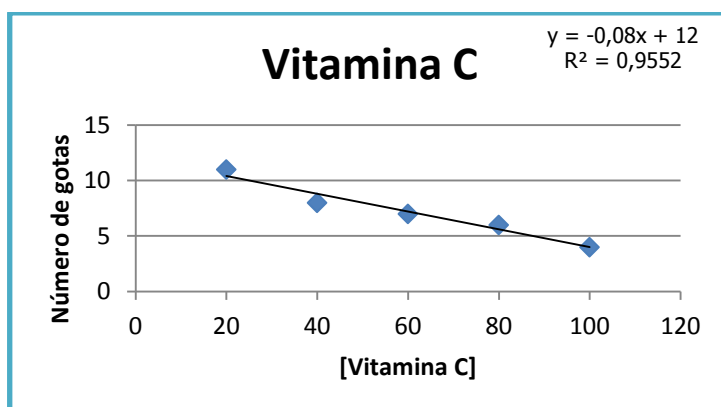


Figura 8. Recta patrón de ácido L-ascórbico. Representación del número de gotas de ascorbato necesarias para la reducción completa del DCPIP frente a la concentración de Vitamina C. Dichos resultados son la media de tres determinaciones.

3.4.1.3. Determinación de las muestras de orina de ratas

Tras la recolección de la orina de las ratas, en un tubo de ensayo con 50 µl de DCPIP se fueron añadiendo gotas de muestras de orina de ratas. Una vez recogidas el número de gotas necesaria para la decoloración del DCPIP y utilizando la recta patrón se determina la cantidad de vitamina C de la muestra.

3.4.2. Determinación del calcio

3.4.2.1. Fundamento

Para la determinación de la cantidad de calcio excretada en orina se empleó un método semicuantitativo turbidométrico, consistente en la reacción de oxalato de amonio y ácido oxálico con el calcio de la orina formándose un precipitado blanco de oxalato cálcico monohidratado (Berger, 1995).

3.4.2.2. Elaboración de las concentraciones de calcio

Para poder hacer la determinación semicuantitativa de calcio en orina, primeramente realizamos 5 disoluciones estándar de calcio, cuyas concentraciones fueron:



Concentraciones:

[9,97] mM [49,87] mM [99,75] mM [149,62] mM [199,50] mM

En la preparación de las distintas concentraciones (Figura 9) se utiliza un agitador magnético para evitar que precipite el calcio y no se pueda observar la turbidez.



Figura 9. Tubos de las distintas concentraciones de calcio, observándose las diferencias en su turbidez.

Por otro lado, se preparó una disolución del reactivo compuesto por ácido oxálico 1,67% p/v, oxalato de amonio 1,67% p/v y ácido acético glacial al 3,33% v/v.

3.4.2.3 Procedimiento para la determinación de calcio en orina

En un tubo transparente se añaden 0,5 ml de la solución estándar correspondiente y 0,5 ml del reactivo. (Figura 10).

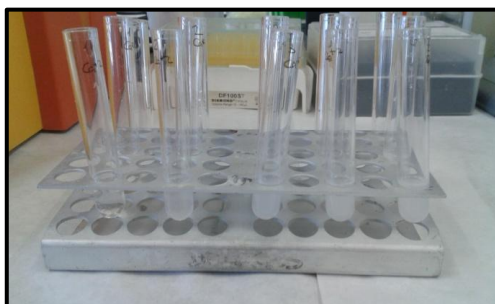


Figura 10. Tubos en gradilla con las distintas concentraciones de Calcio y su adición del reactivo.

Una vez preparadas las distintas muestras estándares, se añaden 0,5 ml de la muestra de orina a 0,5 ml del reactivo, comparando el nivel de turbidez obtenido con el de las muestras patrones.

3.4.3. Determinación de MDA

3.4.3.1 Fundamento

El malondialdehído (MDA) es un marcador de la peroxidación lipídica y, por tanto, del estrés oxidativo. Las concentraciones de MDA en orina pueden ser calculadas por reacción con el ácido tiobarbitúrico formando un compuesto coloreado que se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 535 nm (Kil y cols., 2014) (Figura 11).

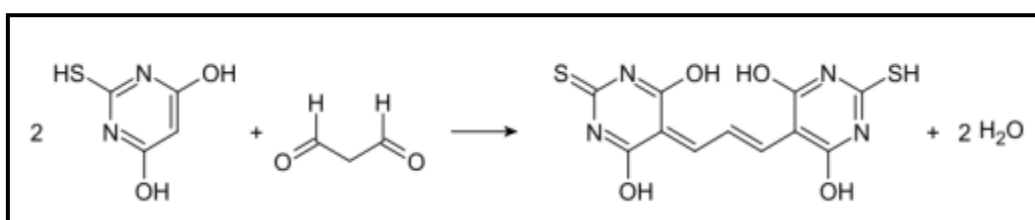


Figura 11. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malonaldehído (MDA).

3.4.3.2 Elaboración de la recta patrón

Para la realización de la recta patrón (Figura 12) de MDA, se prepararon soluciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) en agua destilada con las siguientes concentraciones:

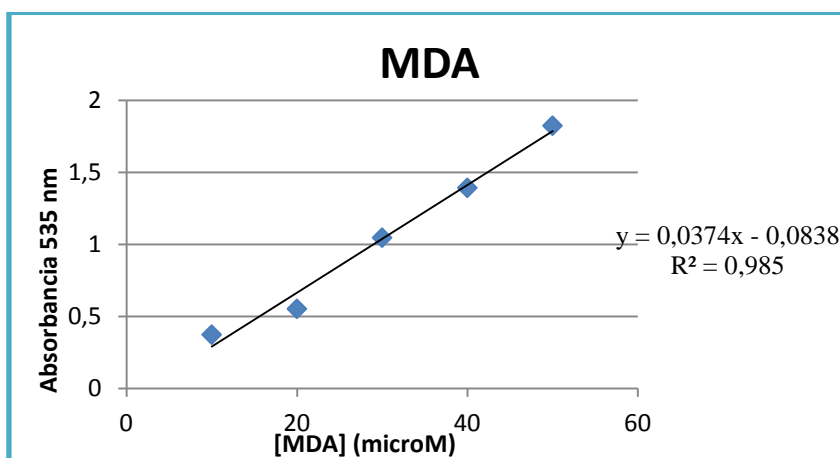


Figura 12. Recta patrón de malondialdehído. Se representa la absorbancia a 535 nm para cada concentración de MDA. Los resultados son la media de dos determinaciones Representación de la absorbancia frente a los micromoles de MDA.

A continuación se prepara el reactivo compuesto por TCA 15 % p/v –TBA 0,375 % p/v –HCl 0,25 N.

Seguidamente, se mezclan 1 ml de solución patrón con 2 ml del reactivo en un tubo de ensayo, los cuales se calientan al baño maría durante 15-30 min. Al calentar nos da una coloración rosa. Finalmente, se mide la absorbancia a 535 nm (Figura 13):



Figura 13. Soluciones estándares de MDA tras la reacción.

3.4.3.3. Procedimiento para la determinación de MDA en orina

Para calcular la concentración de MDA en las muestras de orina, se mezclan 0,5 ml de orina de cada rata con 2 ml del reactivo. El blanco se prepara con 0,5 ml de agua destilada y 2 ml de reactivo. Mediante la ecuación de la recta patrón se obtienen las concentraciones de MDA a partir de los valores de absorbancia.

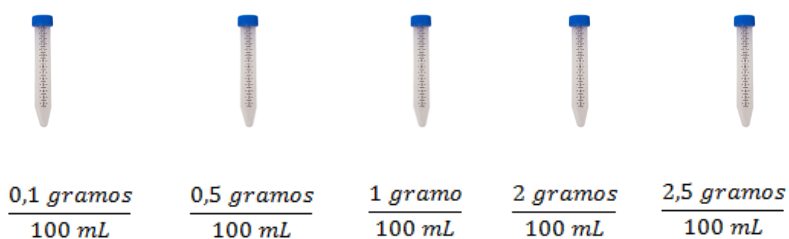
3.4.4. Determinación de marcadores de estrés adrenal: cloruro en orina

3.4.4.1. Fundamento

La presencia de altos niveles de cloruros en orina pueden ser consideradas signo de fatiga adrenal, ya que el aumento de los niveles en orina de iones cloruro puede ser causada, entre otros factores, por una insuficiencia corticosuprarrenal. La fatiga adrenal se produce tras un proceso de estrés continuado que provoca un agotamiento de la capacidad de las glándulas suprarrenales para secretar cortisol y aldosterona, hormonas implicadas en la reabsorción de iones cloruro y sodio, excretándose por orina (Charmandari y cols., 2014).

3.4.4.2. Elaboración de la recta patrón

Para conocer la cantidad de cloruro en orina, se realiza previamente una recta patrón de cloruro de sodio en agua destilada con las siguientes concentraciones:



Concentraciones:

0,02 M 0,14 M 0,28 M 0,56 M 0,7 M

A continuación, se mezclan 150 µl de la solución de cromato potásico con 175 µl de cada una de las soluciones estándares de cloruro preparada anteriormente. Seguidamente, se añaden gotas de la solución de nitrato de plata con una pipeta Pasteur hasta que aparece un precipitado marrón rojizo de cromato de plata formado cuando la plata ya ha reaccionado con todo el cloruro, formando AgCl. (Figura 14).



Figura 14. Tubos con distintas concentraciones de Cloruro tras la reacción con las soluciones de cromato potásico y nitrato de plata.

Para la elaboración de la recta patrón, se representan el número de gotas de nitrato de plata frente a la concentración de cloruro (Tabla 7 y Figura 15):

| X (Concentración Cl ⁻) | Y (Nº gotas AgNO ₃) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 0,1 | 3 |
| 0,5 | 6 |
| 1 | 11 |
| 2 | 19 |
| 2,5 | 26 |

Tabla 7. Número de gotas de Nitrato de plata frente a la concentración de cloruro.

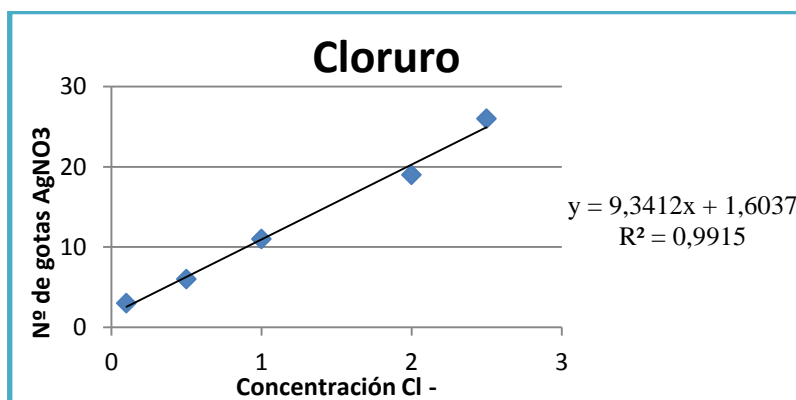


Figura 15. Recta patrón de Cloruro. Representación del número de gotas de nitrato de plata necesarias para que se forme el precipitado marrón-rojizo. Los resultados son la media de dos determinaciones.

3.4.4.3. Procedimiento para la determinación de cloruro en orina

Con las muestras de orina se procede de la misma forma que con las soluciones estándar de cloruro. A partir de los valores de gotas de nitrato de plata utilizadas en la reacción, mediante la recta patrón, se calcula la concentración de cloruro en cada una de las muestras de orina.

3.5. Análisis estadístico

Los datos fueron comparados mediante ANOVA, seguido por el test Tukey utilizando el programa estadístico *Statgraphics Plus V 3.0*.

4. Resultados y discusión

4.1. Ingesta media diaria de dieta normal y harina de castaña

Para cada rata se pesó la cantidad de comida ingerida por día tanto de dieta estándar como de harina de castaña. Como puede verse en la Tabla 8, no se observan diferencias significativas en la cantidad de comida ingerida en ambos casos, excepto en la Rata 1.

| Día | Rata 1 | Rata 2 | Rata 3 | Rata 4 | Rata 5 | Rata 6 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 13,45 | 10,01 | 9,11 | 9,42 | 6,44 | 17,17 |
| 2 | 13,45 | 10,01 | 8,26 | 9,42 | 6,44 | 15,54 |
| 3 | 13,45 | 10,01 | 8,26 | 9,42 | 6,44 | 15,54 |
| 4 | 17,41 | 12,74 | 8,64 | 12,92 | 9,28 | 7,70 |
| 5 | 17,41 | 12,74 | 8,64 | 12,92 | 9,28 | 7,70 |
| 6 | 17,41 | 12,74 | 8,64 | 12,92 | 9,28 | 7,70 |
| 7 | 15,49 | 10,60 | 10,42 | 10,90 | 7,08 | 16,05 |
| 8 | 15,70 | 10,61 | 10,82 | 10,25 | 7,90 | 17,54 |
| 9 | 14,07 | 10,19 | 10,92 | 11,07 | 7,67 | 18,38 |
| 10 | 14,84 | 10,77 | 10,99 | 11,37 | 7,24 | 17,68 |
| 11 | 14,81 | 10,36 | 10,33 | 11,23 | 7,17 | 14,79 |
| 12 | 13,76 | 10,07 | 9,80 | 10,11 | 7,80 | 15,05 |
| MEDIA (DN) | 15,10* | 10,90 | 9,57 | 11,00 | 7,67 | 14,24 |
| D.E. | 1,59 | 1,14 | 1,09 | 1,35 | 1,09 | 4,09 |
| 13 | 13,76 | 10,07 | 9,80 | 10,11 | 7,80 | 15,05 |
| 14 | 7,50 | 13,30 | 5,00 | 13,30 | 5,20 | 14,80 |
| 15 | 12,13 | 10,60 | 10,63 | 11,03 | 7,18 | 14,87 |
| 16 | 11,68 | 8,76 | 10,20 | 11,09 | 7,22 | 12,80 |
| 17 | 14,25 | 11,75 | 10,25 | 11,98 | 7,63 | 18,64 |
| 18 | 14,16 | 10,27 | 10,16 | 11,04 | 8,32 | 16,09 |
| MEDIA (H) | 12,25* | 10,79 | 9,34 | 11,43 | 7,23 | 15,38 |
| D.E. | 2,56 | 1,56 | 2,14 | 1,09 | 1,08 | 1,92 |

Tabla 8. Cantidad de comida ingerida por día de cada rata usada en el estudio. Los pesos están indicados en gramos. Los resultados son la media \pm DE (n = 12 con dieta normal; n =6 con harina de castaña).

4.2. Niveles de vitamina C en orina de ratas alimentadas con dieta estándar y harina de castaña

Los resultados muestran que la cantidad de vitamina C aumenta de forma significativa en las ratas 1, 2 y 6. No se observan diferencias significativas para la rata 3 y 5. En el caso de la número 4 se produce una disminución de ascorbato en orina (Figura 16).

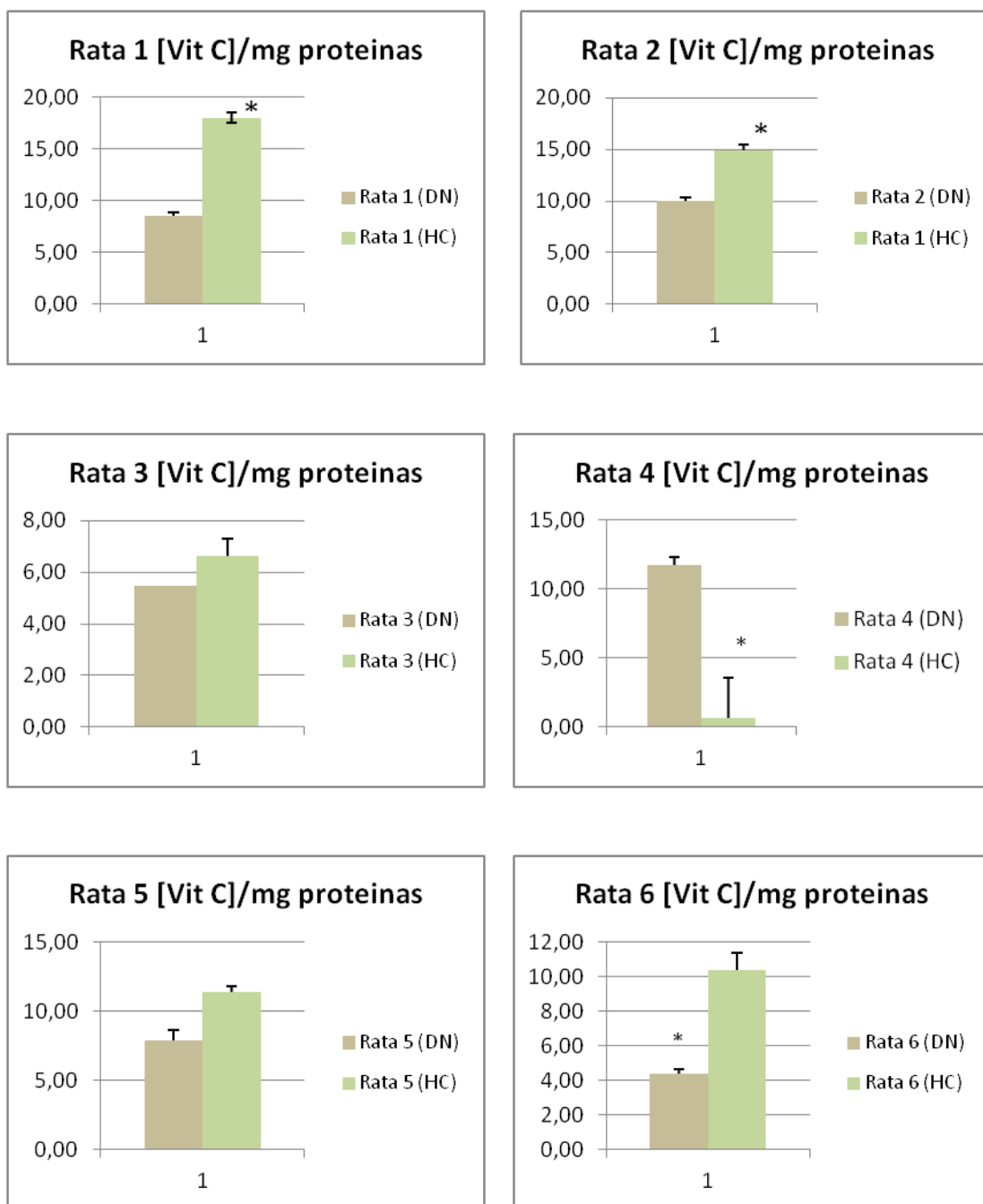


Figura 16. Contenido de vitamina C en orina de rata antes y después del cambio de dieta. Los resultados son la media \pm SEM (n= 5 con dieta estándar; n= 6 con dieta a base de harina de castaña). * Estadísticamente significativo (p<0.05; ANOVA seguido de Test de Tukey).

4.3. Niveles de MDA en orina de rata alimentada con dieta normal y con harina de castaña

Los niveles de MDA se determinaron en las muestras de orina antes y después de la intervención nutricional. Como puede verse en la Figura 17, en mayores casos se produjo una disminución significativa en los niveles de peroxidación lipídica.

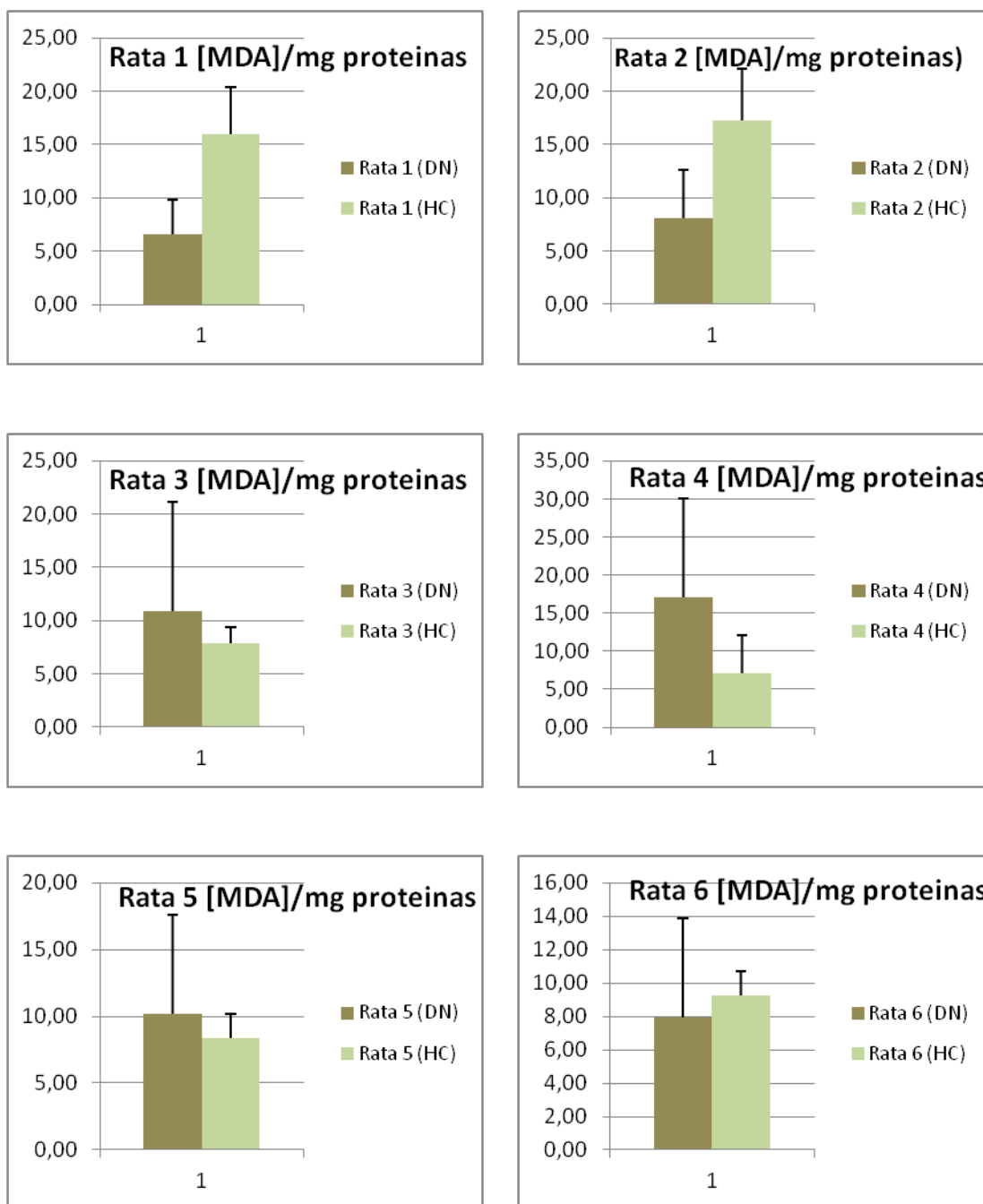


Figura 17. Niveles de Malondialdehído en orina de rata alimentadas con dieta estándar y harina de castaña. Los resultados son la media \pm SEM (n= 4 con dieta estándar; n= 6 con harina de castaña). * Estadísticamente significativo ($p < 0,05$; ANOVA seguido de Test de Tukey). Las letras [MDA] hacen referencia a micromoles.

4.4. Niveles de calcio en orina de rata antes y después de la intervención nutricional

Los niveles de calcio se determinaron como se indica en el apartado de Metodología. Como puede observarse en la Figura 18, los resultados muestran que la cantidad de calcio disminuye de forma significativa en todas las ratas a excepción de la 6.

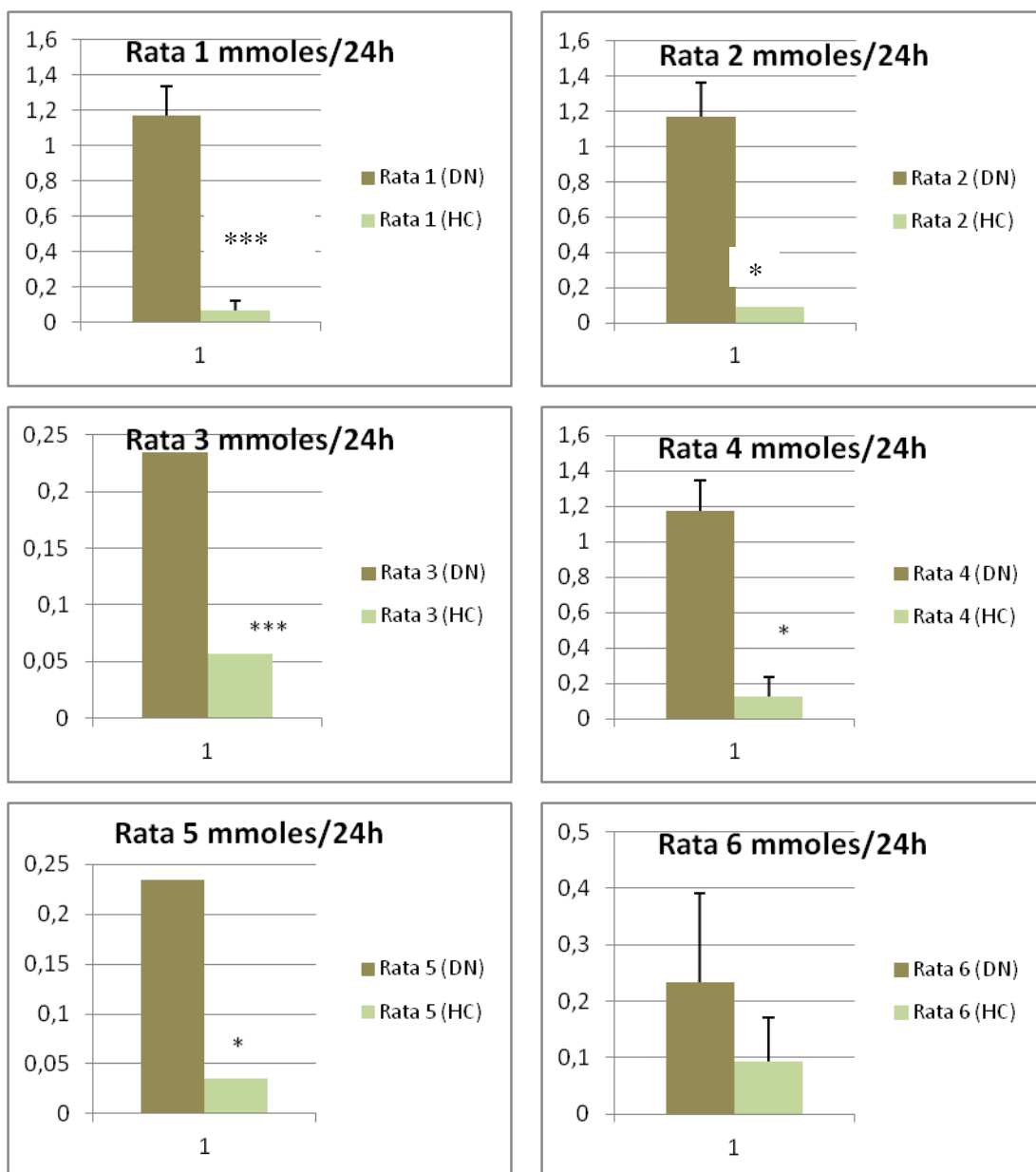


Figura 18. Niveles de calcio en orina de 24 horas en ratas antes y después de la intervención nutricional con harina de castaña. Los resultados son la media \pm SEM (n=7 dieta estándar; n= 6 con harina de castaña). * Estadísticamente significativo ($p < 0.05$; ANOVA seguido de Test de Tukey).

4.5. Niveles de iones cloruro en orina de rata alimentada con dieta estándar y harina de castaña

Los iones cloruro en orina se determinaron como se indica en el apartado de Metodología. Puede verse en la Figura 19 que la alimentación con harina de castaña produjo en todos los casos una gran disminución en la excreción urinaria de iones cloruro.

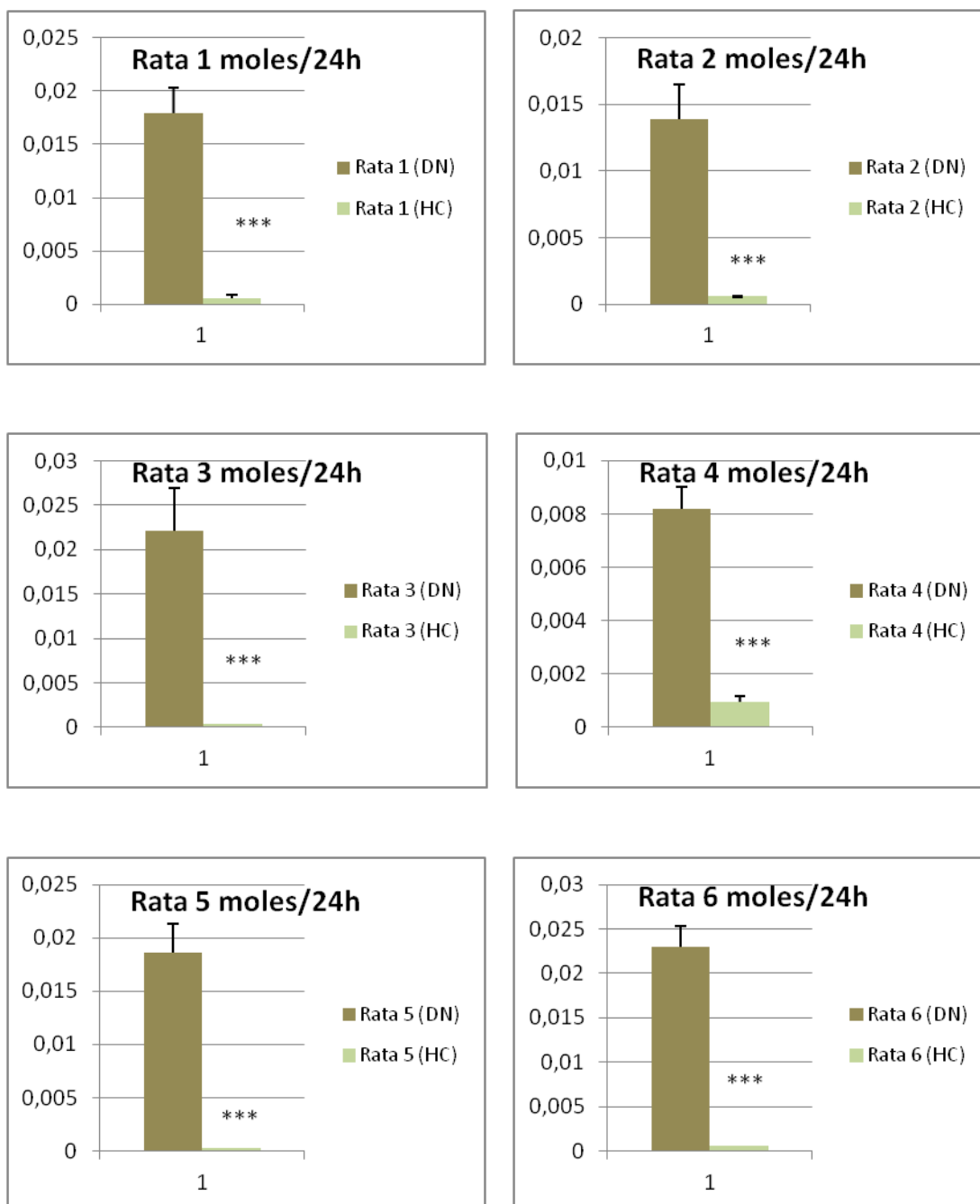


Figura 19. Niveles de iones cloruro en orina de 24 horas en ratas tras la intervención nutricional con harina de castaña. Los resultados son la media \pm SEM (n= 7 dieta estándar; n=6 dieta con harina de castaña). * Estadísticamente significativo (p<0.05; ANOVA seguido de Test de Tukey).

4.6. Discusión

Además de la adquisición de conocimientos y habilidades sobre cómo se plantea y ejecuta un trabajo experimental en el área de Bioquímica y Biología Molecular, el presente trabajo está relacionado con el esquema general de funcionamiento de una consulta de Medicina Antienvjecimiento (MA).

La MA se centra en el mantenimiento de las funciones óptimas del organismo y no en la enfermedad, siendo una medicina personalizada, preventiva y predictiva (Grossman, 2005). Normalmente, las personas que acuden a las consultas de MA se corresponden con alguno de los siguientes grupos:

1. Personas sanas (25-40 años), que no tienen síntomas de nada y están preocupados por envejecer bien o porque lleven un tipo de vida que saben que no es bueno para la salud.
2. Personas sanas pero con algún “achaque” moderado (40-55 años), que suele ser sobrepeso-prediabetes, problemas digestivos (acidez, estreñimiento, etc.),
3. Personas de edad más avanzada que piensan que aun tienen margen para la mejora (>55-60 años) o también, es frecuente encontrar pacientes que acuden para potenciar los efectos de algún tratamiento o cirugías estéticas.
4. Pacientes oncológicos que buscan consejo médico sobre la mejor manera de afrontar los tratamientos y evitar la recurrencia del proceso tumoral.

En todos los casos, se realiza un estudio médico personalizado diseñado para:

1. Identificar los factores que aceleran el envejecimiento y la aparición de enfermedades relacionadas con la edad.
2. Intervenir sobre los mismos para restaurar el equilibrio funcional, prevenir la aparición de enfermedades y mejorar la salud y calidad de vida de los pacientes.

Para ello, se realiza en primer lugar una historia clínica detallada y diversos cuestionarios de salud, a partir de los cuales se prescriben pruebas adicionales destinadas a una evaluación más en profundidad y para predecir si el paciente está en vías de tener unos síntomas clínicos, ya que aunque la persona piense que está sano puede no estarlo. Seguidamente, se establecen las recomendaciones que sirvan para modular las alteraciones bioquímicas, funcionales y estructurales. Así, por ejemplo, se

van a corregir malos hábitos nutricionales, se procura restablecer el equilibrio de los radicales libres y el equilibrio hormonal, se va a gestionar el estrés, se van a modular los procesos inflamatorios, etc. En este sentido, este trabajo se ha centrado en una intervención nutricional a base de harina de castaña, que es un alimento nuevo elaborado por una empresa ubicada en Alajar (Huelva), con el objetivo de diversificar los productos obtenidos del castaño, cuyas propiedades saludables potenciales se han estudiado de forma preliminar en este trabajo. En este esquema, es fundamental la realización de unas pruebas bioquímicas, genómicas, funcionales, no sólo al principio sino para ver la evolución/mejora de los pacientes tras los distintos tratamientos. Estas analíticas comprenden la medición de distintos marcadores de envejecimiento y enfermedades relacionadas y, como se ha comentado, los paneles de parámetros a analizar dependerán de los resultados del cuestionario inicial. Estos paneles incluyen un perfil clínico básico, determinaciones de hormonas, perfil cardiovascular, perfil de inflamación, minerales, análisis del pH de la orina, estudio nutricional y medidas antropométricas, pruebas funcionales, análisis de las intolerancias alimentarias, estudio de las alteraciones del sueño, análisis de minerales en cabello, test genómico para el análisis de riesgo a padecer determinadas enfermedades y personalización de los tratamientos. Normalmente, estas analíticas se suelen encargar a laboratorios especializados y su precio encarece mucho las consultas (un perfil completo puede costar 2.000 euros), siendo el laboratorio y no el médico el que más beneficio económico obtiene.

Ante esto, surge la necesidad de disponer de una serie de pruebas factibles de hacerse en la propia consulta de MA, que no sólo aporten información en la evaluación del paciente sino que minimice la exteriorización de las analíticas. La idea no es sólo disminuir los precios de las consultas sino también determinar más selectivamente qué análisis serían más recomendables para cada paciente.

Todas estas “pruebas en consulta” deben seguir una serie de criterios. Primeramente, que sean fáciles de hacer. En segundo lugar, que sean lo más específicas posible. Y tercero, de bajo coste. Con estos tres criterios, hemos seleccionado cuatro test.

En todos los casos se ha realizado una labor de búsqueda de los métodos más sencillos de determinación, adaptándose los mismos para que proporcionen al menos información cualitativa o semicuantitativa. En este sentido, nuestro trabajo incluye de forma clara la composición de todos los reactivos usados.

Hay que mencionar que el estudio de los marcadores de envejecimiento y enfermedades relacionadas ha sido objeto de investigación por parte del grupo de investigación “Bioquímica del envejecimiento”. Efectivamente, hay marcadores muy específicos, por ejemplo, los isoprostanos en suero como marcadores de oxidación lipídica (Arguelles y cols., 2004). Sin embargo, su determinación requiere una metodología compleja y cara y lo más importante es que a pesar de producirse por oxidación no enzimática de los lípidos de membrana no están exentos de inespecificidades, en el sentido de que los hay de distintos tipos (unidos o no a proteínas), sin que esté claro cuál de ellos medido en suero refleja el estado general de oxidación de todos los tejidos (Arguelles y cols., 2004).

Es por ello que en este trabajo nos hemos centrado en unas determinaciones de biomarcadores que se pueden realizar fácilmente en orina en la propia consulta y que van a permitir tener una idea general y rápida del estado inicial del paciente y conocer aquellos aspectos en los cuales habría que profundizar más. Estas pruebas han sido el test del MDA, el test de la vitamina C, el test de calcio y el test de fatiga adrenal.

En este trabajo se ha puesto a punto la medida de MDA (Draper y cols., 1993), en orina de rata. Como se ha indicado en el apartado de Metodología, se determinó el MDA en ratas alimentadas con dieta normal y posteriormente en las mismas ratas alimentadas con harina de castaña. Los resultados han mostrado que no hay diferencias significativas en los niveles de MDA entre ambos grupos, no pudiéndose descartar que un tratamiento más a largo plazo sí pueda repercutir en los niveles de este marcador de peroxidación.

Por otro lado, para combatir el estrés oxidativo están los antioxidantes y entre ellos la vitamina C. Los resultados muestran que a pesar de ser un periodo corto de intervención nutricional, la harina de castaña contribuyó al aumento significativo de los niveles de vitamina C en orina en algunos de los animales, lo cual permite predecir que su inclusión en la dieta puede tener efectos beneficiosos para la salud, retrasar el envejecimiento y la aparición de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Otro parámetro medido ha sido el calcio. En nuestro estudio, el calcio en la orina se ha determinado a través de una prueba sencilla que lo determina de forma semicuantitativa. En este método, el calcio presente en las muestras genera un precipitado. En nuestro caso, todas las muestras analizadas presentaron unos menores niveles de calcio tras la intervención nutricional, cuyo significado fisiológico y mecanismo son necesarios estudiarlos en más profundidad, ya que en principio se podría especular con la

posibilidad que la harina de castaña permite preservar el calcio, lo que contribuiría a una mejor salud ósea.

La siguiente prueba optimizada en nuestro trabajo ha sido la destinada a establecer la posible existencia de **estrés adrenal**, el cual supone un problema de salud importante, y de ahí que sea interesante evaluar este parámetro (Silverman y cols., 2010). En respuesta al estrés se libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH), una hormona producida por el hipotálamo que estimula al lóbulo anterior de la glándula pituitaria para secretar la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), también conocida como corticotropina. Esta ACTH estimula a su vez a la corteza suprarrenal que conduce a la síntesis de corticosteroides que incluyen glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona).

Altos niveles de aldosterona causan la reabsorción de sodio y cloruro disminuyendo así la eliminación de los mismos por orina (Neary y Nieman, 2013). Con la fase de fatiga adrenal, se da lugar a una hipofunción suprarrenal debido a que las glándulas están exhaustas por el sobreesfuerzo realizado dando lugar a una menor producción de cortisol y aldosterona. Esta situación de estrés adrenal tiene una sintomatología consistente en cansancio generalizado, depresión y mareo (Joels y Baram, 2009).

Llama la atención la disminución de los niveles de iones cloruro causado por la harina de castaña, que obviamente no pueden ser debidas a un cambio en la capacidad de las glándulas suprarrenales de responder al estrés ya que el tiempo utilizado en este experimento no ha sido tan extenso.

La bajada de iones cloruro probablemente no sea debida a un efecto producido por el estrés provocado por las jaulas de metabolismo, sino que pueda deberse a otros factores, ya que al ser el cloruro un electrolito, funciona para ayudar a conservar el equilibrio apropiado de líquidos corporales y mantener el equilibrio ácido-básico del cuerpo y sus bajos niveles en orina podrían ser debidos a un aumento del pH de la sangre. Todas estas posibilidades deben ser abordadas en un estudio más completo y a largo plazo.

5. Conclusiones

El trabajo realizado permite obtener las siguientes conclusiones:

- I. La alimentación con harina de castaña aumenta en algunos casos la vitamina C en orina, lo cual puede representar una mayor protección frente al envejecimiento por sus cualidades antioxidantes.
- II. Los niveles de MDA en orina con alimentación normal no son significativamente diferentes de los obtenidos con la harina de castaña.
- III. Tras la intervención nutricional con harina de castaña los niveles de calcio urinario fueron menores en la mayoría de los casos, lo cual puede representar una preservación de la salud ósea.
- IV. Los niveles de cloruro disminuyeron en todos los casos tras la alimentación con harina de castaña. Probablemente esta disminución no esté relacionada con el estrés adrenal y si con aspectos relacionados con el equilibrio electrolítico y el pH de la sangre.
- V. Este estudio debe ser considerado preliminar y consecuentemente sería necesario realizar un estudio a largo plazo para ver con mayor exactitud el efecto beneficioso de la harina de castaña.

6. Bibliografía

1. Arguelles S, Garcia S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status?. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. Vol. 1674 (3): 251-9.
2. Arias Gaviria D. Envejecimiento: teorías y aspectos moleculares. *Rev Med Risaralda.* 2007; vol.13 (2).
3. Berger EY. Calcium Determination in Biologic Material. *Clin. Chem.* 1995; Vol. 1: 249-252.
4. Birch TW, Harris LJ, Ray SN. Hexuronic (Ascorbic) Acid as the Antiscorbutic Factor, and its Chemical Determination. *Nature.* 1993; Vol.131: 273–274.
5. Corredor CF. Antioxidantes. En: Patiño JF, Echeverri S. *Metabolismo, Nutrición y Shock.* 4ª ed. Colombia: Panamericana; 2006. p. 293-306.
6. Criado C, Moya M. *Vitaminas y antioxidantes.* 2ª ed. Madrid: Saned; 2009.
7. Charmandari E, Nicolaidis NC, Chrousos GP. Adrenal insufficiency. *Lancet.* 2014; Vol. 383: 2152-2167.
8. Da costa L, Badawi A, El-Sohehy A. Nutrigenética y modulación del estrés oxidativo. *Ann. Nutr. Metab.* 2012; Vol.60 (3): 27-36.
9. Dettman G, Kalokerinos A, Dettman I. La Terapia de Megadosis de Vitamina C y el método para determinar la dosis adecuada. En: Todd F. *Vitamina C Misil Sanador de la Naturaleza.* 2ª ed. Bogotá: Orión editores LTDA; 2007. p.100-101.
10. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwals S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med.* 1993; Vol. 15 (4): 353-363.
11. Figueroa R, Rivas S. Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. *Front. Physiol.* 2015; Vol. 6 (397): 10-33.
12. Frati A, Landi D, Marinelli C, Gianni G, Fontana L, Migliorini M et al. Nutraceutical properties of chestnut flours: beneficial effects on skeletal muscle atrophy. *Food Funct.* 2014; Vol.5 (11): 2870-82.
13. Grossman T. Latest advances in antiaging medicine. *Keio J. Med.* 2005; Vol. 54 (2): 85-94.

14. Guerrero JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Ann.Med. Interna.* 2001; Vol 18 (6): 326-335.
15. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995; Vol. 30 (6): 445-600.
16. Hui-Ting L, Tsai-Hung W, Chen-Sung L, Chyou-Shen L, Yau-HueiWei, Chang-YouhTsai et al. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-from the viewpoint of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Mitoch.* 1090. 2016; Vol. 30: 1-7.
17. Joels M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009; Vol. 10 (6): 459-66.
18. Kil HN, Eom SY, Park JD, Kawamoto T, Kim YD, Kim H. A rapid method for estimating the levels of urinary thiobarbituric Acid reactive substances for environmental epidemiologic survey. *Toxicol. Res.* 2014; Vol. 30 (1): 7-11.
19. Kurien BT, Everds N, Scofield RH. Recolección experimental de orina en animales. *Lab. Anim.* 2004; Vol.38: 333-361.
20. Kwiecien S, Jasnos K, Magierowski M, Sliwowski Z, Pajdo R, Brzozowski B et al. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014; Vol. 65 (5): 613-22.
21. Neary N, Nieman L. Adrenal insufficiency: etiology, diagnosis and treatment. *Curr. Opin, Endocrinol. Metab.* 2013; Vol. 17 (3): 217-23.
22. Pueyo B, Mach N. Disbiosis intestinal en enfermos de Crohn pediátricos. *Nutr. Hosp.* 2013; Vol. 28 (6): 1820-1828.
23. Salmon AB, Richardson A, Pérez VI. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; Vol. 48 (5): 642-655.
24. Sánchez V, Méndez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex.* 2013; Vol. 20 (3): 161-168.
25. Silverman M, Heim C, Nater U, Marques A, Stemberg E. Neuroendocrine and immune contributors to fatigue. *PM.R.* 2010; Vol. 2 (5): 338-346.

26. Thakker R. The parathyroid glands, hypercalcemia, and hypocalcemia. En: Goldman L, Schafer A. Goldman-Cecil Medicine. 25 ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p.245.
27. Turpeinen U, Hamalainen E. Determination of cortisol in serum saliva and urine. Best Pract. Res. Clin, Endocrinol. Metab. 2013; Vol. 27 (6): 795-801.
28. Zorrilla García A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev. Cubana Invest. Bioméd. 2002; Vol.21 (3): 1561-3011.